



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 885.575

Classif. Internat. : C07C/C07D/A01N

Mis en lecture le : 10-06-1981

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention ;

Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle ;

Vu le procès-verbal dressé le 10 décembre 1980 à 11 h. 00

au Service de la Propriété industrielle ;

ARRÊTE :

Article 1. — *Il est délivré à* la Sté dite : ELI LILLY AND COMPANY,
307 East Mc Carty Street, City of Indianapolis, Indiana
(Etats-Unis d'Amérique),

*repr. par Langner Parry, c/o Mr. Frank Seifert, 77 Frans
De Ceusterlei, 2120 Schoten,*

*un brevet d'invention pour : Dérivés de noyaux peptidiques cycliques,
leur préparation et leur utilisation comme agents
antifongiques,
(Inv. : M. Debono)*

*qu'elle déclare avoir fait l'objet de demandes de brevet
déposées aux Etats-Unis d'Amérique le 13 décembre 1979,
n°s 103.012, 103.018, 103.019, 103.146 et 103.150 et le
25 août 1980, n° 181.034, 181.035, 181.037, 181.434 et
181.442 au nom de M. Debono dont elle est l'ayant cause.*

Article 2. — *Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et
périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit
de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.*

*Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui
de sa demande de brevet.*

Bruxelles, le 10 juin 1981

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE :

Le Directeur

L. SALPETEUR

Dérivés de noyaux peptidiques cycliques, leur préparation et leur utilisation comme agents antifongiques.

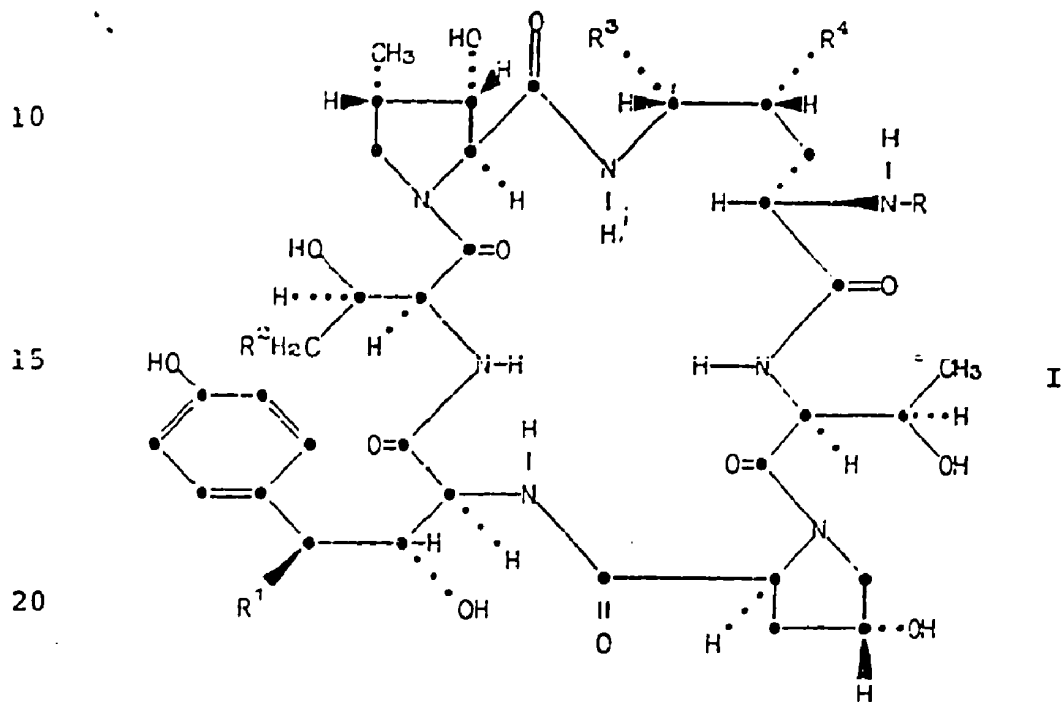
Société dite : ELI LILLY AND COMPANY

Priorité conventionnelle des demandes de brevet déposées aux Etats-Unis d'Amérique N° 103,012-103,018-103,019-103,146-103,150
le 13 Décembre 1979 et N° 181,034-181,035-181,037-181,434-181,442
le 25 Août 1980 au nom de Manuel DEBONO.

Inv: M. Debono

Cette invention concerne de nouveaux composés antifongiques semi-synthétiques que l'on prépare par acylation de noyaux peptidiques cycliques obtenus par désacylation enzymatique de l'antibiotique peptidique cyclique 5 correspondant.

L'antibiotique peptidique cyclique est un composé antifongique ayant la formule générale :



dans laquelle R, R¹, R², R³ et R⁴ sont définis ci-dessous. Dans toute cette demande, les formules des peptides cycliques, 25 comme la formule I, supposent que les amino-acides représentés sont en configuration L.

Les facteurs A, B, D et H de A-30912 sont des antibiotiques peptidiques cycliques de formule générale I où R est le groupement linoléoyle [cis,cis CH₃(CH₂)₄-CH=CHCH₂CH= 30 CH-(CH₂)₇-CO-].

Le facteur A de A-30912 a la formule I dans laquelle R¹, R³ et R⁴ sont tous OH et R² est H.

Le facteur B de A-30912 a la formule I dans laquelle R¹ et R² sont tous deux H et R³ et R⁴ sont tous deux OH.

35 Le facteur D de A-30912 a la formule I dans laquelle R¹, R², R³ et R⁴ sont tous H.

Le facteur H de A-30912 a la formule I dans laquelle R¹ et R⁴ sont tous deux OH, R² est H et R³ est CH₃O.

Mc

L'antibiotique S 31794/F-1 est un peptide cyclique antifongique de formule I dans laquelle R est un groupement myristoyle et R¹, R³ et R⁴ sont OH et R² est -CO-NH₂.

Chaque facteur est isolé du complexe A30912 qui
 5 contient les autres facteurs arbitrairement appelés facteurs B, C, D, E, F et G. Le complexe A-30912 et les facteurs A à G individuels sont décrits par M. Hoehn et K. Michel dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.245. Le facteur A de l'antibiotique A-30912 est identique à l'antibiotique A-22802
 10 qui est décrit dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.246. Il a également été trouvé que le facteur A est identique à l'échinocandine B antibiotique [voir F. Benz et al., Helv. Chim. Acta, 57, 2459 (1974) et brevet suisse N° 568.386] et à l'antibiotique SL 7810/F [voir C. Keller-Juslen et al.
 15 Tetrahedron Letters, 4147 (1976) et brevet belge N° 834.289].

Le facteur A de l'antibiotique A-30912 est préparé par fermentation aérobie en immersion en utilisant l'un de plusieurs organismes différents, à savoir : (a) Aspergillus rugulosus NRRL 8113 ; (b) Aspergillus nidulans NRRL 8112 ;
 20 (c) Aspergillus nidulans var. echinulatus A-32204, NRRL 3860 ; (d) Aspergillus rugulosus NRRL 8039 ; ou (e) Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440.

On a également trouvé que le facteur B est identique à l'échinocandine C antibiotique [voir R. Traber et al., Helv. Chim. Acta, 62, 1252 (1979)] et à l'antibiotique SL 7810/F-II
 25 [voir le brevet belge N° 834.289].

On prépare le facteur B de l'antibiotique A-30912 par fermentation aérobie en immersion en utilisant l'un de plusieurs organismes différents, à savoir : (a) Aspergillus rugulosus NRRL 8113 ; (b) Aspergillus nidulans var. echinulatus
 30 A-32204, NRRL 3860 ; (c) Aspergillus rugulosus NRRL 8039 ; ou (d) Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 1440.

On a également trouvé que le facteur D est identique à l'échinocandine D antibiotique [voir R. Traber et al.,
 35 Helv. Chim. Acta, 62, 1252 (1979)] et à l'antibiotique SL 7810/F-III [voir le brevet belge N° 834.289].

On prépare le facteur D de l'antibiotique A-30912 par fermentation aérobie en immersion en utilisant l'un de

Mc

- plusieurs organismes différents, à savoir : (a) Aspergillus rugulosus NRRL 8113 ; (b) Aspergillus nidulans var. echinulatus A-32204, NRRL 3860 ; (c) Aspergillus rugulosus NRRL 8039 (voir le brevet belge N° 834.289) ; ou (d)
- 5 Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440.

Le facteur H est un facteur de l'antibiotique A-30912 découvert plus tard, et il est décrit dans la demande de brevet français N° 80 12212 dont la description est incorporée ici par voie de référence.

- 10 Le facteur H de A-30912 est préparé par fermentation en utilisant l'un de plusieurs organismes différents, à savoir : (a) Aspergillus rugulosus NRRL 8113 ; ou (b) Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440.

- Une sous-culture de A. nidulans var. roseus a été
- 15 déposée et fait partie de la collection de cultures permanentes du Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Peoria, Illinois 61604, où elle est disponible au public sous le numéro NRRL 11440.

- 20 Quand on utilise une souche de A. nidulans var. roseus NRRL 11440 pour produire l'un quelconque des facteurs A-30912, on obtient un ensemble complexe de facteurs qui pour des raisons de commodité est appelé complexe antibiotique A-42355. Le facteur A de A-30912 est le facteur principal du
- 25 complexe antibiotique A-42355, tandis que les facteurs B, D et H sont des facteurs mineurs. Les préparations 2 à 7 suivantes illustrent la préparation du complexe A-42355 et l'isolement et la purification des différents facteurs de A-30912.

- 30 Dans la molécule antibiotique de formule I, la chaîne latérale linoléoyle (R) est fixée au noyau peptidique cyclique sur le groupement α -amino du reste ornithine. On a trouvé de façon surprenante que la chaîne latérale linoléoyle peut être coupée du noyau par une enzyme sans modifier
- 35 l'intégrité chimique du noyau. L'enzyme utilisée pour effectuer la réaction de désacylation est produite par un micro-organisme de la famille Actinoplanaceae, de préférence le micro-organisme Actinoplanes utahensis NRRL 12052 ou un de ses variants.

Pour effectuer la désacylation, on ajoute le facteur approprié de l'antibiotique A-30912 à une culture du micro-organisme et on laisse la culture incuber avec le substrat jusqu'à ce que la désacylation soit pratiquement complète. Le noyau cyclique ainsi obtenu est séparé du bouillon de fermentation par des procédés connus dans le domaine. Au contraire des facteurs A, B, D et H de l'antibiotique A-30912, le noyau cyclique (ne possédant pas la chaîne latérale linoléoyle) est essentiellement exempt d'activité antifongique.

- 10 L'antibiotique S31794/F-1, qui est décrit dans la demande de brevet allemand publiée après examen N° 2.628.965 et dans le brevet des E.U.A. N° 4.173.629, est produit par Acrophialophora limonisporea nov. spec. Dreyfuss et Muller NRRL 8095. S31794/F-1 a les caractéristiques suivantes :
- 15 p.f. 178-180°C (avec décomposition) (amorphe) ou 181-183°C (avec décomposition) (cristallisé) ; $[\alpha]_D^{20} - 24^\circ$ (c 0,5, CH₃OH) ou + 37° (c 0,5, pyridine) (cristallisé) ; maxima d'absorption UV dans le méthanol à 194 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 807$), 225 nm (épaulement) $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 132$, 276 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 12,8$),
- 20 284 nm (épaulement) $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 10,5$; un spectre RMN du carbone ¹³C dans le deutérométhanol (190 mg dans 1,5 ml de deutérométhanol, en utilisant le tétraméthylsilane comme étalon interne) ayant les caractéristiques suivantes (à l'état cristallisé) :

	PPM	PPM	PPM
25	176,2	75,5	51,2
	175,0	74,0	39,7
	173,7	71,0	38,8
	172,6	70,5	36,6
30	172,0	69,7	34,8
	171,8	68,0	32,8
	171,7	62,2	30,6
	168,6	58,3	26,7
	157,7	57,0	23,5
35	132,5	56,2	19,7
	129,0	55,4	14,3
	115,9	52,9	11,1
	76,6		

une analyse élémentaire approximative (après séchage du matériau cristallisé pendant deux heures sous vide poussé à 100°C) comme suit : 55,5-56,5 % de carbone, 7,5-7,7 % d'hydrogène, 10,5-10,8 % d'azote et 25,5-26,0 % d'oxygène ; il est facilement soluble dans le méthanol, l'éthanol, la pyridine, le diméthylsulfoxyde et faiblement soluble dans l'eau, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'éther diéthylique, le benzène et l'hexane ; et a une activité antifongique, en particulier contre Candida albicans.

- 10 On prépare l'antibiotique S31794/F-1 par culture aérobie en immersion de Acrophialophora limonisporea NRRL 8095 comme décrit dans les préparations 8 et 9. Ce micro-organisme fait partie de la collection de cultures permanentes du Northern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Culture Collection, North Central Region, Peoria, Illinois 61604, où elle est disponible au public sous le numéro d'accès NRRL indiqué.

L'antibiotique S31794/F-1 a une activité anti-
20 fongique, en particulier contre les souches Candida comme Candida albicans. Ainsi, la production et l'isolement de l'antibiotique peuvent être contrôlés par bioautographe en utilisant une espèce Candida comme Candida albicans.

Dans la molécule de l'antibiotique S31794/F-1
25 de formule I, où R^1 , R^3 et R^4 sont tous des groupements hydroxy et R^2 est un groupement $-CO-NH_2$, la chaîne latérale myristoyle (R) est fixée au noyau peptidique cyclique sur le groupement α -amino du reste dihydroxyornithine. On a trouvé
30 de façon surprenante que la chaîne latérale myristoyle peut être coupée du noyau par une enzyme sans nuire à l'intégrité chimique du noyau. L'enzyme utilisée pour effectuer la réaction de désacylation est produite par un micro-organisme de la famille Actinoplanaceae, de préférence le micro-organisme Actinoplanes utahensis NRRL 12052 ou un de ses
35 variants. Pour effectuer la désacylation, on ajoute l'antibiotique S31794/F-1 à une culture du micro-organisme et on laisse la culture incuber avec le substrat jusqu'à ce que la désacylation soit pratiquement complète. Le noyau

cyclique ainsi obtenu est séparé du bouillon de fermentation par des procédés connus dans le domaine. Au contraire de l'antibiotique S31794/F-1, le noyau cyclique (ne présentant pas la chaîne latérale myristoyle) est essentiellement exempt 5 d'activité antifongique.

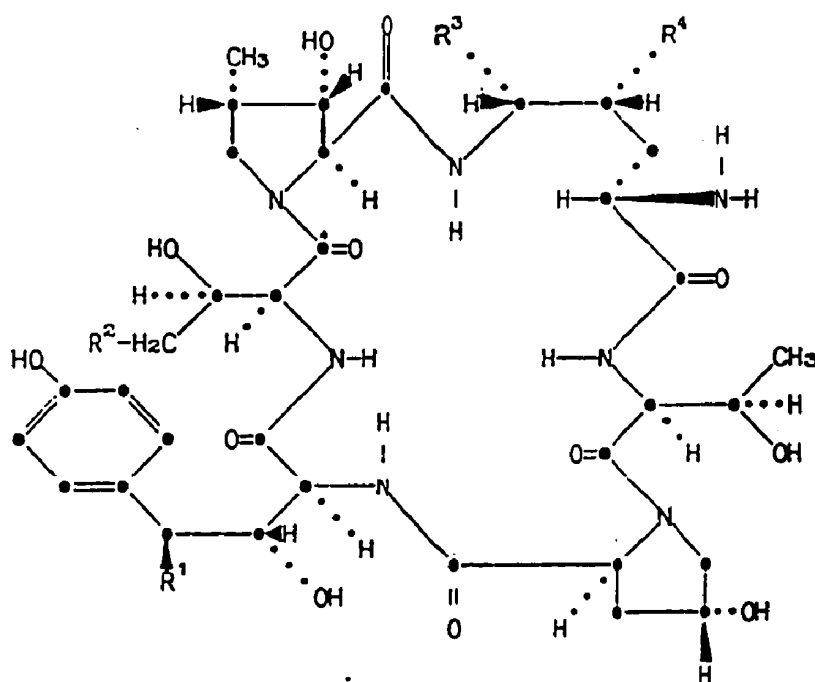
Les noyaux peptidiques cycliques fournis par les réactions de désacylations enzymatiques susmentionnées des antibiotiques de formule I sont représentés par la formule générale II.

10

15

20

25



II

Le composé de formule II où R^1 , R^3 et R^4 sont tous 30 des groupements hydroxy et R^2 est H est le noyau du facteur A de A-30912 et, pour des raisons de commodité, sera appelé ici "noyau de A-30912A". Le noyau de A-30912A a une formule brute de $C_{34}H_{51}N_7O_{15}$ et un poids moléculaire de 797,83.

Le composé de formule II où R^1 et R^2 sont tous deux 35 H et R^3 et R^4 sont tous deux OH est le noyau du facteur B de A-30912 et, pour des raisons de commodité, sera appelé ici "noyau de A-30912B". Le noyau de A-30912B a une formule empirique de $C_{34}H_{51}N_7O_{14}$ et un poids moléculaire de 781,81.

Le composé de formule II où R^1 , R^2 , R^3 et R^4 sont tous des atomes d'hydrogène est le noyau du facteur D de A-30912 et sera appelé ici pour des raisons de commodité "noyau de A-30912D". Le noyau de A-30912D a une formule brute de $C_{34}H_{51}N_7O_{12}$ et un poids moléculaire de 749,83.

Le composé de formule II où R^1 et R^4 sont tous deux OH, R^2 est H et R^3 est CH_3O- est le noyau du facteur H de A-30912 et, pour des raisons de commodité, sera appelé ici "noyau de A-30912H".

10 Le composé de formule II dans laquelle R^1 , R^3 et R^4 sont OH et R^2 est $-CO-NH_2$ est le noyau de l'antibiotique S 31794/F-1 et sera appelé ici "noyau de S 31794/F-1". Le noyau de S 31794/F-1 a une formule brute de $C_{35}H_{52}N_8O_{16}$ et un poids moléculaire de 840,87.

15 L'enlèvement de la chaîne latérale fournit un groupement α -amino primaire libre dans le reste ornithine du peptide cyclique. Comme le verra l'homme de l'art, les noyaux peuvent être obtenus sous la forme de l'amine libre ou sous la forme d'un sel d'addition d'acide. Bien que l'on puisse
20 utiliser un quelconque sel d'addition d'acide approprié, on préfère ceux qui sont non toxiques et acceptables sur le plan pharmaceutique.

Le procédé de préparation de chaque noyau à partir de l'antibiotique approprié à l'aide d'une fermentation
25 utilisant Actinoplanes utahensis NRRL 12052 est décrit dans la demande de brevet déposée le même jour que la présente demande de brevet sous le N°

Des cultures d'espèces représentatives d'Actinoplanaceae sont mises à la disposition du public au Northern
30 Regional Research Laboratory sous les numéros d'accès suivants :

	<u>Actinoplanes utahensis</u>	NRRL 12052
	<u>Actinoplanes missouriensis</u>	NRRL 12053
	<u>Actinoplanes sp.</u>	NRRL 8122
35	<u>Actinoplanes sp.</u>	NRRL 12065
	<u>Streptosporangium roseum</u>	
	var. <u>hollandensis</u>	NRRL 12064

L'efficacité d'une quelconque souche donnée de micro-organismes appartenant à la famille des Actinoplanaceae pour la mise en oeuvre de la désacylation de cette invention est déterminée par le mode opératoire suivant. On inocule 5 avec le micro-organisme un milieu de culture approprié. On fait incuber la culture à environ 28°C pendant deux ou trois jours sur un agitateur rotatif. Puis on ajoute à la culture l'un des antibiotiques utilisés comme substrat. On maintient le pH du milieu de fermentation à environ 6,5. On contrôle 10 la culture pour son activité en utilisant une analyse par Candida albicans. La perte de l'activité antibiotique est une indication que le micro-organisme a produit l'enzyme nécessaire pour la désacylation. Ceci doit cependant être vérifié en utilisant l'un des procédés suivants : 1) analyse 15 par chromatographie liquide sous pression élevée pour déterminer la présence du noyau intact ; ou 2) réacylation avec une chaîne latérale appropriée (par exemple linoléoyle, stéaroyle, palmitoyle ou myristoyle) pour rétablir l'activité.

On sait que d'autres substances antibiotiques 20 possèdent le même noyau que celui de facteur A de l'antibiotique A-30912. Ces antibiotiques diffèrent du facteur A de l'antibiotique A-30912 en ce que des groupements acyle différents sont présents à la place du groupement linoléoyle (R) de la formule I. De tels antibiotiques sont : (a) le 25 facteur A de A-30912-tétrahydrogéné (tétrahydro-SL 7810/F ; tétrahydro échinocandine B) décrit dans le brevet belge N° 834.289 et par F. Benz et al., Helv. Chim. Acta, 57 2459 (1974), composé qui est décrit par la formule I quand R est un groupement stéaroyle ; et (b) l'aculaécine A, qui est 30 un composant du complexe d'aculaécine (préparée par fermentation en utilisant Aspergillus aculeatus NRRL 8075) et est décrit dans le brevet des E.U.A. N° 3.978.210. Comme décrit dans le brevet belge N° 859.067, dans l'aculaécine A, la chaîne latérale palmitoyle est présente à la place du 35 groupement linoléoyle. Le facteur A de A-30912 tétrahydrogéné peut être préparé à partir du facteur A de A-30912 par hydrogénation catalytique en utilisant PtO_2 dans l'éthanol sous une pression positive. Le facteur A de A-30912

1

5 antibiotique possède le même noyau que le facteur B de l'antibiotique A-30912. Cette substance, qui diffère du facteur B de l'antibiotique A-30912 en ce qu'un groupement acyle différent est présent à la place du groupement linoléoyle R de la formule I, est le facteur B de A-30912

15

30

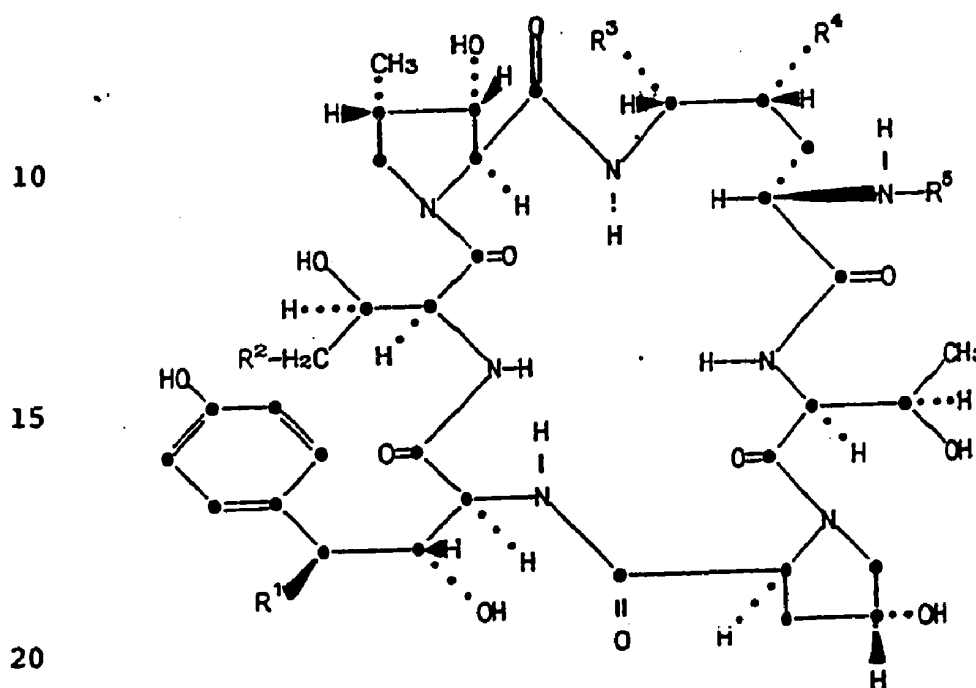
MC

groupement 5-hydroxy présent dans le reste dihydroxy-
ornithine du noyau peptidique est méthylé, tandis que dans
le facteur A de l'antibiotique A-30912, le groupement 5-
hydroxy n'est pas substitué. On verra donc que l'on peut
5 préparer le facteur H de façon synthétique en méthylant le
facteur A selon des procédés classiques pour préparer un
éther aliphatique à partir d'un alcool. On verra également
que le facteur A peut être alkylé avec d'autres groupements
alkyle inférieur pour former des homologues à groupements
10 alkyloxy de la molécule du facteur H. Les homologues à
groupements alkyloxy du facteur H que l'on peut préparer par
synthèse à partir du facteur A, sont connus sous le nom
d'homologues du type facteur H de A-30912. Les composés de
formule II où R^1 et R^4 sont tous deux OH, R^2 est H et R^3 est
15 un groupement alkyloxy en C_2-C_6 sont ici appelés comme les
"noyaux du type A-30912H".

On verra également que la chaîne latérale linoléoyle
du facteur H de A-30912 ou des homologues de type facteur H
de A-30912 peut être hydrogénée selon des techniques
20 classiques pour former le facteur H de A-30912 tétrahydrogéné
ou le dérivé tétrahydrogéné correspondant des homologues à
groupements alkyloxy (R est un groupement stéaroyle). On peut
également préparer les dérivés tétrahydrogénés en hydrogénant
d'abord le facteur A de l'antibiotique A-30912 pour obtenir
25 le facteur A de A-30912 tétrahydrogéné puis en formant le
dérivé alkyloxy désiré.

Il est entendu que le facteur H de l'antibiotique
A-30912, le facteur H de A-30912 tétrahydrogéné, un
homologue à groupements alkyloxy en C_2-C_6 du facteur H ou un
30 dérivé tétrahydrogéné d'un homologue du facteur H à
groupement alkyloxy en C_2-C_6 peuvent être utilisés comme
substrat pour la désacylation enzymatique en utilisant
les modes opératoires décrits ici.

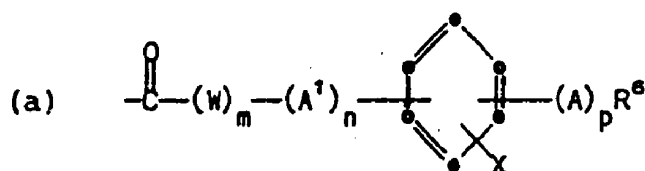
L'invention qui fait l'objet de la présente demande décrit de nouveaux composés obtenus par acylation d'un noyau peptidique cyclique de formule II. Les composés de la présente invention ont la structure chimique décrite 5 par la formule III :



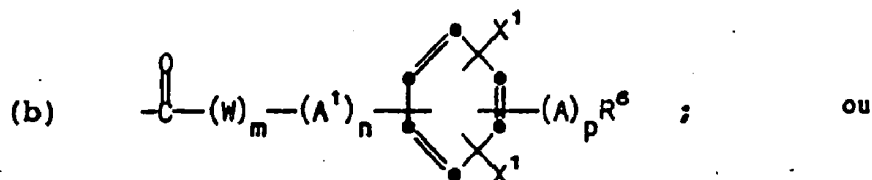
III

dans laquelle R^5 est un groupement de formule :

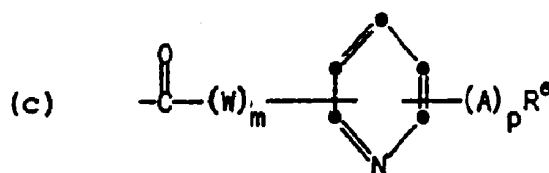
25



30



35



dans lesquelles A est un radical divalent oxygène, soufre, sulfinyle ou sulfonyle ; A¹ est un radical divalent oxygène, soufre, sulfinyle, sulfonyle ou -NH- ; X est un radical hydrogène, chloro, bromo, iodo, nitro, alkyle en C₁-C₃,
 5 hydroxy, alcoxy en C₁-C₃, mercapto, alkylthio en C₁-C₃, carbamyle ou alkylcarbamyle en C₁-C₃ ; X¹ est un atome de chlore, de brome ou d'iode ; R⁶ est un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle en C₁-C₁₈ ou alcényle en C₂-C₁₈ ; W est un groupement alkylène en C₁-C₁₀ ou alcénylène en C₂-C₁₀ ;
 10 m, n et p valent 0 ou 1, mais si m = 0, n doit être égal à zéro ; pourvu que : la somme des atomes de carbone des groupements R⁶ et W soit supérieure à 4 mais ne puisse pas dépasser 21 ; que, quand X est un groupement mercapto, A et A¹ ne puissent pas être un groupement sulfinyle ou sulfonyle ;
 15 et que, quand A et A¹ sont des groupements sulfinyle ou sulfonyle, ils soient dans des états d'oxydation égaux.

Un sous-groupe préféré de composés de formule III sont ceux où R¹ a la formule (a) où m et n = 0, p = 1 et R⁶ est un groupement alkyle en C₅-C₁₈ ou alcényle en C₅-C₁₈.

20 L'homme de l'art verra que, dans le noyau substitué du groupement R⁵, la fonction

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ -\text{C}-\text{W}-\text{A}^1- \end{array}$$
 et la fonction -AR⁶ peuvent être placées sur le noyau benzène en position ortho, méta ou para l'une par
 25 rapport à l'autre. On préfère que ces groupements soient en position para. Le substituant représenté par X peut être placé en une quelconque position disponible du noyau benzène non occupée par ces deux groupements.

Tels qu'utilisés ici, les termes "alkyle" ou
 30 "alcényle" désignent les chaînes hydrocarbonées ramifiées ou droites. Par "alcényle", on désigne un groupement hydrocarboné insaturé contenant une, deux ou trois doubles liaisons qui peuvent être en configuration cis ou trans.

Des exemples de radicaux alkyle en C₅-C₁₈ que l'on
 35 préfère pour R⁶ pour les besoins de la présente invention sont :

(a) $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ où n' est un entier de 4 à 17 ;
 et

mc

- (b) $-(CH_2)_r \overset{CH_3}{\underset{|}{CH}}(CH_2)_s CH_3$ où r et s sont indépendamment un entier de 0 à 15, pourvu que la somme r + s ne soit pas supérieure à 15 ou inférieure à 2.

Des exemples de radicaux alcényle en C_5-C_{18} que l'on préfère pour R^6 pour les besoins de cette invention sont :

- (a) $-(CH_2)_t-CH=CH-(CH_2)_{n'}-CH_3$ où t est un entier de 1 à 15 et n' est un entier de 0 à 15, pourvu que t + n' ne soit pas supérieur à 15 ou ne soit pas inférieur à 2 ;
- (b) $-(CH_2)_v-CH=CH-(CH_2)_y-CH=CH-(CH_2)_z-CH_3$ où v et z sont indépendamment un entier de 0 à 12 et y est un entier de 0 à 13 pourvu que v + y + z ne soit pas supérieur à 13.

Des exemples de radicaux alkylène en C_1-C_{10} , qui sont les groupements W préférés pour les besoins de cette invention sont :

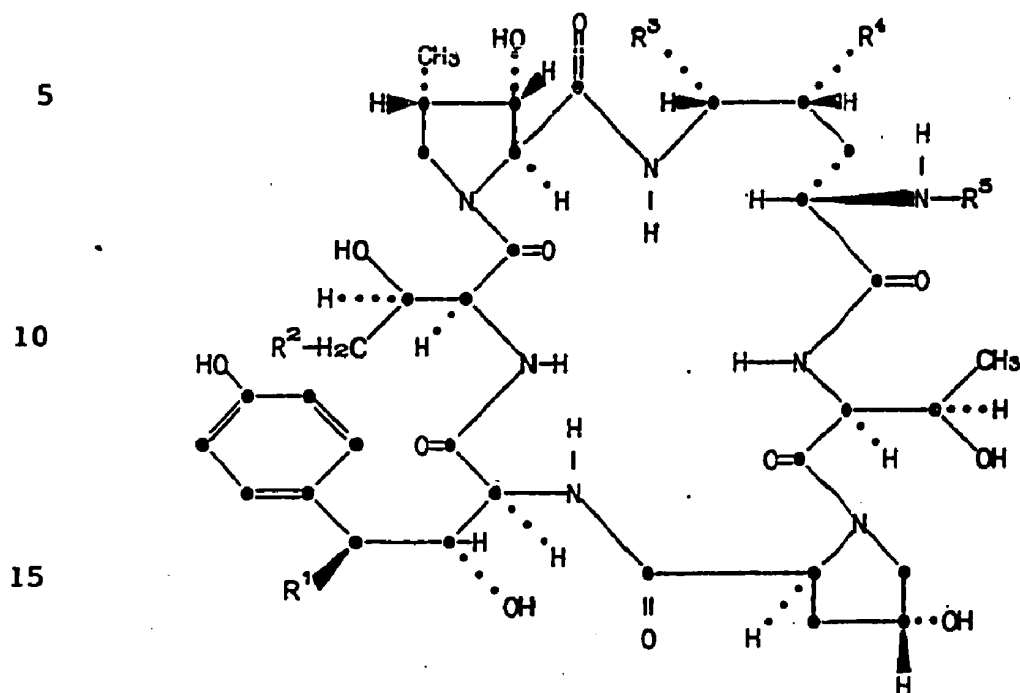
- (a) $-(CH_2)_{n''}-$ où n'' est un entier de 1 à 10 ;
- (b) les groupements méthylène et éthylène ; et
- (c) $-(CH_2)_r-CH(CH_3)(CH_2)_{s'}-$ où r' et s' sont indépendamment des entiers de 0 à 8 pourvu que r' + s' ne soit pas supérieur à 8 ou ne soit pas inférieur à 1.

Des exemples de radicaux alcénylène en C_2-C_{10} qui sont des groupements W préférés pour les besoins de cette invention, sont :

- (a) $-(CH_2)_{t'}-CH=CH-(CH_2)_{v'}-$ où t' et v' sont indépendamment des entiers de 0 à 8, pourvu que t' + v' ne soit pas supérieur à 8 ;
- (b) $-(CH_2)_{x'}-CH=CH-(CH_2)_{y'}-CH=CH-(CH_2)_{z'}-$ où x' et z' sont indépendamment des entiers de 0 à 5 et y' est un entier de 1 à 5, pourvu que x' + y' + z' ne puisse pas être supérieur à 10.

L'invention fournit en particulier un composé de

formule :



dans laquelle R^1 est H ou OH et

20 quand R^1 est H, R^2 est H et R^3 et R^4 sont tous deux H ou tous deux OH,

et

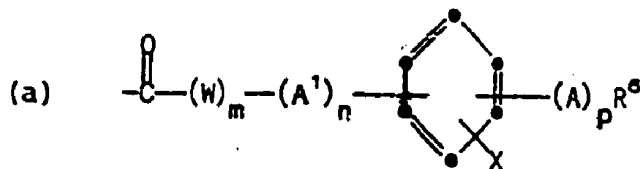
quand R^1 est OH, R^2 est H, R^3 est OH ou un groupement alkyloxy en C_1-C_6 et R^4 est OH, ou

25 bien R^2 est $-CO-NH_2$ et R^3 et R^4 sont tous deux OH,

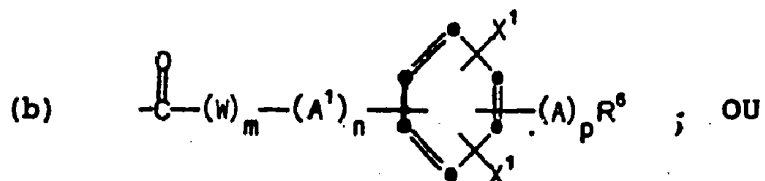
et

R^5 est un groupement de formule :

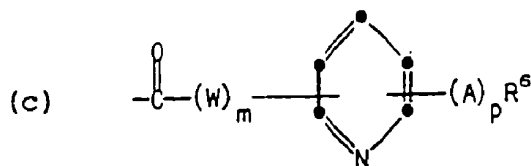
30



35



MC



5

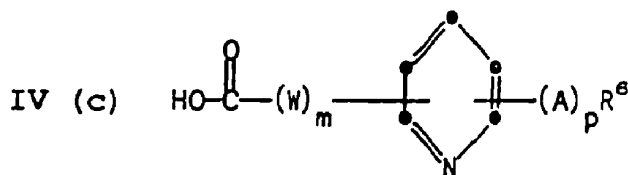
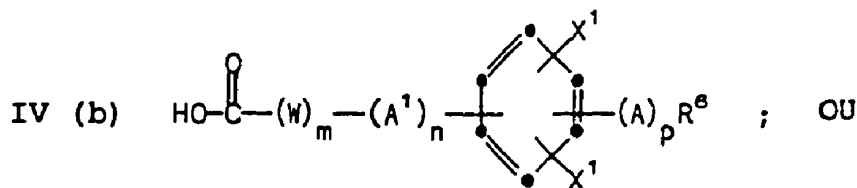
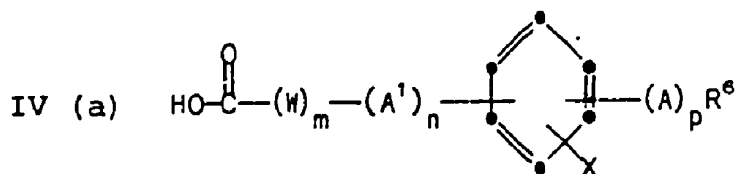
où A est un radical divalent oxygène, soufre, sulfinyle ou
 sulfonyle ; A¹ est un radical divalent oxygène, soufre,
 sulfinyle, sulfonyle ou -NH- ; X est un atome d'hydrogène ou
 un radical chloro, bromo, iodo, nitro, alkyle en C₁-C₃,
 10 hydroxy, alcoxy en C₁-C₃, mercapto, alkylthio en C₁-C₃,
 carbamyle ou alkylcarbamyle en C₁-C₃ ; X¹ est un atome de
 chlore, de brome ou d'iode ; R⁶ est un atome d'hydrogène ou
 un groupement alkyle en C₁-C₁₈ ou alcényle en C₂-C₁₈ ; W est
 un groupement alkylène en C₁-C₁₀ ou alcénylène en C₂-C₁₀ ;
 15 m, n et p sont 0 ou 1 mais si m = 0, n doit être égal à
 zéro ; pourvu : que la somme des atomes de carbone dans les
 groupements R⁶ et W soit supérieure à 4 mais ne puisse
 dépasser 21 ; que, quand X est un groupement mercapto, A et
 A¹ ne puissent pas être des groupements sulfinyle ou
 20 sulfonyle ; et que, quand A et A¹ sont des groupements
 sulfinyle ou sulfonyle, ils soient dans des états d'oxydation
 égaux.

Les composés de formule III inhibent la croissance
 des champignons pathogènes comme le montrent les modes
 25 opératoires d'essai biologique classiques. Les composés
 sont donc utilisables pour lutter contre la croissance des
 champignons sur les surfaces environnementales (en tant
 qu'antiseptiques) ou dans le traitement des infections
 provoquées par des champignons. L'activité antifongique des
 30 composés a été démontrée vis-à-vis de Candida albicans in
vitro dans des essais de diffusion de disque sur plaque de
 gélose ou des essais de diffusion sur tube de gélose, ou
 dans des essais in vivo chez des souris infectées par C.
albicans. Les composés sont donc particulièrement utilisables
 35 pour le traitement d'infections provoquées par des souches
 de C. albicans (candidose). Les composés de formule III ont
 également présenté une activité in vitro dans des essais de
 diffusion de disque sur plaque de gélose vis-à-vis de

Tricophyton mentagrophytes, un organisme dermatophyte. On a également trouvé une activité dans les essais de diffusion de disque sur plaque de gélose in vitro vis-à-vis de Saccharomyces pastorianus et de Neurospora crassa. Certains composés (comme indiqué dans l'Exemple 24, Tableau 11) donnent des taux significatifs dans le sang après administration par voie orale chez les souris.

Quand on l'administre à un chien par administration intraveineuse à raison de 100 mg/kg par jour pendant cinq jours, le composé de formule III où R^5 est un groupement p-(n-octyloxy)benzoyle, ne présente aucun signe extérieur de toxicité, bien que l'on observe des taux accrus en transaminase glutamo-pyruvique sérique.

On prépare les composés de formule III en acylant un noyau approprié sur le groupement α -amino de l'ornithine avec la chaîne latérale appropriée, en utilisant les procédés classiques dans le domaine pour la formation d'une liaison amide. L'acylation est généralement effectuée en faisant réagir le noyau avec un dérivé activé du composé substitué de formule IV (a), (b) ou (c), correspondant au groupement chaîne latérale acyle désiré (R^5).



(A, A¹, W, m, n, p et R⁶ sont tels que définis précédemment).

Par l'expression "dérivé activé", on désigne un dérivé qui rend la fonction carboxy de l'agent d'acylation réactive à la copulation avec le groupement amino primaire pour former la liaison amide qui lie la chaîne latérale au noyau. Des dérivés activés appropriés, leurs procédés de préparation et leurs procédés d'utilisation comme agents d'acylation d'une amine primaire sont connus de l'homme de l'art. Les dérivés activés préférés sont : (a) un halogénure d'acide (par exemple un chlorure d'acide), (b) un anhydride d'acide (par exemple un anhydride d'acide alcoxyformique ou un anhydride d'acide aryloxyformique) ou (c) un ester activé (par exemple un ester 2,4,5-trichlorophénylique, un ester de N-hydroxybenzotriazole ou un ester de N-hydroxy-succinimide). D'autres procédés d'activation de la fonction carboxy comprennent la réaction de l'acide carboxylique avec un carbonyldiimide (par exemple le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide ou le N,N'-diisopropylcarbodiimide) pour donner un intermédiaire réactif qui, en raison de son instabilité, n'est pas isolé, la réaction avec l'amine primaire étant alors effectuée in situ.

Un procédé préféré de préparation des composés de formule III est le procédé par l'ester actif. On préfère nettement l'utilisation de l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide correspondant à la chaîne latérale désirée (formule IV) comme agent d'acylation. Dans ce procédé, on fait réagir un excès de l'ester actif avec le noyau à la température ambiante dans un solvant organique non réactif comme le diméthylformamide (DMF). La durée de la réaction n'est pas déterminante, bien que l'on préfère une durée d'environ 24 à environ 120 heures. A la fin de la réaction, on enlève le solvant et on purifie le résidu par chromatographie, par exemple sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol, ou par chromatographie liquide sous pression élevée (CLPE) à phase inversée en utilisant une résine à phase inversée de gel de silice/C₁₈ comme phase fixe et un mélange d'eau, de méthanol et d'acétonitrile comme mélange solvant.

On prépare commodément les esters 2,4,5-trichloro-phényliques en traitant l'acide constituant la chaîne latérale (formule IV) par le 2,4,5-trichlorophénol en présence d'un agent de copulation, comme le N,N'-dicyclohexylcarbo-
5 diimide. D'autres procédés de préparation des esters actifs apparaîtront à l'homme de l'art.

Les acides substitués de formule IV et leurs dérivés activés sont des composés connus ou bien peuvent être préparés à partir de composés connus par des procédés
10 connus dans le domaine. Les acides benzoïques, phénylalkyl-carboxyliques, phénylalcénylcarboxyliques, phénoxyalkyl-carboxyliques, phénoxyalcénylcarboxyliques, phénylthioalkyl-carboxyliques, phénylthioalcénylcarboxyliques, phényl-sulfinylalkylcarboxyliques, phénylsulfinylalcénylcarboxyliques,
15 phénylsulfonylalkylcarboxyliques, phénylsulfonylalcényl-carboxyliques, pyridinylcarboxyliques, pyridinylalkyl-carboxyliques et pyridinylalcénylcarboxyliques de formule IV sont préparés par des modes opératoires similaires. Pour illustrer ces modes opératoires, on donne une description de
20 la préparation du sous-groupe des acides benzoïques.

Les acides alcoxybenzoïques ou alcényloxy-benzoïques peuvent être commodément préparés à partir d'un acide hydroxybenzoïque approprié en faisant réagir un halogénure d'alkyle ou d'alcényle approprié avec le sel
25 disodique de l'acide hydroxybenzoïque approprié. Les acides (alkylthio)benzoïques ou (alcénylthio)benzoïques peuvent être préparés commodément par traitement du diméthylthiocarbamate de S-(4-carbométhoxyphényle) substitué de façon appropriée de formule générale $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{XS}(\text{CO})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ par l'hydroxyde
30 de sodium aqueux à 65-85 %, puis addition du bromure d'alkyle ou d'alcényle approprié et poursuite du chauffage pendant 2 à 4 heures. On peut préparer les diméthylthiocarbamates de S-(4-carbométhoxyphényle) à partir des acides hydroxybenzoïques appropriés par le procédé de M. Newman et H.
35 Kanes, J. Org. Chem., 31, 3980 (1966).

Quand on désire préparer un composé de formule III où A est un groupement sulfinyle ou sulfonyle, on peut utiliser pour l'acylation du noyau le dérivé sulfoxyde ou

Mc

sulfone approprié de l'acide (alcénylthio)- ou (alkylthio)-benzoïque (formule IV). Les sulfoxydes ou sulfones appropriés peuvent être préparés par oxydation du thioéther correspondant, en utilisant des agents d'oxydation classiques, comme
5 l'acide m-chloroperbenzoïque, l'hypochlorite de t-butyle, le métaperiodate de sodium ou le peroxyde d'hydrogène. Si une double liaison est présente dans le thioéther, il faut utiliser des conditions très modérées pour éviter l'époxydation. Si l'on utilise des quantités équimolaires
10 des réactifs, le produit est un sulfoxyde (A est un groupement sulfinyle) que l'on oxyde facilement en sulfone (A est un groupement sulfonyle) par une mole supplémentaire d'agent d'oxydation. Les acides hydroxybenzoïques et leurs dérivés substitués utilisés comme substances de départ dans
15 les procédés décrits ici sont des composés connus ou bien ils peuvent être préparés par des procédés classiques connus dans le domaine.

Quand ils sont utilisés de façon systémique, la dose des composés de formule III variera selon le composé
20 particulier que l'on utilise, la sévérité et la nature de l'infection et l'état physique du sujet que l'on traite. La thérapeutique doit être amorcée à de faibles doses, la dose étant augmentée jusqu'à ce que l'on obtienne l'effet antifongique désiré. Les composés peuvent être administrés
25 par voie intraveineuse ou intramusculaire par injection sous la forme d'une solution ou suspension aqueuse stérile à laquelle on peut ajouter, si on le désire, divers agents classiques pharmaceutiquement acceptables comme des agents de conservation, des tampons, des agents de solubilisation
30 ou des agents de mise en suspension. D'autres additifs, comme du sel ou du glucose, peuvent être ajoutés pour rendre les solutions isotoniques. Les proportions et la nature de ces additifs seront évidentes pour l'homme de l'art.

Certains composés de formule III donnent des taux
35 dans le sang significatifs après administration orale (voir l'Exemple 24, Tableau 11) et peuvent être administrés de façon systémique par voie orale. Pour l'utilisation par voie orale, de tels composés peuvent être administrés en

combinaison avec des supports ou excipients pharmaceutiquement acceptables, sous forme de capsules, comprimés ou poudres. La nature et la proportion de ces supports ou excipients sont bien connues de l'homme de l'art.

- 5 Quand on les utilise pour traiter des infections vaginales dues à Candida, les composés de formule III peuvent être administrés en combinaison avec des excipients classiques pharmaceutiquement acceptables convenant pour l'utilisation intravaginale. Les compositions conçues pour
- 10 l'administration intravaginale sont connues de l'homme de l'art.

La préparation et l'utilisation des composés de la présente invention sont illustrées dans les exemples suivants :

Préparation 1

Fermentation d'Actinoplanes utahensis NRRL 12052

- 5 On prépare une culture mère d'Actinoplanes utahensis NRRL 12052 et on l'entretient sur une culture inclinée de gélose. Le milieu utilisé pour préparer la culture inclinée est choisi parmi l'un des suivants :

Milieu A

10	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
	Farine d'avoine pour bébé	60,0 g
	Levure	2,5 g
	K_2HPO_4	1,0 g
	Solution minérale de Czapek *	5,0 ml
15	Gélose	25,0 g
	Eau désionisée	q.s.p. 1 litre

le pH avant passage à l'autoclave est environ 5,9 ; on ajuste le pH à 7,2 par addition de NaOH ; après passage à l'autoclave, le pH est d'environ 6,7.

- 20 * La solution minérale de Czapek a la composition suivante :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (dissous dans 2 ml d'HCl concentré)	2 g
	KCl	100 g
25	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100 g
	Eau désionisée	q.s.p. 1 litre

Milieu B

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
	Dextrine de pomme de terre	5,0 g
30	Extrait de levure	0,5 g
	Hydrolysate enzymatique de caséine *	3,0 g
	Extrait de boeuf	0,5 g
	Dextrose	12,5 g
	Amidon de maïs	5,0 g
35	Peptone de viande	5,0 g
	Mélasse noire	2,5 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
	$CaCO_3$	1,0 g



- Solution minérale de Czapek 2,0 ml
 Gélose 20,0 g
 Eau désionisée q.s.p. 1 litre
 * N-Z-Amine A, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, New
 5 Jersey, U.S.A.

On inocule la culture inclinée avec Actinoplanes
utahensis NRRL 12052, et on fait incuber la culture inoculée
 à 30°C pendant environ 8 à 10 jours. On utilise à peu près
 la moitié de la culture pour inoculer 50 ml d'un milieu
 10 végétatif ayant la composition suivante :

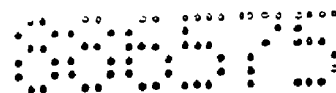
Ingrédient	Quantité
Farine d'avoine pour bébé	20,0 g
Saccharose	20,0 g
Levure	2,5 g
15 Grains séchés de distillation*	5,0 g
K_2HPO_4	1,0 g
Solution minérale de Czapek	5,0 ml
Eau désionisée	q.s.p. 1 litre

ajuster à pH 7,4 avec NaOH ; après passage à l'autoclave, le
 20 pH est d'environ 6,8.

* National Distillers Products Co., 99 Park Ave., New York,
 New York, U.S.A.

On fait incuber le milieu végétatif inoculé dans
 un flacon Erlenmeyer de 250 ml à large encolure à 30°C
 25 pendant environ 72 heures sur un agitateur tournant sur un
 arc de 5 cm de diamètre à 250 tours par minute.

On peut utiliser ce milieu végétatif incubé
 directement pour inoculer un milieu végétatif de second stade.
 Ou bien et de préférence, on peut le conserver pour un usage
 30 ultérieur en maintenant la culture dans la phase vapeur de
 l'azote liquide. On prépare la culture pour une telle
 conservation dans de nombreuses petites ampoules comme suit :
 dans chaque ampoule, on place 2 ml de milieu végétatif incubé
 et 2 ml d'une solution de glycérol et de lactose [voir W.A.
 35 Dailey et C.E. Higgins, "Preservation and Storage of Micro-
 organisms in the Gas Phase of Liquid Nitrogen, Cryobiol 10,
 364-367 (1973) pour les détails]. Les suspensions ainsi
 préparées sont conservées dans la phase vapeur de l'azote



liquide.

On utilise une suspension conservée (1 ml) ainsi préparée pour inoculer 50 ml d'un milieu végétatif de premier stade (ayant la composition décrite ci-avant). On fait incuber comme décrit précédemment le milieu végétatif de premier stade inoculé.

Pour obtenir un plus grand volume d'inoculum, on utilise 10 ml du milieu végétatif de premier stade incubé pour inoculer 400 ml d'un milieu végétatif de second stade ayant la même composition que le milieu végétatif de premier stade. On fait incuber le milieu de second stade dans un flacon Erlenmeyer de 2 litres à large encolure à 30°C pendant environ 48 heures sur un agitateur tournant d'un arc de 5 cm de diamètre à 250 tours par minute.

On utilise le milieu végétatif de second stade incubé (800 ml), préparé comme décrit ci-dessus, pour inoculer 100 l d'un milieu de production stérile choisi parmi l'un des suivants :

Milieu I

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité (g/l)</u>
20	Farine d'arachide	10,0
	Peptone de viande soluble	5,0
	Saccharose	20,0
	KH_2PO_4	0,5
25	K_2HPO_4	1,2
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
	Eau du robinet	q.s.p. 1 litre

Le pH du milieu est environ 6,9 après stérilisation par passage à l'autoclave à 121°C pendant 45 minutes sous une pression d'environ 1,1 à 1,24 bar.

Milieu II

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité (g/l)</u>
	Saccharose	30,0
	Peptone	5,0
35	K_2HPO_4	1,0
	KCl	0,5
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002

nc

000000

Eau désionisée

q.s.p. 1 litre

On ajuste le pH à 7,0 avec HCl ; après passage à l'autoclave, le pH est d'environ 7,0.

Milieu III

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité (g/l)</u>
5	Glucose	20,0
	NH ₄ Cl	3,0
	Na ₂ SO ₄	2,0
	ZnCl ₂	0,019
10	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,304
	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,062
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,035
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,005
	CaCO ₃	6,0
15	KH ₂ PO ₄ "	0,67
	Eau du robinet	q.s.p. 1 litre

" Stérilisé séparément et ajouté de façon aseptique

Le pH final est d'environ 6,6.

On laisse le milieu de production inoculé fermenter dans une cuve de fermentation de 165 l à une température d'environ 30°C pendant environ 42 heures. On agite le milieu de fermentation avec des agitateurs classiques à environ 200 tours par minute et on l'aère avec de l'air stérile pour maintenir le taux d'oxygène dissous supérieur à 30 % à la saturation par l'air à la pression atmosphérique.

Préparation 2Préparation du mélange antibiotique A-42355A. Fermentation en flacon agité

On prépare une culture d'Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440 et on la maintient sur une gélose inclinée de 18 x 150 ml, préparée avec un milieu ayant la composition suivante :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
	Glucose	5 g
35	Extrait de levure	2 g
	CaCO ₃	3 g
	Jus de légumes "	200 ml
	Gélose "	20 g

MC

Eau désionisée

q.s.p. 1 litre

(pH initial 6,1)

* Jus V-8, Campbell Soup Co., Camden, N.J., U.S.A.

*** Meer Corp.

5 La culture inclinée est inoculée avec Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440 puis on fait incuber la culture à 25°C pendant environ sept jours. On recouvre d'eau la culture inclinée mûre et on la gratte avec une anse stérile pour libérer les spores. La suspension résultante est
10 ensuite mise en suspension dans 10 ml d'eau désionisée stérile.

On utilise 1 ml de la culture inclinée en suspension pour inoculer 55 ml de milieu végétatif dans un flacon de 250 ml. Le milieu végétatif a la composition suivante :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
15	Saccharose	25 g
	Mélasse noire	36 g
	Liqueur de macération de maïs	6 g
	Extrait de malt	10 g
	K ₂ HPO ₄	2 g
20	Hydrolysate enzymatique de caséine *	10 g
	Eau du robinet	1100 ml

(pH initial 6,5-6,7)

* N-2-Case, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N.J., U.S.A.

25 On fait incuber le milieu végétatif inoculé à 25°C pendant 48 heures, à 250 tours par minute, sur un agitateur de type rotatif. Après 24 heures, on homogénéise le milieu pendant une minute à faible vitesse dans un mélangeur (de type Waring), puis on le fait incuber à nouveau pendant
30 les 24 heures restantes. Ou bien, on peut faire incuber le milieu végétatif inoculé pendant 48 heures puis l'homogénéiser pendant 15 secondes à faible vitesse.

Ce milieu végétatif incubé peut être utilisé pour inoculer un milieu de culture de fermentation en flacon agité
35 ou pour inoculer un milieu végétatif de second stade. On peut également le conserver pour une utilisation ultérieure, en maintenant la culture dans la phase vapeur de l'azote liquide. On prépare la culture pour cette conservation dans

de nombreuses petites ampoules, comme suit :

On mélange les cultures végétatives volume/volume avec une solution de suspension ayant la composition suivante :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
5	Glycérol	20 ml
	Lactose	10 g
	Eau désionisée	q.s.p. 100 ml

On répartit les suspensions préparées dans de petits tubes stériles à bouchon vissé (4 ml par tube). On conserve ces tubes dans la phase vapeur de l'azote liquide.

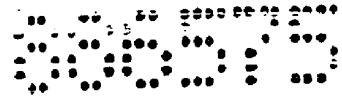
On peut utiliser une suspension conservée ainsi préparée pour inoculer des cultures inclinées ou des milieux d'ensemencement liquides. On fait incubé les cultures inclinées à 25°C à la lumière pendant 7 jours.

15 B. Fermentation en réservoir

Pour obtenir un plus grand volume d'inoculum, on utilise 10 ml de la culture végétative de premier stade incubé pour inoculer 400 ml d'un milieu de croissance végétatif de second stade ayant la même composition que celui du milieu végétatif. Le milieu de second stade est incubé dans un flacon Erlenmeyer à large ouverture de deux litres, à 25°C pendant 24 heures, sur un agitateur tournant d'un arc de 5 cm de diamètre à 250 tours par minute.

Le milieu de second stade incubé (800 ml), préparé comme décrit ci-dessus, est utilisé pour inoculer 100 litres d'un milieu de production stérile choisi parmi l'un des suivants :

<u>Milieu IV</u>		
	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
30	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,00455 g/l
	Peptone de viande soluble [®]	30,5 g/l
	Farine de soja	15,5 g/l
	Dextrine de tapioca ^{***}	2,0 g/l
	Mélasse noire	10,5 g/l
35	Hydrolysats enzymatique de caséine ^{*****}	8,5 g/l
	Na ₂ HPO ₄	4,5 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,5 g/l



FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g/l
Huile de coton	40,0 ml
Antimoussant*****	1,0 ml
Eau du robinet	1000,0 ml

5 (pH initial 6,8-7,0)

- :: Peptone, Amber Laboratories, Juneau Wisconsin, U.S.A.
- ::: Stadex 11, A.E. Staley Co., Decatur, Illinois, U.S.A.
- ::: N-Z-Amine A, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N.J. U.S.A.
- ::: P2000, Dow Corning, Midland, Michigan, U.S.A.

10

Milieu V

<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
Glucose	2,5 %
Amidon	1,0 %
Peptone de viande soluble*	1,0 %
Mélasse noire	1,0 %
CaCO ₃	0,2 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 %
Hydrolysate enzymatique de caséine**	0,4 %
20 Antimoussant*****	0,02 %
Eau du robinet	q.s.p. volume
:: O.M. Peptone	
::: N-Z-Amine A	
::: Antifoam "A", Dow Corning	

25 On laisse le milieu de production inoculé fermenter dans un réservoir de fermentation de 165 l à une température de 25°C pendant 7 jours. On aère le milieu de fermentation avec de l'air stérile, en maintenant le niveau d'oxygène dissous supérieur à environ 50 % de la saturation en air.

30 C. Milieu végétatif de troisième stade

Si l'on effectue la fermentation dans des réservoirs plus grands que ceux utilisés pour la fermentation par 100 litres, il est recommandé d'utiliser une culture végétative de troisième stade pour ensemer le réservoir plus grand. Un milieu végétatif de troisième stade préféré a la composition suivante :

<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
Saccharose	25 g

MC

	Mélasses noire	25 g
	Liquueur de macération de maïs	6 g
	Hydrolysats enzymatique de caséine	10 g
	Extrait de malt	10 g
5	K ₂ HPO ₄	2 g
	Eau du robinet	1000 ml
	(pH initial 6,1)	
	⋆ N-Z-Case	

Préparation 3

10

Séparation du mélange antibiotique A-42355

On agite soigneusement le bouillon de fermentation entier (4127 litres), obtenu par le procédé décrit dans l'Exemple 1 en utilisant le milieu de production II, avec 15 4280 litres de méthanol pendant une heure, puis on filtre, en utilisant un adjuvant de filtration (Hyflo Supercel, une terre de diatomées, Johns-Manville Products Corp.). On ajuste le pH du filtrat à 4,0 par addition d'HCl 5 N. On extrait le filtrat acidifié deux fois avec des volumes égaux de 20 chloroforme. On réunit les extraits chloroformiques et on les concentre sous vide jusqu'à un volume de 20 litres. On ajoute ce concentré à 200 litres d'éther diéthylique pour faire précipiter le mélange A-42355. On sépare le précipité par filtration et l'on obtient 2775 g du mélange A-42355 sous 25 forme d'une poudre blanc gris.

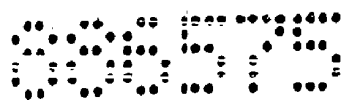
Séparation et identification des facteurs de A-30912

Préparation 4

Séparation du facteur A de A-30912

On dissout 1 g du mélange antibiotique A-42355, 30 préparé comme décrit dans les Préparations 2 et 3, dans 7 ml d'un mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile. On filtre cette solution et on l'introduit dans une colonne en verre de 3,7 cm de diamètre intérieur et de 35 cm de longueur [Colonne de Chromatographie CLFPC " (chromatographie liquide 35 sous faible pression de caractéristiques élevées) Michel-Miller, Ace Glass Incorporated, Vineland, NJ 08360] garnie de résine à phase inverse de gel de silice LP-1/C₁₈ (10-20 microns), qui a été préparée comme décrit dans la Préparation

nc



- 10, par l'intermédiaire d'une boucle à l'aide d'un système à vannes. La colonne est garnie dans le système 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile, à l'aide du mode opératoire de garnissage en suspension décrit dans la Préparation 11.
- 5 Une pompe F.M.I. avec une conception de piston sans vannes (débit maximal 19,5 ml/minute) est utilisée pour déplacer le solvant dans la colonne à un débit de 9 ml/minute à 7 bars, des fractions étant recueillies toutes les minutes. L'élution de l'antibiotique est contrôlée à 280 nm en utilisant un
- 10 appareil de contrôle UV (ISCO Model UA-5, Instrument Specialist Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska 68504) équipé d'une unité optique (ISCO Type 6).

Préparation 5

Séparation du facteur B de A-30912

- 15 On sépare le mélange A-42355 comme décrit dans la Préparation 3, mais on chromatographie les extraits chloroformiques concentrés (285 l) sur une colonne de gel de silice (150 l de gel de silice Grace, qualité 62) à un débit de 2 l/minute. On lave la colonne avec 200 litres de
- 20 chloroforme, on l'élue avec 500 litres d'acétonitrile, puis on l'élue continuellement avec un mélange 98:2 d'acétonitrile et d'eau à un débit de 1 l/minute. On recueille des fractions ayant un volume de 200 litres et on les analyse séparément pour déterminer leur activité biologique. L'analyse
- 25 biologique est effectuée par une analyse sur disque de papier sur plaque de gélose,ensemencée par Candida albicans. On réunit les fractions 77 à 103 (1365 litres) et on les concentre sous vide. La solution concentrée (4,5 litres) contient un précipité qu'on enlève par filtration et l'on
- 30 obtient 119 g de mélange A-42355 enrichi en facteur B. On concentre le filtrat à siccité. On redissout le résidu obtenu dans un volume approprié de méthanol. On ajoute la solution méthanolique à 10 volumes d'éther diéthylique pour faire précipiter le complexe antibiotique contenant le facteur B.
- 35 On sépare également ce précipité par filtration et on le sèche, et l'on obtient 24 g supplémentaires de mélange A-42355 enrichi de facteur B sous forme d'une poudre grise.

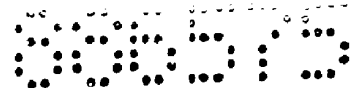
Le mélange A-42355 enrichi en facteur B ainsi obtenu

- (1,0 g) est dissous dans 8 ml d'un mélange de 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile. On filtre cette solution et on l'introduit sur une colonne de gel de silice (Colonne Michel-Muller de 3,7 cm de diamètre intérieur x 33 cm) par l'intermédiaire d'une boucle à l'aide d'un système à vannes. La colonne est garnie d'une résine à phase inversée de gel de silice LP-1/C₁₈ (10-20 microns) préparée comme décrit dans la Préparation 10, à l'aide du mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile, comme décrit dans la Préparation 11.
- 10 Le solvant se déplace dans la colonne à un débit de 10 ml/minute à environ 7 bars, en utilisant une pompe FMI à piston sans vannes. On recueille une fraction toutes les minutes. On contrôle l'élution de l'antibiotique à 280 nm comme dans la Préparation 15. On réunit les fractions 102-110 et on les concentre sous vide pour obtenir une huile. On dissout l'huile dans un petit volume de t-butanol et on la lyophilise, ce qui donne 22 mg du facteur B de A-30912.

Préparation 6

Isolement du facteur D de A-30912

- 20 On réunit et on chromatographie sur une colonne de gel de silice (Grace, qualité 62) les extraits chloroformiques concentrés de deux essais de fermentation (3800 l et 4007 l) obtenus par le procédé décrit dans la Préparation 3. On lave la colonne avec du chloroforme puis on élue avec de l'acéto-
- 25 nitrile et un mélange 98:2 d'acétonitrile et d'eau. On recueille des fractions ayant un volume d'environ 200 l et on les soumet à une analyse biologique sur disque de papier sur gélose ensemencée avec Candida albicans. On réunit les fractions actives (850 l) et on les concentre sous vide. On ajoute la
- 30 solution concentrée (0,7 l) à 10 volumes d'éther diéthylique pour faire précipiter le mélange A-42355 enrichi en facteur D. On enlève ce précipité par filtration et on le sèche, ce qui donne 32 g de mélange A-42355 enrichi en facteur D sous forme d'une poudre grise.
- 35 On dissout le mélange A-42355 enrichi en facteur D ainsi obtenu (1,0 g) dans 5 ml d'un mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile. On filtre cette solution et on l'introduit sur une colonne de gel de silice (colonne Michel-

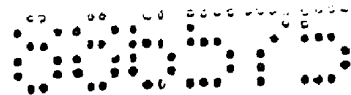


Miller, 3,7 cm de diamètre intérieur x 30 cm) par
l'intermédiaire d'une boucle à l'aide d'un système à vannes.
La colonne a été garnie de résine à phase inversée de gel de
silice LP-1/C₁₈ (10-20 microns) préparée comme décrit dans la
Préparation 10. Le garnissage a été effectué dans un mélange
7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile, selon le mode
opératoire de garnissage de la Préparation 11. Le solvant se
déplace dans la colonne à un débit de 8 ml/minute à environ
3,1 bars, en utilisant une pompe FMI à conception de piston
sans vannes. On recueille une fraction toutes les 2 minutes.
L'élution de l'antibiotique est contrôlée à 280 nm comme
décrit dans la Préparation 4. On réunit les fractions 96-108
et on les concentre sous vide pour obtenir une huile. On
dissout cette huile dans un petit volume de t-butanol et on
lyophilise pour obtenir 89 mg du facteur D de A-30912.

Préparation 7

Séparation du facteur H de A-30912

On dissout 5,0 g du mélange antibiotique A-42355,
préparé comme décrit dans les Préparations 2 et 3, dans 35 ml
du mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile, on
filtre la solution résultante et on l'introduit sur une
colonne de verre de 3,7 cm de diamètre intérieur x 42 cm
(colonne Michel-Miller) par l'intermédiaire d'une boucle à
l'aide d'un système de vannes. La colonne est garnie de
résine à phase inversée de gel de silice LP-1/C₁₈ (10-20
microns) (Préparation 10) dans un mélange 7:2:1 de méthanol,
d'eau et d'acétonitrile comme décrit dans la Préparation 11.
Le solvant se déplace dans la colonne à un débit de 13 ml/
minute à environ 8,3 bars, en utilisant une pompe FMI à
conception de piston sans vannes, et l'on recueille une
fraction toutes les deux minutes. On contrôle l'élution de
l'antibiotique à 280 nm comme décrit dans la Préparation 19,
paragraphe C. On réunit les fractions 112-132 avec les
fractions 106-117 d'une seconde purification similaire. Les
fractions réunies sont concentrées sous vide jusqu'à une
huile. On dissout l'huile dans un petit volume de t-butanol
et on lyophilise pour obtenir 173 mg du facteur H brut de
A-30912.



On dissout le facteur H brut de A-30912 (150 mg) dans 8 ml d'un mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile ; on filtre la solution résultante et on la réintroduit sur une colonne de verre de 2,0 cm de diamètre intérieur x 32 cm, comme décrit ci-dessus. Le solvant se déplace dans la colonne à un débit de 8 ml/minute à environ 5,5 bars, et on recueille une fraction toutes les 3 minutes. On contrôle l'élution de l'antibiotique à 280 nm. On réunit les fractions 17 et 18 et on les concentre sous vide pour obtenir une huile. On dissout l'huile dans un petit volume de t-butanol et on lyophilise pour obtenir 29 mg du facteur H de A-30912.

Identification des facteurs de A-30912

Les différents facteurs de A-30912 peuvent être identifiés par chromatographie sur couche mince (CCM). Les R_f des facteurs A à G de A-30912, en utilisant la CCM sur gel de silice (Merck, Darmstadt), un système solvant 7:3 de benzène et de méthanol et un bioautographe par Candida albicans sont indiqués dans le Tableau VII.

TABLEAU VII

	Facteur de A-30912	R_f
	A	0,35
	B	0,45
25	C	0,54
	D	0,59
	E	0,27
	F	0,18
	G	0,13

Les R_f approximatifs des facteurs A, B, C, D et H de A-30912 dans différents systèmes solvants, en utilisant une CCM sur gel de silice (plaques de gel de silice n° 60 de Merck Darmstadt, 20 x 20 cm) et un bioautographe par Candida albicans, sont donnés dans le Tableau VIII.

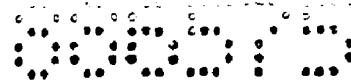


TABLEAU VIII

	<u>Facteur de A-30912</u>	<u>R_f - Systèmes solvants</u>			
		<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>
5	Facteur A	0,28	0,14	0,28	0,43
	Facteur B	0,39	0,21	0,42	0,47
	Facteur C	0,46	0,31	0,51	0,58
	Facteur D	0,50	0,38	0,57	0,61
	Facteur H	0,42	0,27	0,36	0,53
10	<u>Systèmes solvants</u>				
	<u>a</u> :	acétate d'éthyle:méthanol (3:2)			
	<u>b</u> :	acétate d'éthyle:méthanol (7:3)			
	<u>c</u> :	acétonitrile:eau (95:5)			
15	<u>d</u> :	acétate d'éthyle:éthanol:acide acétique (40:60:0,25)			
On peut également identifier les facteurs A, B, D et H de A-30912, par chromatographie liquide sous faible pression de caractéristiques élevées (CLPFCE) analytique, dans les conditions suivantes :					
20	Colonne	verre, 0,8 x 15,0 cm			
	Garnissage	Nucleosil 10-C ₁₈ (Machery Nagel and Company) ; garni en utilisant le mode opératoire de garnissage en suspension de la Préparation 11			
25	Solvant	Mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile			
	Volume de l'échantillon	8 µl			
30	Dimension de l'échantillon	8 µg			
	Température de la colonne	ambiante			
	Débit	1,8 ml/minute			
	Pression	environ 14 bars			
35	Détecteur	UV à 222 nm (ISCO Model 1800 Variable Wavelength UV-visible Absorbance Monitor)			
	Pompe	LDC Duplex Minipump			

Injection

injection sur boucle

Les durées de rétention approximatives pour les facteurs A, B, D et H de A-30912 dans ces conditions sont résumées dans le Tableau IX.

5

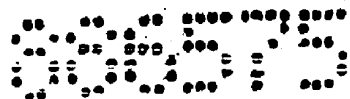
TABLEAU IX

<u>Facteur de A-30912</u>	<u>Temps de rétention (s)</u>
A	792
B	870
H	990
10 D	1.140

Préparation 8Préparation de l'antibiotique S31794/F-1

On produit l'antibiotique S31794/F-1 par culture en immersion d'Acrophialophora limonispota NRRL 8095, en 15 agitant, remuant et/ou aérant à pH 3-8, de préférence 5-7, et à 15-30°C, de préférence à 18-27°C, pendant 48 à 360 heures, de préférence pendant 120 à 288 heures.

On isole l'antibiotique S31794/F-1 par traitement du bouillon de culture (90 L) avec un mélange 4:1 (90 L) 20 d'acétate d'éthyle et d'isopropanol et en homogénéisant pendant 30 minutes à la température ambiante. On sépare la phase organique et on l'évapore sous vide à environ 40°C. On chromatographie le résidu ainsi obtenu sur environ dix fois sa quantité de gel de silice, en utilisant des mélanges de 25 chloroforme et de méthanol (95:5 à 60:40). On réunit les fractions qui ont une activité antifongique et on les chromatographie sur 100 fois leur quantité de "Sephadex LH-20" avec du méthanol. Les fractions provenant de la colonne de Sephadex et qui ont une activité antifongique sont 30 réunies et rechromatographiées sur 100 fois leur quantité de gel de silice (0,05-0,2 mm) avec un système solvant 71:25:4 de chloroforme, de méthanol et d'eau. Les fractions éluées qui ont une activité antifongique sont réunies et évaporées sous vide pour obtenir l'antibiotique brut 35 S31794/F-1. On dissout ce produit dans de petites quantités de méthanol et on le précipite avec de l'éther diéthylique pour obtenir S31794/F-1 sous forme d'une poudre amorphe blanche, p.f. 178-180°C (décomposition) après séchage sous



vide poussé à 25-30°C. La cristallisation dans dix fois son volume de mélange 80:12:8 d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau donne S31794/F-1 cristallisé, p.f. 181-183°C avec décomposition après séchage sous vide poussé à 20°C.

5

Préparation 9

Séparation de l'antibiotique S31794/F-1

On introduit l'antibiotique S31794/F-1 brut, obtenu comme décrit dans la Préparation 8 après chromatographie sur Sephadex, sur une colonne de gel de silice (colonne Michel-
10 Miller) par l'intermédiaire d'une boucle à l'aide d'un système à vannes. On utilise le mode opératoire de garnissage en suspension décrit dans la Préparation 11. On déplace le solvant dans la colonne en utilisant une pompe FMI avec une conception de piston sans vannes. On contrôle l'élution de
15 l'antibiotique en utilisant un appareil de contrôle UV à 280 nm comme dans la Préparation 22. On réunit les fractions ayant une activité antifongique et on les concentre sous vide pour obtenir l'antibiotique S31794/F-1.

S31794/F-1 a les R_f suivants par chromatographie
20 sur couche mince de gel de silice (Merck, 0,25 mm) :

	<u>Système solvant</u>	<u>R_f</u>
	Chloroforme:méthanol:eau (71:25:4)	0,17
25	Chloroforme:méthanol:acide acétique concentré (70:29:1)	0,19
	Chloroforme:méthanol (2:1)	0,27

S31794/F-1 peut également être détecté par de la vapeur d'iode.

Préparation 10

30 Préparation de la résine à phase inversée de gel de silice/

C₁₈

Etape 1 : Hydrolyse

On ajoute 1000 g de gel de silice LP-1 (Quantum Corp., maintenant Whatman) à un mélange de 1650 ml d'acide
35 sulfurique concentré et de 1650 ml d'acide nitrique concentré dans un ballon à fond rond de 5 l et on agite pour obtenir une suspension appropriée. On chauffe le mélange sur un bain de vapeur pendant une nuit (16 heures) avec un réfrigérant

nc

à refroidissement d'eau fixé sur le ballon.

On refroidit le mélange dans un bain de glace et on le filtre soigneusement en utilisant un entonnoir en verre fritté. On lave le gel de silice avec de l'eau désionisée jusqu'à pH neutre. Puis, on lave le gel de silice avec 4 l d'acétone et on le sèche sous vide à 100°C pendant deux jours.

Etape 2 : Première silylation

Le gel de silice sec de l'Etape 1 est transféré dans un ballon à fond rond et mis en suspension dans 3,5 l de toluène. On chauffe le ballon au bain de vapeur pendant deux heures pour chasser toute l'eau résiduelle par distillation azéotrope. On ajoute 321 ml d'octadécyltrichlorosilane (Aldrich Chemical Company), et on chauffe le mélange réactionnel à reflux pendant une nuit (16 heures) avec une lente agitation mécanique à 60°C. On prend soin d'éviter que l'agitateur ne soit trop près de la partie inférieure du ballon, pour éviter un broyage des particules de gel de silice.

On laisse le mélange refroidir. On recueille le gel de silice silanisé, on le lave avec 3 l de toluène et 3 l d'acétone, puis on le sèche à l'air pendant une nuit (16-20 heures). On met le gel de silice séché en suspension dans 3,5 l d'un mélange 1:1 d'acétonitrile et d'eau dans un ballon de 5 l, on agite soigneusement à la température ambiante pendant deux heures, on filtre, on lave avec 3 l d'acétone et on sèche à l'air pendant une nuit.

Etape 3 : Deuxième silylation

On répète le mode opératoire de la première silylation en utilisant 200 ml d'octadécyltrichlorosilane. On chauffe la suspension à reflux à 60°C pendant deux heures, tout en agitant soigneusement. On recueille le produit final par filtration, on lave avec 3 l de toluène et 6 l de méthanol, puis on le sèche sous vide à 50°C pendant une nuit (16-20 heures).

Préparation 11

Mode opératoire de garnissage en suspension pour les colonnes Michel-Miller

Renseignements généraux

On utilise ce mode opératoire pour garnir une colonne de résine à phase inversée de gel de silice/C₁₈ comme celle préparée par le procédé de la Préparation 10.

5 En général, une pression inférieure à 14 bars et des débits compris entre 5 et 40 ml/minute sont nécessaires pour cette technique de garnissage en suspension ; ceci dépend du volume et des dimensions de la colonne. La pression de garnissage doit être supérieure à la pression utilisée
10 pendant la séparation réelle de 2 à 3,5 bars ; ceci assure qu'il ne se produit pas de tassement ultérieur de l'adsorbant pendant les séparations.

Une diminution soudaine de la pression peut provoquer des craquelures ou des canaux dans le matériau de
15 garnissage, ce qui réduirait de façon importante l'efficacité de la colonne. Il est donc important de laisser la pression descendre lentement jusqu'à zéro chaque fois que l'on arrête la pompe.

Volume approximatif des colonnes (Colonnes en verre
20 de Acc. Catégorie No., non garnies) : 5795-04, 12 ml ; 5795-10, 110 ml ; 5795-16, 300 ml ; 5795-24, 635 ml ; et 5796-34, 34 ml.

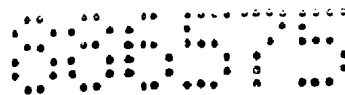
Le temps nécessaire pour garnir une colonne en verre peut varier de quelques minutes à quelques heures, selon la
25 dimension de la colonne et l'expérience de l'opérateur.

Etapcs :

1. Relier la colonne de verre à une colonne réservoir par un accouplement (le volume de la colonne réservoir doit être deux fois celui de la colonne). Placer les deux colonnes
30 verticalement avec la colonne réservoir au-dessus.
2. Peser le matériau de garnissage (100 g pour 200 ml de colonne).
3. Ajouter environ 5 volumes de solvant au matériau de garnissage ; utiliser un mélange de 70-80 % de méthanol et de 20-
35 30 % d'eau.
4. Bien agiter jusqu'à ce que toutes les particules soient mouillées, laisser reposer pendant une nuit ou plus longtemps pour assurer une imprégnation complète des particules par le

solvant. Décanter la liqueur surnageante.

5. Délayer la résine avec suffisamment de solvant pour remplir la colonne réservoir. Verser rapidement dans le réservoir. La colonne doit être préremplie avec le même solvant et la colonne réservoir doit être partiellement remplie du solvant avant de verser la suspension. L'utilisation de volumes de suspension plus grands peut également donner de bons résultats ; cependant, ceci nécessite (a) un réservoir plus grand ou (b) plusieurs remplissages du réservoir pendant l'opération de garnissage.
6. Fermer le réservoir avec le bouchon de Teflon en-dessous de la colonne (voir la Figure 1 du brevet des E.U.A. N° 4.131.547, bouchon N° 3) ; relier à la pompe ; et commencer immédiatement le pompage du solvant dans les dispositifs au débit maximum si l'on utilise une pompe Ace Cat. No. 13625-25, ou un système de distribution de solvant similaire (20 ml/minute).
7. Continuer jusqu'à ce que la colonne soit complètement remplie de l'adsorbant. La pression ne doit pas dépasser la tolérance maximale de la colonne pendant cette opération (14 bars pour les colonnes importantes et 21 bars pour les colonnes analytiques). Dans la plupart des cas, des pressions inférieures à 14 bars seront suffisantes.
8. Si la pression dépassait les valeurs maximales, réduire le débit et la pression diminuera.
9. Après remplissage de la colonne par l'adsorbant, arrêter la pompe ; laisser la pression tomber à zéro ; débrancher le réservoir ; remplacer le réservoir par une pré-colonne ; remplir la pré-colonne de solvant et d'une petite quantité d'adsorbant, et pomper à la pression maximale jusqu'à ce que la colonne soit complètement garnie. Pour une information supplémentaire, voir le mode opératoire général. Toujours laisser la pression descendre lentement après arrêt de la pompe ; ceci empêchera la formation de toutes craquelures ou canaux préférentiels dans le matériau de garnissage.
10. Supprimer la pression et débrancher soigneusement la pré-colonne. Avec une petite spatule, enlever quelques millimètres (2-4) de garnissage au sommet de la colonne ; placer 1 ou 2 filtres au sommet de la colonne ; appuyer



douceMENT jusqu'au sommet du matériau de garnissage, et placer un bouchon de Teflon au sommet de la colonne jusqu'à confirmation de l'étanchéité. Relier la colonne à la pompe, introduire la pression (généralement moins de 14 bars) et observer par la paroi de verre au sommet de la colonne si la résine se tasse davantage. Si le matériau de garnissage doit continuer à se déposer (ceci peut être le cas avec les colonnes de dimensions importantes), un certain espace mort apparaîtra ou bien, il se formera des canaux préférentiels et l'étape 9 doit être répétée.

Préparation 12

Préparation du noyau de A-30912A

A. Désacylation du facteur A de l'antibiotique A-30912

On effectue une fermentation de A. utahensis comme décrit dans la Préparation 1, en utilisant le milieu de culture inclinée A et le milieu de production I et en faisant incuber le milieu de production pendant environ 42 heures. On ajoute au milieu de fermentation une quantité de facteur A de A-30912 (340 g de substrat brut qui contient environ 19,7 g de facteur A de A-30912, dissous dans 1,5 l d'éthanol). On contrôle la désacylation du facteur A de A-30912 par titrage vis-à-vis de Candida albicans. On laisse la fermentation se poursuivre jusqu'à désacylation complète comme le montre la disparition de l'activité vis-à-vis de C. albicans.

B. Séparation du noyau de A-30912A

On filtre le bouillon de fermentation entier (100 litres), obtenu comme décrit dans le paragraphe A et contenant le noyau provenant d'environ 20 g de facteur A de A-30912. On rejette le gâteau mycélien. On fait passer le filtrat limpide ainsi obtenu (environ 93 l) sur une colonne contenant 4,5 l de résine HP (polymère très poreux DIAION, HP-Series, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokyo, Japon) à un débit de 200 ml/minute. On rejette l'effluent ainsi obtenu. Puis on lave la colonne avec jusqu'à huit volumes (volume de colonne) d'eau désionisée à pH 6,5-7,5 pour enlever le bouillon filtré résiduel. On rejette cette eau de lavage. Puis on élue la colonne avec une solution 7:3 d'eau et de

méthanol (85 l) à un débit de 200-300 ml/min.

On contrôle l'élution en utilisant le mode opératoire suivant : on prélève deux parties aliquotes de chaque fraction éluée. On concentre l'une de ces parties jusqu'à un petit volume et on la traite par un chlorure d'acide comme le chlorure de myristoyle. Ce produit et l'autre partie non traitée sont testés pour déterminer leur activité vis-à-vis de Candida albicans. Si la partie aliquote non traitée n'a pas d'activité et que la partie aliquote acylée a une activité, la fraction contient le noyau de A-30912A. On concentre l'éluat contenant le noyau de A-30912A, sous vide jusqu'à un petit volume, et on lyophilise pour obtenir environ 97 g du noyau brut.

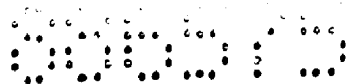
15 C. Purification du noyau de A-30912A par chromatographie liquide sur phase inversée

On dissout 25 g du noyau de A-30912A brut, obtenu comme décrit dans le paragraphe C, dans 300 ml d'un mélange 96:2:1:1 d'eau, d'acétonitrile, d'acide acétique et de pyridine. On chromatographie cette solution sur une colonne d'acier inoxydable de 4 l (8 cm x 80 cm) remplie de Lichroprep RP-18, granulométrie 25-40 microns (MC/B Manufacturing Chemists, Inc. E/M, Cincinnati, OH). La colonne fait partie d'une unité Chromatospac Prep 100 (Jobin Yvon, 16-18 rue du Canal, 91160 Longjumeau, France). On fait fonctionner la colonne à une pression de 6,2-6,9 bars, donnant un débit d'environ 60 ml/min, en utilisant le même solvant. On contrôle la séparation à 280 nm en utilisant un appareil de contrôle UV (ISCO Absorption Monitor Model UA-5, Instrumentation Specialties Co., 4700 Superior Ave. Lincoln, Nebraska 68504) avec une unité optique (ISCO Type 6). On recueille par minute des fractions ayant un volume d'environ 500 ml.

En se basant sur l'absorption à 280 nm, on réunit les fractions contenant le noyau de A-30912A, on les évapore sous vide et on les lyophilise; ce qui donne 2,6 g du noyau. La quantité de solvant nécessaire pour achever ce mode opératoire de séparation chromatographique varie de 7 à 8 l.

D. Caractéristiques du noyau de A-30912A

(a) formule brute : $C_{34}H_{51}N_7O_{15}$.



(b) poids moléculaire : 797,83.

(c) solide amorphe blanc, soluble dans l'eau, le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde et le méthanol ; insoluble dans le chloroforme, le toluène et l'éther diéthylique.

(d) Spectre d'absorption infrarouge (pastille de KBr)

présente des maximas d'absorption à :

3340 large (OH, liaison hydrogène) ; 2970, 2930 et 2890

(étirement de CH, groupements CH₃, CH₂, CH aliphatiques),

1660 et 1625 (plusieurs groupements carbonyle C=O) ; 1510-

1550 ; 1430-1450 (déformation de CH "wag"), 1310-1340 ; 1230-

1260 ; 1080 ; 835, 650 large et 550 large, cm⁻¹.

(e) le titrage électrométrique dans le diméthylformamide aqueux à 66 % indique la présence d'un groupement titrable avec un pK_a d'environ 7,35 (pH initial 7,32).

(f) durée de rétention en chromatographie liquide sous pression élevée (K') : 11,52 minutes dans les conditions suivantes :

Colonne : 4 x 300 mm

Garniture : gel de silice/C₁₈

Solvant : mélange 1:2:97 d'acétate d'ammonium, d'acétonitrile et d'eau

Débit : 3 ml/min

Pression : 172,5 bars

Détecteur : UV à longueur d'onde variable, à 230 nm

Sensibilité : 0-0,4 A.U.F.S.

Préparation 13

On prépare le noyau de A-30912A et on le purifie par le procédé de la Préparation 12, mais on utilise comme substrat A-30912A tétrahydrogéné.

Préparation 14

On prépare le noyau de A-30912A et on le purifie par le procédé de la Préparation 12 mais en utilisant comme substrat l'aculéacine A.

Préparation 15Préparation du noyau de A-30912BA. Désacylation du facteur B de l'antibiotique A-30912

On effectue une fermentation de A. utahensis comme décrit dans la Préparation 1, en utilisant le milieu de production I. Après incubation de la culture pendant environ 48 heures, on ajoute au milieu de fermentation le facteur B de A-30912 dissous dans une petite quantité de méthanol.

On contrôle la désacylation du facteur B de A-30912 par essai sur disque de papier vis-à-vis de Candida albicans ou de Neurospora crassa. On laisse la fermentation se poursuivre jusqu'à ce que la désacylation soit complète comme le montre la disparition de l'activité.

B. Séparation du noyau de A-30912B

On filtre le bouillon de fermentation ainsi obtenu comme décrit dans le paragraphe A. On rejette le gâteau mycélien. On fait passer le filtrat limpide ainsi obtenu dans une colonne contenant de la résine HP-20 (polymère très poreux DIAION, HP-Series, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokyo, Japon). On rejette l'effluent ainsi obtenu. Puis on lave la colonne avec jusqu'à huit volumes d'eau désionisée à pH 6,5-7,5 pour enlever le bouillon filtré résiduel. On rejette cette eau de lavage. Puis on élue la colonne avec une solution 7:3 d'eau et de méthanol. On contrôle l'élution selon le mode opératoire suivant : on prélève deux parties aliquotes de chaque fraction éluee. On concentre l'une des parties aliquotes jusqu'à un petit volume et on la traite avec un chlorure d'acide comme le chlorure de myristoyle. Ce produit et l'autre partie non traitée sont titrés pour déterminer leur activité vis-à-vis de Candida albicans. Si la partie non traitée n'a pas d'activité et que la partie aliquote acylée a une activité, la fraction contient le noyau de A-30912B. On concentre l'éluat contenant le noyau de A-30912B sous vide jusqu'à un petit volume et on le lyophilise pour obtenir le noyau brut.

C. Purification du noyau de A-30912B par chromatographie liquide à phase inversée

On dissout le noyau de A-30912B brut, obtenu comme

décrit dans le paragraphe C, dans un mélange 96:2:1:1 d'eau, d'acétonitrile, d'acide acétique et de pyridine. On chromatographie cette solution sur une colonne garnie de Lichroprep RP-18, granulométrie 25-40 microns (MC/B Manufacturing Chemists, Inc. E/M, Cincinnati, OH). La colonne fait partie d'une unité Chromatospac Prep 100 (Jobin Yvon, 16-18 rue du Canal, Longjumeau, France). On fait fonctionner la colonne à une pression de 6,2-6,9 bars, donnant un débit d'environ 60 ml par minute, en utilisant le même solvant.

10 On contrôle la séparation à 280 nm en utilisant un appareil de contrôle UV (ISCO Absorption Monitor Model UA-5, Instrumentation Specialties Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska 68504) avec une unité optique (ISCO Type 6).

En se basant sur l'absorption à 280 nm, on réunit les fractions contenant le noyau de A-30912B, on les évapore sous vide et on les lyophilise pour obtenir le noyau de A-30912B purifié.

Préparation 16

On prépare le noyau de A-30912B et on le purifie par le procédé de la Préparation 15, mais on utilise comme substrat A-30912B tétrahydrogéné.

Préparation 17

Préparation du noyau de A-30912D

A. Désacylation du facteur D de A-30912

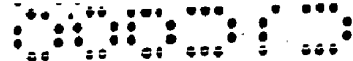
25 On effectue une fermentation de A. utahensis comme décrit dans la Préparation 1, en utilisant le milieu de production I. Après avoir fait incuber la culture pendant environ 48 heures, on ajoute au milieu de fermentation le facteur D de A-30912 dissous dans une petite quantité de méthanol.

On contrôle la désacylation du facteur D de A-30912 par essai sur disque de papier vis-à-vis de Candida albicans ou de Neurospora crassa. On laisse la fermentation se poursuivre jusqu'à ce que la désacylation soit complète comme le montre la disparition de l'activité.

B. Séparation du noyau de A-30912D

On filtre le bouillon de fermentation entier obtenu comme décrit dans le paragraphe A. On rejette le gâteau

- mycélien. On fait passer le filtrat limpide ainsi obtenu sur une colonne contenant de la résine HP-20 (polymère très poreux DIAION, HP-Series, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokyo, Japon). On rejette l'effluent ainsi obtenu.
- 5 Puis on lave la colonne avec jusqu'à huit volumes d'eau désionisée à pH 6,5-7,5 pour enlever le bouillon filtré résiduel. On rejette cette eau de lavage. Puis on élue la colonne avec une solution 7:3 d'eau et de méthanol. On contrôle l'élution en utilisant le mode opératoire suivant :
- 10 on prélève deux parties aliquotes de chaque fraction éluee. On concentre l'une des parties aliquotes jusqu'à un petit volume et on la traite par un chlorure d'acide comme le chlorure de myristoyle. On titre ce produit et l'autre partie non traitée pour déterminer leur activité vis-à-vis de
- 15 Candida albicans. Si la partie non traitée n'a pas d'activité et que la partie aliquote acylée a une activité, la fraction contient le noyau de A-30912D. L'éluat contenant le noyau de A-30912D est concentré sous vide jusqu'à un petit volume et lyophilisé pour obtenir le noyau brut.
- 20 C. Purification du noyau de A-30912D par chromatographie liquide en phase inversée
- On dissout dans un mélange 96:2:1:1 d'eau, d'acétonitrile, d'acide acétique et de pyridine le noyau de A-30912D brut obtenu comme décrit dans le paragraphe C. On
- 25 chromatographie cette solution sur une colonne garnie de Lichroprep RP-18, granulométrie 25-40 microns (MC/B Manufacturing Chemists, Inc. E/M, Cincinnati, OH). La colonne fait partie d'une unité Chromatospac Prep 100 (Jobin Yvon, 16-18 rue du Canal, 91160 Longjumeau, France). On fait
- 30 fonctionner la colonne à une pression de 6,2-6,9 bars, ce qui donne un débit d'environ 60 ml/minute, en utilisant le même solvant. On contrôle la séparation à 280 nm en utilisant un appareil de contrôle UV (ISCO Absorption Monitor Model UA-5, Instrumentation Specialties Co., 4700 Superior Ave.,
- 35 Lincoln, Nebraska 68504) avec une unité optique (ISCO Type 6).
- En se basant sur l'absorption à 280 nm, on combine les fractions contenant le noyau de A-30912D, on les évapore sous vide et on les lyophilise pour obtenir le noyau de



A-30912D purifié.

Préparation 18

On prépare le noyau de A-30912D et on le purifie par le procédé de la Préparation 17, mais on utilise comme
5 substrat A-30912D tétrahydrogéné.

Préparation 19

Préparation du noyau de A-30912H

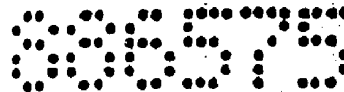
A. Désacylation du facteur H de l'antibiotique A-30912

On effectue une fermentation de A. utahensis comme
10 décrit dans la Préparation 1, en utilisant le milieu de production I. Après avoir fait incuber la culture pendant environ 48 heures, on ajoute au milieu de fermentation le facteur H de A-30912 dissous dans une petite quantité de méthanol.

15 On contrôle la désacylation du facteur H de A-30912 par une analyse sur disque de papier vis-à-vis de Candida albicans ou Neurospora crassa. On laisse la fermentation se poursuivre jusqu'à ce que la désacylation soit complète comme le montre la disparition de l'activité.

20 B. Séparation du noyau de A-30912H

On filtre le bouillon de fermentation entier obtenu comme décrit dans le paragraphe A. On rejette le gâteau mycélien. On fait passer le filtrat limpide ainsi obtenu dans une colonne contenant de la résine HP-20 (polymère très
25 poreux DIAION, HP-Series, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokyo, Japon). On rejette l'effluent ainsi obtenu. Puis on lave la colonne avec jusqu'à huit volumes d'eau désionisée à pH 6,5-7,5 pour enlever le bouillon filtré résiduel. On rejette cette eau de lavage. Puis on élue la
30 colonne avec une solution 7:3 d'eau et de méthanol. On contrôle l'élution en utilisant le mode opératoire suivant : on prélève deux parties aliquotes de chaque fraction éluee. On concentre l'une des parties aliquotes jusqu'à un petit volume et on la traite avec un chlorure d'acide comme le
35 chlorure de myristoyle. On détermine l'activité de ce produit et de l'autre partie aliquote non traitée vis-à-vis de Candida albicans. Si la partie aliquote non traitée n'a pas d'activité et que la partie aliquote acylée a une activité,



la fraction contient le noyau de A-30912H. On concentre l'éluat contenant le noyau de A-30912H sous vide jusqu'à un petit volume et on le lyophilise pour obtenir le noyau brut.

C. Purification du noyau de A-30912H par chromatographie liquide en phase inversée

On dissout le noyau de A-30912H brut, obtenu comme décrit dans le paragraphe C, dans un mélange 96:2:1:1 d'eau, d'acétonitrile, d'acide acétique et de pyridine. On chromatographie cette solution sur une colonne garnie de Lichroprep RP-18, granulométrie 25-40 microns (MC/B Manufacturing Chemists, Inc. E/M, Cincinnati, OH). La colonne fait partie d'une unité Chromatospac Prep 100 (Jobin Yvon, 16-18 rue du Canal 91160 Longjumeau, France). On fait fonctionner la colonne à une pression de 6,2-6,9 bars, donnant un débit d'environ 60 ml/min, en utilisant le même solvant. On contrôle la séparation à 280 nm en utilisant un appareil de contrôle UV (ISCO Absorption Monitor Model UA-5, Instrumentation Specialties Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska 68504) équipé d'une unité optique (ISCO Type 6).

Préparation 20

On prépare le noyau de A-30912H et on le purifie par le procédé de la Préparation 19 mais on utilise comme substrat A-30912H tétrahydrogéné.

Préparation 21

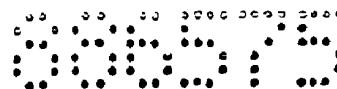
Préparation du noyau S31794/F-1

A. Désacylation de l'antibiotique S31794/F-1

On effectue une fermentation de A. utahensis comme décrit dans la Préparation 1, en utilisant le milieu de production I. Après avoir fait incuber la culture pendant environ 48 heures, on ajoute au milieu de fermentation l'antibiotique S31794/F-1 dissous dans une petite quantité de méthanol.

On contrôle la désacylation de S31794/F-1 par analyse avec disque de papier vis-à-vis de Candida albicans. On laisse la fermentation se poursuivre jusqu'à ce que la désacylation soit complète comme le montre la disparition

nc



de l'activité.

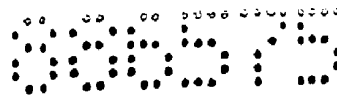
B. Séparation du noyau de S31794/F-1

On filtre le bouillon de fermentation entier obtenu comme décrit dans le paragraphe A. On rejette le gâteau mycélien, on fait passer le filtrat limpide ainsi obtenu dans une colonne contenant de la résine HP-20 (polymère très poreux DIAION, HP-Series, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokyo, Japon). On rejette l'effluent ainsi obtenu. On lave ensuite la colonne avec jusqu'à huit volumes d'eau désionisée à pH 6,5-7,5 pour chasser le bouillon filtré résiduel. On rejette cette eau de lavage. Puis on élue la colonne avec une solution 7:3 d'eau et de méthanol. On contrôle l'élution en utilisant le mode opératoire suivant : on prélève deux parties aliquotes à partir de chaque fraction élue. On concentre l'une des parties aliquotes jusqu'à un petit volume et on la traite par un chlorure d'acide comme le chlorure de myristoyle. On titre ce produit et l'autre partie aliquote non traitée pour déterminer leur activité vis-à-vis de Candida albicans. Si la partie aliquote non traitée n'a pas d'activité et que la partie aliquote acylée a une activité, la fraction contient le noyau de S31794/F-1. On concentre l'éluat contenant le noyau de S31794/F-1, sous vide jusqu'à un petit volume, et on le lyophilise pour obtenir le noyau brut.

C. Purification du noyau de S31794/F-1 par chromatographie liquide en phase inversée

On dissout dans un mélange 96:2:1:1 d'eau, d'acétonitrile, d'acide acétique et de pyridine le noyau de S31794/F-1 brut obtenu comme décrit dans le paragraphe B. On chromatographie cette solution sur une colonne garnie de Lichroprep RP-18, granulométrie 25-40 microns (MC/B Manufacturing Chemists, Inc. E/M, Cincinnati, OH). La colonne fait partie d'une unité Chromatospac Prep 100 (Jobin Yvon, 16-18 rue du Canal 91160 Longjumeau, France). On fait fonctionner la colonne à une pression de 6,2-6,9 bars, donnant un débit d'environ 60 ml/min, en utilisant le même solvant. On contrôle la séparation à 280 nm en utilisant un appareil de contrôle UV (ISCO Absorption Monitor Model UA-5,

MC



Instrumentation Specialties Co., 4700 Superior Ave.,
Lincoln, Nebraska 68504) équipé d'une unité optique (ISCO
Type 6).

En se basant sur l'absorption à 280 nm, on réunit
5 les fractions contenant le noyau de S31794/F-1, on les
évapore sous vide et on les lyophilise pour obtenir le noyau
de S31794/F-1 purifié.

Préparation 22

Préparation de A-30912A tétrahydrogéné

10 On dissout le facteur A de A-30912 dans l'éthanol.
On réduit PtO_2 dans l'éthanol absolu pour former Pt que l'on
utilise à son tour pour réduire par voie catalytique le
facteur A de A-30912, par hydrogénation sous pression
positive jusqu'à ce que la réaction soit terminée (environ
15 2 à 3 heures). On filtre le mélange réactionnel et on le
concentre sous vide. On dissout le résidu dans une petite
quantité de t-butanol et on le lyophilise pour obtenir
A-30912A tétrahydrogéné.

Préparation 23

20 Préparation de A-30912B tétrahydrogéné

On dissout dans l'éthanol le facteur B de A-30912.
On réduit PtO_2 dans de l'éthanol absolu pour former du
platine que l'on utilise à son tour pour réduire par voie
catalytique le facteur B de A-30912 par hydrogénation sous
25 pression positive jusqu'à ce que la réaction soit terminée
(environ 2 à 3 heures). On filtre le mélange réactionnel et
on le concentre sous vide. On dissout le résidu dans une
petite quantité de t-butanol et on le lyophilise pour obtenir
A-30912B tétrahydrogéné.

Préparation 24

30 Préparation de A-30912D tétrahydrogéné

On dissout dans de l'éthanol le facteur D de
A-30912. On réduit PtO_2 dans l'éthanol absolu pour former
Pt que l'on utilise à son tour pour réduire par voie
35 catalytique le facteur D de A-30912, par hydrogénation sous
pression positive jusqu'à ce que la réaction soit terminée
(environ 2 à 3 heures). On filtre le mélange réactionnel et

on le concentre sous vide. On dissout le résidu dans une petite quantité de t-butanol et on le lyophilise pour obtenir A-30912D tétrahydrogéné.

Préparation 25

5 Préparation de A-30912H tétrahydrogéné

On dissout le facteur H de A-30912 dans de l'éthanol. On réduit PtO_2 dans l'éthanol absolu pour former Pt que l'on utilise à son tour pour réduire par voie catalytique le facteur H de A-30912, par hydrogénation sous 10 pression positive jusqu'à ce que la réaction soit terminée (environ 2 à 3 heures). On filtre le mélange réactionnel et on le concentre sous vide. On dissout le résidu dans une petite quantité de t-butanol et on le lyophilise pour obtenir A-30912H tétrahydrogéné.

Préparation 26

La préparation des acides de formule IV est exemplifiée par les composés des Tableaux 1 à 7 ci-dessous qui donnent la préparation de divers acides alcoxy-
5 benzoïques, acides (alkylthio)benzoïques, acides alcoxyphénylacétiques, acides alcoxyphénylpropanoïques, acides alcoxycinnamiques, acides alcoxyphénoxyacétiques et acides alcoxynicotiniques.

La préparation de ces acides de formule IV est
10 exemplifiée par la préparation des acides alcoxybenzoïques du Tableau 1 et des acides (alkylthio)benzoïques du Tableau 2. Le mode opératoire général pour la préparation de ces acides est décrit dans les paragraphes suivants.

On prépare les acides alcoxybenzoïques du Tableau
15 1 selon le mode opératoire général suivant :

On dissout de l'acide p-hydroxybenzoïque dans de l'hydroxyde de sodium aqueux à 10 % (deux équivalents) et on ajoute la solution résultante à 200 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO).

On ajoute un équivalent du bromure d'alkyle à la solution
20 à 65-80°C. Puis on agite la solution pendant deux heures, après quoi on la verse dans un grand volume (600 ml) d'eau et on l'acidifie avec de l'acide chlorhydrique. On recueille par filtration et on cristallise dans le méthanol l'acide alcoxybenzoïque qui précipite de la solution.

25 Les acides (alkylthio)benzoïques du Tableau 2 sont préparés selon le mode opératoire général suivant :
A une suspension d'hydrure de sodium (un équivalent, dispersion à 50 % dans de l'huile minérale) dans du DMF (100 ml pour 50 mmoles), refroidie à 0°C, on ajoute lentement un
30 équivalent de p-hydroxybenzoate de méthyle. On agite le mélange réactionnel sous atmosphère d'azote jusqu'à ce que le dégagement d'hydrogène s'arrête. A la solution de 4-carbométhoxyphénolate de sodium ainsi obtenue, on ajoute du chlorure de N,N-diméthylthiocarbamoyle $[(CH_3)_2N(CS)Cl]$
35 (un équivalent) en une fois. On chauffe la suspension résultante à 70°C pendant 1-3 heures puis on la verse dans une solution aqueuse (1 %) d'hydroxyde de potassium (en grand excès). On extrait la suspension deux fois avec un

Mc

mélange 4:1 en volume de toluène et d'hexane. Après séchage sur sulfate de magnésium, on filtre les extraits organiques et on les évapore jusqu'à une huile. On purifie l'huile par chromatographie sur gel de silice en utilisant 5 2 % de méthanol dans du chlorure de méthylène pour obtenir le diméthylthiocarbamate de O-(4-carbométhoxyphényle) [$p\text{-CH}_3\text{CO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CS})\text{N}(\text{CH}_3)_2$], p.f. 97-102°C. On chauffe ce produit sous atmosphère d'azote à 220°C pendant 30 à 60 minutes pour obtenir le diméthylthiocarbamate de S-(4-
10 carbométhoxyphényle) [$p\text{-CH}_3\text{CO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{S}(\text{CO})\text{N}(\text{CH}_3)_2$] que l'on cristallise dans le méthanol. Au diméthylthiocarbamate de S-(4-carbométhoxyphényle), dissous dans le DMSO, on ajoute 2 équivalents d'hydroxyde de sodium (solution aqueuse à 10 %). On chauffe le mélange à 65-85°C et on ajoute le
15 bromure d'alkyle (1 équivalent). On poursuit le chauffage pendant 2 à 4 heures après quoi on verse le mélange dans un grand volume d'eau. Par acidification, il se forme un précipité que l'on recueille par filtration. On cristallise l'acide (alkylthio)benzoïque dans le méthanol.

008575

Tableau 1
Préparation des acides alcoxybenzoïques

Bromure d'alkyle		Poids d'acide p-hydroxybenzoïque		Acide alcoxybenzoïque	
Formule	Poids			Formule	Poids
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$	9,65 g.		6,9 g.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	6,18 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{Br}$	11,05 g.		6,9 g.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	6,79 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{Br}$	13,85 g.		6,9 g.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	6,18 g.

MC

Tableau 1 (suite)

Préparation des acides alcoxybenzoïques

Bromure d'alkyle		Poids d'acide p-hydroxybenzoïque		Acide alcoxybenzoïque	
Formule	Poids			Formule	Poids
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$	9,1 g.	6,4 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	6,69 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{Br}$	10,8 g.	6,4 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	10,2 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Br}$	11,7 g.	6,4 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	10,9 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{Br}$	13,0 g.	6,4 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	7,3 g.

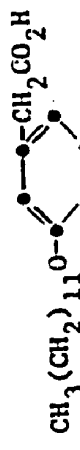
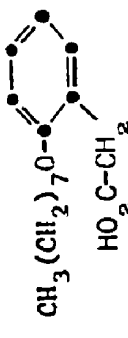
Tableau 2

Préparation des acides alkylthiobenzoïques

Bromure d'alkyle		Poids de diméthylthio- carbamate du S-(4-carbo- méthoxyphényle)		Acide alkylthiobenzoïque	
Formule	Poids			Formule	Poids
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$	386 mg.		478 mg.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	405 mg.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{Br}$	1,77 g.		1,91 g.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	1,34 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Br}$	1,99 g.		1,91 g.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	1,8 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{Br}$	2,22 g.		1,91 g.	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	2,3 g.

Tableau 3

Préparation des acides alcoxyphénylacétiques

<u>Bromure d'alkyle</u>		<u>Poids d'acide hydroxyphénylacétique</u>		<u>Acide alcoxyphénylacétique</u>	
<u>Formule</u>	<u>Poids</u>			<u>Formule</u>	<u>Poids</u>
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$	3,86 g.	3,04 g.			2,56 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Br}$	4,98 g.	3,04 g.			3,70 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$	3,86 g.	3,04 g.			3,72 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Br}$	4,98 g.	3,04 g.			2,72 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$	3,56 g.	3,04 g.			1,87 g.

000075

Tableau 4

Préparation des acides alcoxyphénylpropanoïques

Bromure d'alkyle		Poids d'acide p-hydroxy- phénylpropanoïque		Acide alcoxyphénylpropanoïque	
Formule	Poids			Formule	Poids
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{Br}$	2,74 g.	3,32 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}_2\text{H}$	2,97 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{Br}$	3,02 g.	3,32 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}_2\text{H}$	2,80 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{Br}$	3,30 g.	3,32 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}_2\text{H}$	3,53 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{Br}$	3,58 g.	3,32 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}_2\text{H}$	2,90 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$	5,79 g.	4,98 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}_2\text{H}$	4,65 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Br}$	7,47 g.	4,98 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}_2\text{H}$	4,01 g.

Tableau 5

Préparation des acides alcoxycinnamiques

Bromure d'alkyle		poids d'acide		Acide alcoxycinnamique	
Formule	Poids	p-hydroxycinnamique	Formule	Poids	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{Br}$	3,30 g.	3,28 g.		2,04 g.	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$	3,86 g.	3,28 g.		2,75 g.	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{Br}$	4,42 g.	3,28 g.		1,48 g.	

Tableau 6

Préparation des acides alcoxyphénoxycétiques

<u>Bromure d'alkyle</u>		<u>Poids de l'acide p-hydroxyphénoxycétique</u>		<u>Acide alcoxyphénoxycétique</u>	
<u>Formule</u>	<u>Poids</u>			<u>Formule</u>	<u>Poids</u>
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$	3,86 g.	2,36 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	3,4
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{Br}$	4,42 g.	2,36 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	3,8

00575

Tableau 7

Préparation des acides alcoxynicotiniques

<u>Bromure d'alkyle</u>		<u>Poids d'acide</u>		<u>Acide alcoxynicotinique</u>	
<u>Formule</u>	<u>Poids</u>	<u>6-hydroxynicotinique</u>		<u>Formule</u>	<u>Poids</u>
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{Br}$	3,86 g.	2,78 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	3,6 g.
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Br}$	4,98 g.	2,78 g.		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}_2\text{H}$	2,4 g.

He

Préparation 27

On prépare les esters 2,4,5-trichlorophényliques des acides de formule IV, y compris les acides alcoxybenzoïques et les acides alkylthiobenzoïques selon le même mode opératoire général. Le Tableau 8 ci-dessous donne la préparation des esters 2,4,5-trichlorophényliques d'un certain nombre d'acides de formule IV, y compris les acides alcoxybenzoïques du Tableau 1 et les acides (alkylthio)benzoïques du Tableau 2. Les composés décrits dans le Tableau 3 sont préparés selon le même mode opératoire général. Le mode opératoire suivant est donné à titre illustratif :

On dissout dans du chlorure de méthylène une mole d'acide alcoxybenzoïque ou d'acide (alkylthio)benzoïque, 1,1 mole de 2,4,5-trichlorophénol et 1 mole de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. On agite le mélange à la température ambiante pendant 15-18 heures, après quoi on le filtre. On évapore le filtrat à siccité sous pression réduite et on cristallise le résidu dans un mélange d'acétonitrile et d'eau. On sèche le produit sous vide.

Tableau 8

Préparation des esters 2,4,5-trichlorophényles

Acide de formule IV		Poids de l'ester 2,4,5-trichlorophényle (g)
Formule	Poids	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}$	6,18	5,32
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}$	6,79	1,93
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}^*$	3,06	2,20
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}$	6,90	5,91
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{S}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}$	6,43	7,98
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{S}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}$	1,34	1,42
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{S}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}$	1,8	2,5
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{S}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}$	2,3	2,8

* Disponible dans le commerce.

nc

Tableau 8 (suite)

Préparation des esters 2,4,5-trichlorophényles

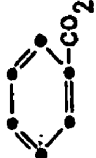
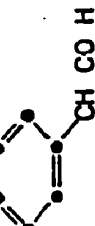
Acide de formule IV		Poids	Poids de l'ester 2,4,5-trichlorophényle (g)
Formule			
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{-O-}$ 		3,75	4,72
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{-O-}$ 		4,17	5,7
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{-O-}$ 		4,59	5,0
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{-O-}$ 		5,01	8,6
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{-O-}$ 		2,12	1,91
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{-O-}$ 		3,2	2,36
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{-O-}$ 		2,64	2,86

Tableau 8 (suite)

Préparation des esters 2,4,5-trichlorophényles

Acide de formule IV		Poids	Poids de l'ester 2,4,5-trichlorophényle (g)
Formule			
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$		2,0	1,65
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$		1,8	1,73
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$		2,8	3,98
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$		2,36	2,82
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$		3,4	4,11
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$		2,73	2,01
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$		2,78	4,3
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{H}$		1,45	0,826

Tableau 8 (suite)

Préparation des esters 2,4,5-trichlorophényliques

Acide de formule IV		Poids	Poids de l'ester 2,4,5-trichlorophénylique (g)
Formule			
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}$		3,34	4,86
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}^*$		2,22	2,6
$\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CO}_2\text{H}^*$		2,65	3,06
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$		2,0	2,84
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$		2,75	3,7
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$		2,8	2,7
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$		3,08	2,4
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}$		2,5	2,6
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3-\text{CO}_2\text{H}$		2,0	2,6

*: Disponible dans le commerce

ne

EXEMPLE 1Préparation des dérivés de A-30912A

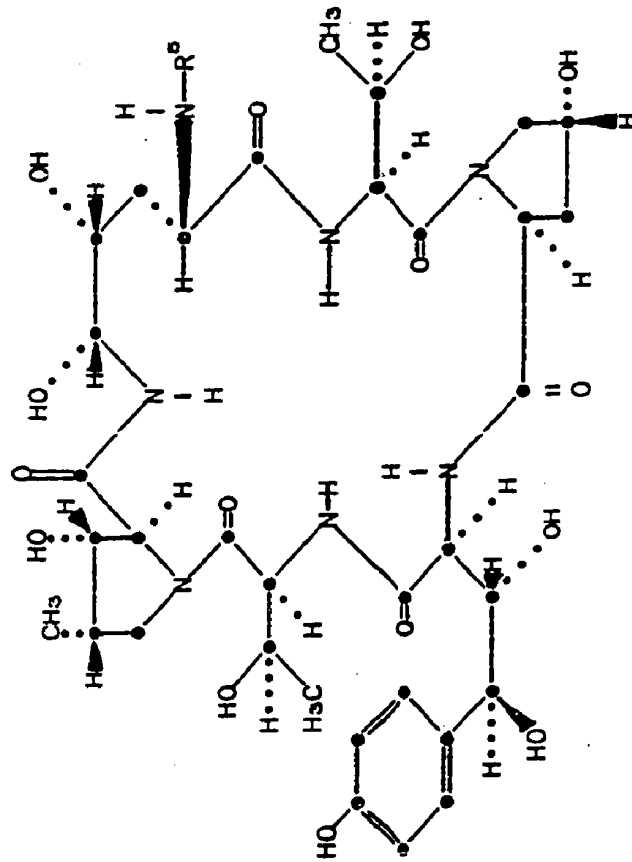
Le Tableau 9 ci-dessous donne la préparation des dérivés du noyau de A-30912A préparés à partir des esters 2,4,5-trichlorophényliques du Tableau 8. On prépare les dérivés du noyau de A-30912, indiqués dans le Tableau 9, en général selon le mode opératoire suivant :

Au noyau de A-30912A dissous dans 10 à 50 ml de DMF, on ajoute l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide alcoxybenzoïque ou de l'acide (alkylthio)benzoïque (rapport molaire 1:2). On agite le mélange réactionnel pendant 15 à 18 heures, après quoi on l'amène à siccité pour obtenir un résidu. On lave le résidu deux fois avec un mélange d'éther diéthylique (50 ml) et de chlorure de méthylène (50 ml). On rejette les liquides de lavage. On dissout le résidu résultant dans un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol et on le chromatographie sur une colonne de 100 ml de gel de silice (Woelm, 99-210 μ) en utilisant le système solvant susmentionné comme éluant. On contrôle les fractions de la chromatographie par CCM sur gel de silice (Merck) en utilisant un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol comme système solvant. On réunit les fractions contenant le produit désiré et on chasse le solvant pour obtenir le produit sous forme d'un résidu. On peut analyser le produit par CLPE à phase inversée comme suit : pour les composés à groupement alcoxy et pour les composés à groupement alkylthio en C_{12} et C_{14} , on dissout l'échantillon dans un mélange 1:2:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. On injecte la solution d'échantillon (1 mg/ml) dans une colonne en acier inoxydable de 0,63 cm x 30 cm garnie de résine C_{18} Micro Bondapak (Waters Associates, Milford, Mass., U.S.A.), et on élue la colonne avec un système solvant consistant en un mélange 1:2:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. Pour les composés à groupement alkylthio en C_8 et C_{18} , le système solvant est un mélange 2:1:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. On effectue l'élution à une pression de 103,5 bars avec un débit de 30 ml/minute en

utilisant une pompe Waters 600A (Waters Associates, Inc.) et une vitesse du papier de 0,5 cm/minute. On contrôle l'éluant avec un appareil de détection UV Varian Vari-Chrom à 230 nm. Les produits peuvent également être analysés par spectrométrie de masse à désorption de champ (MSDC).

Tableau 9

Préparation des dérivés de formule III
du noyau de A-30912A



V

00573

21
22

Tableau 9

R ⁵ de formule V	Réactif ester (mg)	Noyau de A- 30912A (mg)	Produit (mg)	M ⁺ [Na] ⁺	Rétention en CLPE (cm)
	430	400	103	1052	0,95
	460	400	82	1080	1,55
	490	400	162	1107	3,50
	514	400	159	1135	6,6
	446	400	266	1068	2,45
	474	400	228	1096	5,15
	500	400	293	1124	2,5
	530	400	266	1152	4,1
	483	400	190	1083	11,2

91C

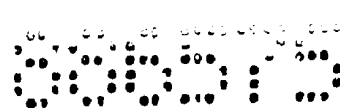
Tableau 9 (suite)

R ⁵ de formule V	Réactif ester (mg)	Noyau de A- 30912A (mg)	Produit (mg)	M ⁺ [Na] ⁺	Rétention en CLPE (cm)
	888	400	230	1066	4,4
	600	400	245	1024	1,2
	662	400	230	1064	2,4
	854	400	301	1050	3,2
	910	400	98	1078	9,5
	918	400	260	1082	1,8
	488	400	280	1110	2,7
	430	400	352	1053	1,0

Tableau 9 (suite)

R ⁵ de formule V	Réactif ester (mg)	Noyau de A- 30912A (mg)	Produit (mg)	M ⁺ [Na] ⁺	Rétention en CLPE (cm)
	487	400	270	1109	2,1
	800*	800	460	1036	3,6
	922	800	145	1083	1,0
	802	400	320	1024	1,0
	831	400	245	1038	1,2
	858	400	303	1052	2,6
	888	400	191	1066	2,1
	914	400	335	1081	1,2
	1030	400	360	1136	3,0

* On utilise dans ce cas le chlorure de p-(n-octyl)benzoyle (disponible dans le commerce), en faisant réagir le chlorure d'acide avec le noyau dans la pyridine à la température ambiante sous azote pendant 24 heures.

EXEMPLE 2Préparation des dérivés de A-30912B

On prépare les dérivés du noyau de A-30912B en général à partir des esters 2,4,5-trichlorophényliques 5 décrits dans la Préparation 27, selon le mode opératoire suivant :

Au noyau de A-30912B dissous dans 10 à 50 ml de DMF, on ajoute l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide alcoxybenzoïque ou de l'acide (alkylthio)benzoïque (rapport 10 molaire 1:2). On agite le mélange réactionnel pendant 15-18 heures, après quoi on l'amène à siccité pour obtenir un résidu. On lave le résidu (deux fois chaque) avec un mélange de 50 ml d'éther diéthylique et de 50 ml de chlorure de méthylène. On rejette les produits de lavage. On dissout 15 le résidu restant dans un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol et on le chromatographie sur une colonne de 100 ml de gel de silice (Woelm, 90-210 μ) en utilisant comme éluant le système solvant susmentionné. On contrôle les fractions de la chromatographie par CCM sur gel 20 de silice (Merck) en utilisant comme système solvant un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol. On réunit les fractions contenant le produit désiré et on chasse le solvant pour obtenir le produit sous forme d'un résidu. Le produit peut être analysé par CLPE à phase 25 inversée comme suit : dans les composés à groupement alcoxy et les composés à groupement alkylthio en C_{12} - C_{14} , on dissout l'échantillon dans un mélange 1:2:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. On injecte la solution d'échantillon (1 mg/ml) dans une colonne en acier 30 inoxydable de 0,63 cm x 30 cm garnie de résine C_{18} Micro Bondapak (Waters Associates Inc.) et on élue la colonne avec un système solvant consistant en un mélange 1:2:2 d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. Pour les composés à groupement alkylthio en C_8 et C_{10} , le système solvant est un mélange 35 2:1:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. On effectue l'élution à une pression de 103,5 bars à un débit de 3 ml/min en utilisant une pompe Waters 600 A (Waters Associates, Inc.) et une vitesse de papier de 0,5 cm/min.

On contrôle l'éluant avec un appareil de détection UV Varian Vari-Chrom à 230 nm. Les produits peuvent également être analysés par spectrométrie de masse à désorption de champ (MSDC).

- 5 En suivant ce mode opératoire général, on obtient les composés suivants de formule III où R^1 et R^2 sont tous deux H, R^3 et R^4 sont tous deux OH et R^5 est :

- 10 p-(n-octylthio)benzoyle
p-(n-décylthio)benzoyle
p-(n-dodécylthio)benzoyle
p-(n-tétradécylthio)benzoyle
p-(n-octyl)benzoyle *
- 15 3-[p-(n-hexyloxy)phényle]propanoyle
3-[p-(n-octyloxy)phényle]propanoyle
3-[p-(n-dodécyloxy)phényle]propanoyle
p-(n-hexyloxy)cinnamoyle
p-(n-octyloxy)cinnamoyle
[p-(n-octyloxy)phényle]acétyle
[p-(n-dodécyloxy)phényle]acétyle
- 20 3-[p-(n-pentyloxy)phényle]propanoyle
3-[p-(n-heptyloxy)phényle]propanoyle
p-(n-octyloxy)phénoxyacétyle
p-(n-décyloxy)phénoxyacétyle
6-(n-octyloxy)nicotinoyle
- 25 6-(n-dodécyloxy)nicotinoyle
- * Mieux préparé par le procédé au chlorure d'acide, par exemple en faisant réagir le chlorure de p-(n-octyl)-benzoyle avec le noyau dans la pyridine à la température ambiante sous azote pendant 24 heures.

EXEMPLE 3

30 Préparation des dérivés de A-30912D

On prépare les dérivés du noyau de A-30912D en général à partir des esters 2,4,5-trichlorophényles illustrés dans la Préparation 27, selon le mode opératoire suivant :

- 35 Au noyau de A-30912D dissous dans 10 à 50 ml de DMF, on ajoute l'ester 2,4,5-trichlorophényle de l'acide alcoxybenzoïque ou de l'acide (alkylthio)benzoïque (rapport molaire 1:2). On agite le mélange réactionnel pendant 15-18

heures, après quoi on l'amène à siccité pour obtenir un résidu. On lave le résidu (deux fois chaque) avec un mélange de 50 ml d'éther diéthylique et de 50 ml de chlorure de méthylène. On rejette les produits de lavage. On dissout le résidu restant dans un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol et on le chromatographie sur une colonne de 100 ml de gel de silice (Woelm, 90-210 μ) en utilisant comme éluant le système solvant susmentionné. On contrôle les fractions de la chromatographie par CCM sur gel de silice (Merck) en utilisant comme système solvant un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol. On réunit les fractions contenant le produit désiré et on chasse le solvant pour obtenir le produit sous forme d'un résidu. Le produit peut être analysé par CLPE à phase inversée comme suit : pour les composés à groupement alcoxy et les composés à groupement alkylthio en C_{12} - C_{14} , on dissout l'échantillon dans un mélange 1:2:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. On injecte la solution d'échantillon (1 mg/ml) dans une colonne en acier inoxydable de 0,63 cm x 30 cm garnie de résine C_{18} Micro Bondapak (Waters Associates Inc.) et on élue la colonne avec un système solvant consistant en un mélange 1:2:2 d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. Pour les composés à groupement alkylthio en C_8 et C_{10} , le système solvant est un mélange 2:1:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. On effectue l'élution à une pression de 103,5 bars à un débit de 3 ml/minute en utilisant une pompe Waters 600 A (Waters Associates, Inc.) et une vitesse de papier de 0,5 cm/minute. On contrôle l'éluant avec un appareil de détection UV Varian Vari-Chrom à 230 nm. Les produits peuvent également être analysés par spectrométrie de masse à désorption de champ (MSDC).

En suivant ce mode opératoire général, on obtient les composés suivants de formule III où R^1 , R^2 , R^3 et R^4 sont tous H et R^5 est :

p-(n-octylthio)benzoyle
 p-(n-décylthio)benzoyle
 p-(n-dodécylthio)benzoyle

nc

- p-(n-tétradécylthio)benzoyle
 n-(n-octyl)benzoyle
 3-[p-(n-hexyloxy)phényl]propanoyle
 3-[p-(n-octyloxy)phényl]propanoyle
 5 3-[p-(n-dodécyloxy)phényl]propanoyle
 p-(n-hexyloxy)cinnamoyle
 p-(n-octyloxy)cinnamoyle
 [p-(n-octyloxy)phényl]acétyle
 [p-(n-dodécyloxy)phényl]acétyle
 10 3-[p-(n-pentyloxy)phényl]propanoyle
 3-[p-(n-heptyloxy)phényl]propanoyle
 p-(n-octyloxy)phénoxyacétyle
 p-(n-décyloxy)phénoxyacétyle
 6-(n-octyloxy)nicotinoyle
 15 6-(n-dodécyloxy)nicotinoyle

* Mieux préparé par le procédé au chlorure d'acide, par exemple en faisant réagir le chlorure de p-(n-octyl)-benzoyle avec le noyau dans la pyridine à la température ambiante sous azote pendant 24 heures.

EXEMPLE 4

20 Préparation des dérivés du noyau de A-30912H

On prépare les dérivés du noyau de A-30912H ou de ses homologues à groupement alkyloxy, en général à partir des esters 2,4,5-trichlorophényliques illustrés dans la Préparation 27, selon le mode opératoire suivant :

- 25 Au noyau de A-30912H dissous dans 10 à 50 ml de DMF, on ajoute l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide alcoxybenzoïque ou de l'acide (alkylthio)benzoïque (rapport molaire 1:2). On agite le mélange réactionnel pendant 15-18 heures, après quoi on l'amène à siccité pour obtenir un
 30 résidu. On lave le résidu (deux fois chaque) avec un mélange de 50 ml d'éther diéthylique et de 50 ml de chlorure de méthylène. On rejette les produits de lavage. On dissout le résidu restant dans un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol et on le chromatographie sur une
 35 colonne de 100 ml de gel de silice (Woelm, 90-210 μ) en utilisant comme éluant le système solvant susmentionné. On contrôle les fractions de la chromatographie par CCM sur gel de silice (Merck) en utilisant comme système solvant un

- mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol. On réunit les fractions contenant le produit désiré et on chasse le solvant pour obtenir le produit sous forme d'un résidu. Le produit peut être analysé par CLPE à phase
- 5 inversée comme suit : dans les composés à groupement alcoxy et les composés à groupement alkylthio en C_{12} - C_{14} , on dissout l'échantillon dans un mélange 1:2:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. On injecte la solution d'échantillon (1 mg/ml) dans une colonne en acier
- 10 inoxydable de 0,63 cm x 30 cm garnie de résine C_{18} Micro Bondapak (Waters Associates Inc.) et on élue la colonne avec un système solvant consistant en un mélange 1:2:2 d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. Pour les composés à groupement alkylthio en C_8 et C_{10} , le système solvant est un mélange
- 15 2:1:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. On effectue l'élution à une pression de 103,5 bars à un débit de 3 ml/minute en utilisant une pompe Waters 600 A (Waters Associates, Inc.) et une vitesse de papier de 0,5 cm/minute. On contrôle l'éluant avec un appareil de détection UV
- 20 Varian Vari-Chrom à 230 nm. Les produits peuvent également être analysés par spectrométrie de masse à désorption de champ (MSDC).

Selon ce mode opératoire général, on obtient les composés suivants de formule III où R^1 et R^4 sont OH, R^2

25 est H, R^3 est un groupement alkyloxy en C_1 - C_6 et R^5 est

- p-(n-octylthio)benzoyle
 p-(n-décylthio)benzoyle
 p-(n-dodécylthio)benzoyle
 p-(n-tétradécylthio)benzoyle
- 30 p-(n-octyl)benzoyle*
 3-[p-(n-hexyloxy)phényl]propanoyle
 3-[p-(n-octyloxy)phényl]propanoyle
 3-[p-(n-dodécyloxy)phényl]propanoyle
 p-(n-hexyloxy)cinnamoyle
- 35 p-(n-octyloxy)cinnamoyle
 [p-(n-octyloxy)phényl]acétyle
 [p-(n-dodécyloxy)phényl]acétyle
 3-[p-(n-pentyloxy)phényl]propanoyle

3-ip-(n-heptyloxy)phénylpropanoyle

p-(n-octyloxy)phénoxyacétyle

p-(n-décyloxy)phénoxyacétyle

6-(n-octyloxy)nicotinoyle

5 6-(n-dodécyloxy)nicotinoyle

* Mieux préparé par le procédé au chlorure d'acide, par exemple en faisant réagir le chlorure de p-(n-octyl)-benzoyle avec le noyau dans la pyridine à la température ambiante sous azote pendant 24 heures.

EXEMPLE 5

10 Préparation des dérivés de S31794/F-1

On prépare les dérivés du noyau de S31794/F-1 en général à partir des esters 2,4,5-trichlorophényliques illustrés dans la Préparation 27 selon le mode opératoire suivant :

- 15 Au noyau de S31794/F-1 dissous dans 10 à 50 ml de DMF, on ajoute l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide alcoxybenzoïque ou de l'acide (alkylthio)benzoïque (rapport molaire 1:2). On agite le mélange réactionnel pendant 15-18 heures, après quoi on l'amène à siccité pour obtenir un
- 20 résidu. On lave le résidu (deux fois chaque) avec un mélange de 50 ml d'éther diéthylique et de 50 ml de chlorure de méthylène. On rejette les produits de lavage. On dissout le résidu restant dans un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol et on le chromatographie sur une
- 25 colonne de 100 ml de gel de silice (Woelm, 90-210 μ) en utilisant comme éluant le système solvant susmentionné. On contrôle les fractions de la chromatographie par CCM sur gel de silice (Merck) en utilisant comme système solvant un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol. On
- 30 réunit les fractions contenant le produit désiré et on chasse le solvant pour obtenir le produit sous forme d'un résidu. Le produit peut être analysé par CLPE à phase inversée comme suit : dans les composés à groupement alcoxy et les composés à groupement alkylthio en C_{12} - C_{14} , on
- 35 dissout l'échantillon dans un mélange 1:2:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. On injecte la solution d'échantillon (1 mg/ml) dans une colonne en acier inoxydable de 0,63 cm x 30 cm garnie de résine C_{18} Micro

Sondapak (Waters Associates Inc.) et on élue la colonne avec un système solvant consistant en un mélange 1:2:2 d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. Pour les composés à groupement alkylthio en C_8 et C_{10} , le système solvant est un mélange 5 2:1:2 en volume d'eau, de méthanol et d'acétonitrile. On effectue l'élution à une pression de 103,5 bars à un débit de 3 ml/min en utilisant une pompe Waters 600 A (Waters Associates, Inc.) et une vitesse de papier de 0,5 cm/min. On contrôle l'éluant avec un appareil de détection UV

10 Varian Vari-Chrom à 230 nm. Les produits peuvent également être analysés par spectrométrie de masse à désorption de champ (MSDC).

En suivant ce mode opératoire général, on obtient les composés suivants de formule III où R^1 , R^3 et R^4 sont tous OH, R^2 est $-CO-NH_2$ et R^5 est :

- p-(n-octylthio)benzoyle
- p-(n-décylthio)benzoyle
- p-(n-dodécylthio)benzoyle
- p-(n-tétradécylthio)benzoyle
- 20 p-(n-octyl)benzoyle*
- 3-[p-(n-hexyloxy)phényl]propanoyle
- 3-[p-(n-octyloxy)phényl]propanoyle
- 3-[p-(n-dodécyloxy)phényl]propanoyle
- p-(n-hexyloxy) cinnamoyle
- 25 p-(n-octyloxy) cinnamoyle
- [p-(n-octyloxy)phényl]acétyle
- [p-(n-dodécyloxy)phényl]acétyle
- 3-[p-(n-pentyloxy)phényl]propanoyle
- 3-[p-(n-heptyloxy)phényl]propanoyle
- 30 p-(n-octyloxy)phénoxyacétyle
- p-(n-décyloxy)phénoxyacétyle
- 6-(n-octyloxy)nicotinoyle
- 6-(n-dodécyloxy)nicotinoyle

* Mieux préparé par le procédé au chlorure d'acide, par exemple en faisant réagir le chlorure de p-(n-octyl)-benzoyle avec le noyau dans la pyridine à la température ambiante sous azote pendant 24 heures.

Le mode opératoire suivant illustre la préparation des composés de formule III. Les composés particuliers préparés

par le mode opératoire donné ci-dessous sont les composés de formule III où R^5 est un groupement p-(n-octyloxy)-benzoyle.

Préparation 28

5 Préparation de l'acide p-(n-octyloxy)benzoïque

On ajoute une solution de 19,2 g (150 mmoles) d'acide p-hydroxybenzoïque dans 120 ml d'hydroxyde de sodium aqueux à 10 % à 480 ml de DMSO préalablement chauffés à 80°C. On ajoute goutte à goutte à la solution 28,95 g 10 (150 mmoles) de bromure de n-octyle. On agite le mélange réactionnel pendant 4 heures à la température ambiante, après quoi on le verse dans 1200 ml d'eau glacée. On ajoute 30 ml d'acide chlorhydrique concentré et on laisse le mélange reposer jusqu'à la fin de la précipitation. On recueille le 15 précipité, on le sèche et on le cristallise dans un mélange d'acétonitrile et d'eau, p.f. 97-99°C.

Analyse pour $C_{15}H_{22}O_3$:

Calculée : C, 71,97 ; H, 8,86

Trouvée : C, 71,72 ; H, 9,10.

20

Préparation 29

Préparation de l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide p-(n-octyloxy)benzoïque

On dissout dans 200 ml de chlorure de méthylène 6,18 g (24,7 mmoles) d'acide p-(n-octyloxy)benzoïque, 25 5,39 g (27,2 mmoles) de 2,4,5-trichlorophénol et 4,94 g (24,7 mmoles) de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. On agite le mélange à la température ambiante pendant 18 heures puis on le filtre. On évapore le filtrat pour obtenir une huile que l'on cristallise dans un mélange d'acétonitrile et d'eau 30 pour obtenir l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide p-(n-octyloxy)benzoïque.

Analyse RMN : δ 4,02 (2H, t, $J = 3\text{Hz}$), δ 7,0 (1H, d, $J = 4\text{Hz}$), 7,23 (s, 1H), 7,3 (s, 1H), 8,08 (d, 1H, $J = 4\text{Hz}$).

35

EXEMPLE 8

Acylation du noyau de A-30912A

On dissout dans 150 ml de diméthylformamide 14,2 g (17,8 mmoles) du noyau de A-30912A et 15,32 g (35,7

mmoles) de l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide p-(n-octyloxy)benzoïque. On agite la solution à la température ambiante pendant 16-20 heures. On chasse le solvant sous vide et on lave le résidu deux fois avec de l'éther diéthylique et deux fois avec du chlorure de méthylène. On rejette les liquides de lavage. On dissout le résidu lavé dans 80 ml de 25 % d'acétate d'éthyle dans du méthanol et on le purifie par CLPE en utilisant une unité "Prep LC/System 500" (Waters Associates, Inc.,) en utilisant du gel de silice comme phase stationnaire. On élue la colonne par étapes avec des systèmes solvants contenant de 20 % à 40 % de méthanol dans de l'acétate d'éthyle. On analyse les fractions par CCM en utilisant du gel de silice (Merck) et un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol comme système solvant. On réunit les fractions exemptes de noyau de A-30912A et on les lyophilise pour obtenir le dérivé p-(n-octyloxy)benzoylé du noyau de A-30912A. On en obtient 7,13 g ; $M^+ + 23 = 1052$ (par SMDC).

EXEMPLE 9

20 Acylation du noyau de A-30912B

On dissout dans 150 ml de diméthylformamide 17,8 mmoles du noyau de A-30912B et 35,7 mmoles d'ester 2,4,5-trichlorophénylique d'acide p-(n-octyloxy)benzoïque. On agite la solution à la température ambiante pendant 16-20 heures. On chasse le solvant sous vide et on lave le résidu deux fois avec de l'éther diéthylique et deux fois avec du chlorure de méthylène. On rejette les liquides de lavage. On dissout le résidu lavé dans 80 ml d'un mélange à 25 % d'acétate d'éthyle dans du méthanol et on le purifie par CLPE en utilisant une unité "Prep LC/System 500" (Waters Associates, Inc.) en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire. On élue la colonne par étapes avec des systèmes solvants contenant de 20 % à 40 % de méthanol dans de l'acétate d'éthyle. On analyse les fractions par CCM en utilisant du gel de silice (Merck) et un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol comme système solvant. On réunit les fractions exemptes de noyau A-30912B et on les lyophilise pour obtenir le dérivé p-(n-octyloxy)benzoylé

du noyau de A-30912B.

EXEMPLE 10

En suivant le mode opératoire de l'Exemple 9 mais en substituant le bromure d'alkyle approprié, l'acide p-5 (alkyloxy)benzoïque approprié et l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide p-(alkyloxy)benzoïque approprié, on obtient les composés suivants de formule III :

R^5

- 10 p-(n-décyloxy)benzoyle
p-(n-dodécyloxy)benzoyle
p-(n-tétradécyloxy)benzoyle
p-(n-hexyloxy)benzoyle

EXEMPLE 11

Acylation du noyau de A-30912D

- 15 On dissout dans 150 ml de DMF 17,8 mmoles du noyau de A-30912D et 35,7 mmoles de l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide p-(n-octyloxy)benzoïque. On agite la solution à la température ambiante pendant 16-20 heures. On chasse le solvant sous vide et on lave le résidu
20 deux fois avec de l'éther diéthylique et deux fois avec du chlorure de méthylène. On rejette les liquides de lavage. On dissout le résidu lavé dans 80 ml d'un mélange de 25 % d'acétate d'éthyle dans du méthanol et on le purifie par
25 CLPE en utilisant une unité "Prep LC/System 500" (Waters Associates, Inc.) en utilisant du gel de silice comme phase fixe. On élue la colonne par étapes avec des systèmes solvants contenant de 20 % à 40 % de méthanol dans de l'acétate d'éthyle. On analyse les fractions par CCM en utilisant du
30 gel de silice (Merck) et un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol comme système solvant. On réunit les fractions exemptes de noyau A-30912D et on les lyophilise pour obtenir le dérivé p-(n-octyloxy)benzoylé du noyau de A-30912D.

EXEMPLE 12

- 35 En suivant le mode opératoire de l'Exemple 11 mais en substituant le bromure d'alkyle approprié, l'acide p-alkyloxybenzoïque approprié et l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide p-alkyloxybenzoïque approprié, on

obtient les composés suivants de formule III :

$$\text{R}^5$$

p-(n-décyloxy)benzoyle

p-(n-dodécyloxy)benzoyle

5 p-(n-tétradécyloxy)benzoyle

p-(n-hexyloxy)benzoyle

EXEMPLE 13

Acylation du noyau de A-30912H

On dissout dans 150 ml de DMF 17,8 mmoles de noyau
10 de A-30912H et 35,7 mmoles de l'ester 2,4,5-trichloro-
phénylique de l'acide p-(n-octyloxy)benzoïque. On agite la
solution à la température ambiante pendant 16-20 heures. On
chasse le solvant sous vide et on lave le résidu deux fois
avec de l'éther diéthylique et deux fois avec du chlorure de
15 méthylène. On rejette les liquides de lavage. On dissout le
résidu lavé dans 80 ml d'un mélange contenant 25 % d'acétate
d'éthyle et du méthanol et on le purifie par CLPE en
utilisant une unité "Prep IC/System 500" (Waters Associates,
Inc.) en utilisant du gel de silice comme phase fixe. On
20 élue la colonne par étapes avec des systèmes solvants
contenant de 20 % à 40 % de méthanol et d'acétate d'éthyle.
On analyse les fractions par CCM en utilisant du gel de
silice (Merck) et un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle
et de méthanol comme système solvant. On réunit les
25 fractions exemptes de noyau de A-30912H et on les lyophilise
pour obtenir le dérivé p-(n-octyloxy)benzoylé du noyau de
A-30912H.

EXEMPLE 14

En suivant le mode opératoire de l'Exemple 13 mais
30 en utilisant le bromure d'alkyle approprié, l'acide p-
alkyloxybenzoïque approprié et l'ester 2,4,5-trichloro-
phénylique d'acide p-alkyloxybenzoïque approprié, on obtient
les composés suivants de formule III :

$$\text{R}^5$$

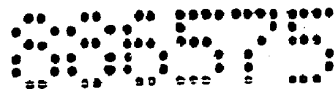
35 p-(n-décyloxy)benzoyle

p-(n-dodécyloxy)benzoyle

p-(n-tétradécyloxy)benzoyle

p-(n-hexyloxy)benzoyle

Me

EXEMPLE 15

Le mode opératoire suivant illustre la préparation du dérivé p-(n-octyloxy)benzoylé du noyau de A-30912H à partir du noyau de A-30912A.

On traite le noyau de A-30912A par le p-(n-octyl-
5 oxy)benzoate de 2,4,5-trichlorophénylie selon le mode opératoire de l'Exemple 1. On méthyle le dérivé ainsi obtenu en traitant le produit (20 mg) avec 0,06 ml de 3 % d'HCl dans du méthanol dans 1 ml de DMF. On laisse la solution reposer sous agitation pendant 16 heures, après quoi on
10 chasse le solvant sous pression réduite et on obtient un résidu. On purifie le résidu par CLPE à phase inversée en utilisant une résine gel de silice/C₁₈.

EXEMPLE 16Acylation du noyau de S31794/F-1

15 On dissout dans 150 ml de diméthylformamide 17,8 mmoles du noyau de S31794/F-1 et 35,7 mmoles de l'ester 2, 4,5-trichlorophénylique de l'acide p-(n-octyloxy)benzoïque. On agite la solution à la température ambiante pendant 16-20 heures. On chasse le solvant sous vide et on lave le
20 résidu deux fois avec de l'éther diéthylique et deux fois avec du chlorure de méthylène. On rejette les liquides de lavage. On dissout le résidu lavé dans 80 ml d'un mélange contenant 25 % d'acétate d'éthyle dans du méthanol et on le purifie par CLPE en utilisant une unité "Prep LC/System 500"
25 (Waters Associates, Inc.) en utilisant du gel de silice comme phase fixe. On élue la colonne par étapes avec des systèmes solvants contenant de 20 % à 40 % de méthanol dans de l'acétate d'éthyle. On analyse les fractions par CCM en utilisant du gel de silice (Merck) et un mélange 3:2 en
30 volume d'acétate d'éthyle et de méthanol comme système solvant. On réunit les fractions exemptes de noyau de S31794/F-1 et on les lyophilise pour obtenir le dérivé p-(n-octyloxy)-benzoylé du noyau de S31794/F-1.

EXEMPLE 17

35 En suivant le mode opératoire de l'Exemple 16 mais en utilisant le bromure d'alkyle approprié avec l'acide p-alkyloxybenzoïque approprié et l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide p-alkyloxybenzoïque approprié, on

MC

obtient les composés suivants de formule III :

$$\text{R}^5$$

- 5
- p-(n-décyloxy)benzoyle
 - p-(n-dodécyloxy)benzoyle
 - p-(n-tétradécyloxy)benzoyle
 - p-(n-hexyloxy)benzoyle

Le mode opératoire suivant illustre la préparation des composés de formule III où A est un groupement sulfonyle ou sulfinyle.

10 Préparation 30

Préparation de l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide p-(alkylsulfonyl)benzoïque

- A une solution de 970 mg (2 mmoles) de p-(n-décylothio)benzoate de 2,4,5-trichlorophényle dans 20 ml de
- 15 chlorure de méthylène refroidie dans un bain de glace, on ajoute 442 mg (2,0 mmoles) d'acide m-chloroperbenzoïque. Après avoir laissé le mélange réactionnel se réchauffer jusqu'à la température ambiante (15 minutes), on le lave deux fois avec 25 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 N. On
- 20 cristallise dans l'acétonitrile la phase organique après l'avoir séchée sur sulfate de sodium anhydre. On obtient 470 mg de produit. On réoxyde le produit comme décrit précédemment en utilisant 108 mg d'acide perbenzoïque dans 20 ml de chlorure de méthylène et une durée de réaction de
- 25 50 minutes. Le produit est purifié comme décrit ci-dessus et l'on obtient 260 mg de produit.

Analyse pour $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{Cl}_3\text{S}$:

Calculée : C, 54,61 % ; H, 5,38 %

Trouvée : C, 54,90 % ; H, 5,45 %

- 30 On peut préparer d'autres esters 2,4,5-trichlorophényliques d'acides p-(alkylsulfonyl)benzoïques par le mode opératoire décrit ci-dessus, les produits obtenus étant tels qu'indiqués ci-dessous :

MC

<u>p-Alkylsulfonyl- benzoate de 2,4,5- trichlorophényle</u>	<u>Poids de réactif ester (mg)</u>	<u>Poids d'a- gent oxydant (mg)</u>	<u>Poids de produit (mg)</u>
<u>n-octyle</u>	850	451	68,8
5 <u>n-dodécyle</u>	1260	686	400
<u>n-tétradécyle</u>	1150	651	400

EXEMPLE 18Acylation du noyau de A-30912A

On laisse sous agitation à la température ambiante pendant 18 heures une solution de 400 mg (0,5 mmole) du noyau de A-30912A et de 260 mg (0,514 mmole) de l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide p-(n-décylsulfonyl)-benzoïque dans 50 ml de diméthylformamide. On évapore le mélange réactionnel à siccité sous vide et on extrait le résidu deux fois avec de l'éther diéthylique et du chlorure de méthylène. Puis on applique le résidu, dissous dans une quantité minimale d'un mélange 3:2 en volume d'acétate d'éthyle et de méthanol, sur une colonne de gel de silice (50 ml) et on élue avec le même système solvant. On suit le cours de la chromatographie par CCM sur gel de silice (Merck) en utilisant comme système solvant un mélange 3:2 d'acétate d'éthyle et de méthanol. On réunit les fractions contenant le produit ($R_f \approx 0,6$), on les évapore à siccité et on les lyophilise. On obtient 415 mg du dérivé p-(n-décylsulfonyl)benzoylé du noyau de A-30912A. L'analyse de spectre de masse avec désorption de champ indique que ($M^+ + 23$) = 1128. La CLPE analytique montre que le produit est constitué par un seul composant.

En suivant le mode opératoire précédent, on peut préparer comme indiqué ci-dessous d'autres dérivés p-(alkylsulfonyl)benzoylés du noyau de A-30912A.

000000

Dérivé p-Alkyl- sulfonyl- benzoylé	Poids de noyau (mg)	Poids de réactif ester (mg)	Poids de produit (mg)	M ⁺ [Na] ⁺
n-octyle	400	69	83	--
n-dodécyle	400	267	335	1156
n-tétradécyle	400	281	322	1184

Mc

Préparation 31Préparation de l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide p-(alkylsulfinyl)benzoïque

A une solution de 2,23 g (5 mmoles) de p-(n-octylthio)benzoate de 2,4,5-trichlorophényle dans 50 ml de chlorure de méthylène, refroidie dans un bain de glace, on ajoute goutte à goutte une solution de 1,39 g (8 mmoles) d'acide m-chloroperbenzoïque dans 50 ml de chlorure de méthylène. On agite la solution à 5°C pendant environ deux heures puis à la température ambiante pendant environ deux heures. Après addition de 2 à 3 gouttes d'une solution à 20 % de Na₂SO₃, on lave le mélange réactionnel une fois avec une solution à 10 % de NaHCO₃ et deux fois avec de l'eau. On sèche la couche organique sur sulfate de magnésium et on la concentre sous vide, ce qui donne un résidu qu'on cristallise dans un mélange 1:4 d'éther diéthylique et d'éther de pétrole, pour obtenir 1,7 g d'un produit qui est un mélange des dérivés sulfinylé et sulfonylé.

EXEMPLE 1920 Acylation du noyau de A-30912A

On fait réagir une solution de 800 mg (1 mmole) de noyau de A-30912A dans 25 ml de DMF avec le produit obtenu dans la Préparation 31 (922 mg, 2 moles) comme décrit dans l'Exemple 18 pour obtenir 952 mg de produit mixte. On chromatographie ce produit sur gel de silice (100 g d'une dimension de 74-149 µ), en utilisant un système solvant 3:2 d'acétate d'éthyle et de méthanol. On rechromatographie sur gel de silice les premières fractions obtenues de cette colonne (554 mg), en utilisant comme solvant d'élution de l'acétate d'éthyle auquel on ajoute des quantités croissantes de méthanol. On réunit les fractions en se basant sur les résultats obtenus en CCM. Après élution du dérivé p-(n-octylsulfonyl)benzoylé du noyau de A-30912A (58 mg), on élue le dérivé p-(n-octylsulfinyl)benzoylé du noyau de A-30912A et l'on obtient 145 mg de ce produit.

EXEMPLE 20Acylation du noyau de A-30912B

On effectue l'acylation du noyau de A-30912B par le mode opératoire décrit dans l'Exemple 18 en utilisant l'ester

2,4,5-trichlorophénylique de l'acide alkylsulfonylbenzoïque approprié.

Des exemples des dérivés à groupement p-(alkylsulfonyl)benzoyle du noyau de A-30912B sont ceux de formule III dans laquelle R⁵ est un groupement p-(n-octylsulfonyl)benzoyle, p-(n-décylsulfonyl)benzoyle, p-(n-dodécylsulfonyl)benzoyle et p-(n-tétradécylsulfonyl)benzoyle.

Quand A est un groupement sulfinyle, on modifie en conséquence les conditions précédentes. Quand la réaction donne un mélange de produits, par exemple le produit sulfinylé et le produit sulfonylé, des séparations chromatographiques peuvent être nécessaires pour obtenir le produit sulfinylé désiré. Le composé de formule III où R⁵ est un groupement p-(n-octylsulfinyl)benzoyle est un exemple d'un tel produit.

EXEMPLE 21

Acylation du noyau de A-30912D

On effectue l'acylation du noyau de A-30912D par le mode opératoire décrit dans l'Exemple 18, en utilisant l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide alkylsulfonylbenzoïque approprié.

Des exemples des dérivés p-alkylsulfonylbenzoylés du noyau de A-30912D sont ceux de formule III dans laquelle R⁵ est un groupement p-(n-octylsulfonyl)benzoyle, p-(n-décylsulfonyl)benzoyle, p-(n-dodécylsulfonyl)benzoyle et p-(n-tétradécylsulfonyl)benzoyle.

Quand A est un groupement sulfinyle, les conditions précédentes sont modifiées en conséquence. Quand la réaction donne un mélange de produits, par exemple le produit sulfinylé et le produit sulfonylé, des séparations chromatographiques peuvent être nécessaires pour obtenir le produit sulfinylé désiré. Le composé de formule III dans laquelle R⁵ est un groupement p-(n-octylsulfinyl)benzoyle est un exemple d'un tel produit.

EXEMPLE 22

Acylation du noyau de A-30912H

On effectue l'acylation du noyau de A-30912H par le mode opératoire décrit dans l'Exemple 18, en utilisant

l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide alkylsulfonylbenzoïque approprié.

Des exemples des dérivés p-alkylsulfonylbenzoylés du noyau de A-30912H sont ceux de formule III où R^5 est un
5 groupement p-(n-octylsulfonyl)benzoyle, p-(n-décylsulfonyl)benzoyle, p-(n-dodécylsulfonyl)benzoyle et p-(n-tétra-décylsulfonyl)benzoyle.

Quand A est un groupement sulfinyle, on modifie en conséquence les conditions précédentes. Quand la réaction
10 donne un mélange de produits, par exemple le produit sulfinylé et le produit sulfonylé, des séparations chromatographiques peuvent être nécessaires pour obtenir le produit sulfinylé désiré. Le composé de formule III dans laquelle R^5 est un groupement p-(n-octylsulfinyl)benzoylé et R^3 un groupement
15 méthoxy, est un exemple d'un tel produit.

EXEMPLE 23

Acylation du noyau de S31794/F-1

On effectue l'acylation du noyau de S31794/F-1 par le mode opératoire décrit dans l'Exemple 18, en
20 utilisant l'ester 2,4,5-trichlorophénylique de l'acide alkylsulfonylbenzoïque approprié.

Des exemples des dérivés p-alkylsulfonylbenzoylés du noyau de S31794/F-1 sont ceux de formule III dans laquelle R^5 est un groupement p-(n-octylsulfonyl)benzoyle, p-(n-décylsulfonyl)benzoyle, p-(n-dodécylsulfonyl)benzoyle et
25 p-(n-tétradécylsulfonyl)benzoyle.

Quand A est un groupement sulfinyle, on modifie en conséquence les conditions précédentes. Quand la réaction donne un mélange de produits, par exemple le produit
30 sulfinylé et le produit sulfonylé, des séparations chromatographiques peuvent être nécessaires pour obtenir le produit sulfinylé désiré. Le composé de formule III dans laquelle R^5 est un groupement p-(n-octylsulfinyl)benzoyle est un exemple d'un tel produit.

35

EXEMPLE 24

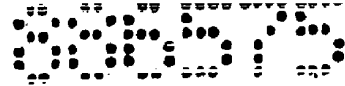
On peut démontrer et mettre en évidence l'activité antifongique des composés de formule III in vitro dans des essais de diffusion de disque et des essais de dilution sur

nc

gélose classiques, et in vivo dans des essais classiques sur les souris qui montrent l'efficacité vis-à-vis d'une infection fongique systémique. Les résultats des essais antifongiques de composés types de formule III (Exemples 3 5 et 4) sont donnés dans les Tableaux 10, 11, 12 et 13.

Les Tableaux 10 et 11 donnent les résultats de l'essai in vitro des composés des Exemples 3 et 4 par les méthodes de diffusion de disque sur plaque de gélose. Dans le Tableau 10, l'activité est mesurée par la dimension 10 (diamètre en mm) de la zone d'inhibition du micro-organisme observée que produit le composé d'essai. Dans le Tableau 11, l'activité est mesurée par la concentration inhibitrice minimale (CIM) de la substance ($\mu\text{g}/\text{disque}$) nécessaire pour inhiber la croissance de l'organisme d'essai. Le Tableau 12 15 donne les résultats de l'essai in vitro du dérivé p-(n-octyloxy)benzoylé du noyau de A-30912A [Formule III, R^5 est un groupement p-(n-octyloxy)benzoyle] vis-à-vis de cinq souches de Candida albicans par la méthode de dilution sur gélose. Dans le Tableau 12, l'activité est mesurée par la 20 CIM de la substance ($\mu\text{g}/\text{ml}$) nécessaire pour inhiber l'organisme d'essai.

Les résultats d'essais in vivo destinés à démontrer l'efficacité des composés des Exemples 1 et 18 vis-à-vis d'une infection provoquée par Candida albicans 25 A-26 chez les souris sont donnés dans le Tableau 13, où l'activité est mesurée par la DE_{50} (dose en mg/kg nécessaire pour guérir 50 % des animaux d'essai). Dans un essai séparé, dont les résultats sont également résumés dans le Tableau 13, l'activité est indiquée par la plus faible dose à 30 laquelle on observe un essai antifongique significatif. Dans cet essai, on infecte par voie intraveineuse avec Candida albicans A-26 des groupes de souris albinos mâles (exemptes de pathogènes particuliers) pesant 18 à 20 g. On traite les animaux par rayons X 24 heures avant l'infection 35 à environ 50 roentgens par minute pendant 8 minutes (dose totale de 400) pour réduire leurs réactions immunologiques à l'organisme infectieux. A 0, 4 et 24 heures après l'infection, on donne à chaque groupe de souris des doses



progressives sous-cutanées du composé d'essai sous forme d'une suspension dans un mélange à 33 % de polyéthylène-glycol (PEG) dans de l'eau. On note le jour de la mort pour chaque animal. Une comparaison statistique par l'essai "t" de Student du jour moyen de la mort est effectuée entre chaque groupe d'animaux infectés-traités à une dose particulière et un groupe de dix animaux infectés-non traités pour déterminer si le traitement prolonge de façon significative la durée de survie.

10 Le Tableau 14 donne les résultats de l'essai des composés des Exemples 1 et 18 en vue de leur absorption après administration par voie orale. Dans cet essai, on gave des souris avec une dose de 416 mg/kg de composé d'essai en suspension dans un mélange à 33 % de PEG 400 dans de
15 l'eau. A des intervalles de temps, on prélève des échantillons de sang du sinus orbital et on détermine leur activité antibiotique comme suit : on place un disque de 7 mm contenant 20 µl de sang entier sur de la gélose ensemencée avec Aspergillus montevidensis A35137. Après
20 40 heures d'incubation à 30°C, on compare les zones d'inhibition provenant des échantillons de sang à une référence obtenue à partir du composé d'essai et l'on calcule la quantité de composé dans l'échantillon de sang.

TABLEAU 10

Activité antifongique par l'essai de diffusion de disque sur plaque de gélose

Composé	Zone d'inhibition (mm) (a),			
	Saccharomyces pastorianus X-52	Neurospora crassa 846	Trichophyton mentagrophytes A-23	Candida albicans A-26
R ⁵ de formule V				
	18	23*	--	28
	13	--	--	18
	13	24*	--	19
	20	15	19*	19
	16	31	32	55
	--	37	26	48
	23	29	23	30

(a) Les composés sont testés sous forme d'une suspension dans le méthanol. Les composés sont testés à une concentration de 1 mg/ml en plongeant un disque de 7 mm dans la suspension et en le plaçant sur la surface de la gélose. Incubation : 24-48 heures à 25-37°C.

* Zone d'inhibition mesurable avec nouvelle croissance de l'organisme autour du disque.

MC

TABLEAU 11

Activité antifongique par l'essai de diffusion de disque sur plaque de gélose

Composé R ⁵ de formule V	CIM (µg/disque) (a)	
	Candida albicans A-26	Tricophyton mentagrophytes 6 ¹¹
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-$  $-\text{CO}-$	0,156	<0,039
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{O}-$  $-\text{CO}-$	0,156	<0,078
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-$  $-\text{CO}-$	2,5	<0,039
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{O}-$  $-\text{CO}-$	0,625	<0,078
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{S}-$  $-\text{CO}-$	0,312	<0,039
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{S}-$  $-\text{CO}-$	0,156	0,039

Tableau 11 (suite)

Activité antifongique par l'essai de diffusion de disque sur plaque de gélose

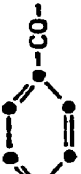
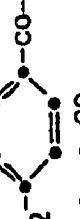
Composé R ⁵ de formule V	CIM (µg/disque) (a)	
	Candida albicans A-26	Tricophyton mentagrophytes 6 ²²
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{S}-$ 	2,5	<0,039
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{S}-$ 	20,0	<0,039
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{SO}_2-$ 	20	0,312
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SO}_2-$ 	2,5	0,156
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_2-$ 	0,625	0,078
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{SO}_2-$ 	0,625	0,039
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-$ 	10	>40

Tableau 11 (suite)
Activité antifongique par l'essai de diffusion de disque sur plaque de gélose

Composé	CIM (µg/disque) (a)	
R ⁵ de formule V	Candida albicans A-26	Tricophyton mentagrophytes 6::
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{O}-$ 	2,5	>40
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-$ 	2,5	>40
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{O}-$ 	40	40
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{O}-$ 	2,5	0,312
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{SO})-$ 	5	1,25
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-$ 	0,625	0,156
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$ 	20	1,25

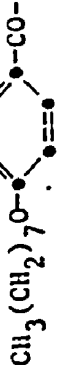
Tableau 11 (suite)

Activité antifongique par l'essai de diffusion de disque sur plaque de gélose

Composé R ⁵ de formule V	CIM (ug/disque) (a)	
	Candida albicans A-26	Tricophyton mentagrophytes 6
	0,625	0,156
	0,078	0,156
	0,312	0,156
	1,25	40
	1,25	0,156
	0,156	0,156
	5	80

Tableau 11 (suite)

Activité antifongique par l'essai de diffusion de disque sur plaque de gélose

Composé R ⁵ de formule V	CIM (µg/disque) (a)	
	Candida albicans A-26	Tricophyton mentagrophytes 6 ¹¹
	0,312	0,625
	5	0,156
	0,625	0,156
	0,312	80
	0,156	<0,156
	80	2,5

(a) Les composés sont en suspension dans une solution 0,1 M de borate de sodium, pH 7,5. Les composés sont essayés à 20 µg/disque au niveau supérieur et à des doubles dilutions jusqu'à ce qu'on atteigne des points finals. Incubation : 24 heures à 30°C.

": Zones d'inhibition mesurables avec nouvelle croissance de l'organisme autour du disque.

Activité in vitro de dérivés du noyau de A-30912A contre cinq souches de *Candida albicans*.

Composé	CIM (µg/ml)				
⁵ R de formule V	A-26	SBH16	SBH31	SBH28	SBH29
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{-O-CO-}$ 	0,312	0,312	0,312	0,312	0,312
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{S-CO-}$ 	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{S-CO-}$ 	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

91C

Tableau 13

Activité thérapeutique vis-à-vis de *Candida albicans* A-26

chez les souris:

Composé	DE ₅₀ (mg/kg) :	Dose active la plus faible (mg/kg)
5 R de formule V		
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-$ 	13 22,2	10 <12,5
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{O}-$ 	8	5
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-$ 	< 5 3,9	< 5 2,5
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{O}-$ 	3	5
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{S}-$ 	37,4	10
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{S}-$ 	28	20

Tableau 13

Activité thérapeutique vis-à-vis de *Candida albicans* A-26
chez les souris:

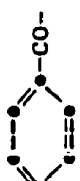
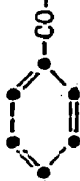
R ⁵ de formule V	DE ₅₀ (mg/kg)::::	Dose active la plus faible (mg/kg)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	2	<1,25
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	20	2,5
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{SO}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	57	--
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SO}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	57	--
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	53	20
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{SO}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	11	5

Tableau 13

Activité thérapeutique vis-à-vis de *Candida albicans* A-26
chez les souris

R ⁵ de formule V	DE ₅₀ (mg/kg) :	Dose active la plus faible (mg/kg)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-$ 	>50	40
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{O}-$ 	>50	>40
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-$ 	>50	>40
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{O}-$ 	>50	>40
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{O}-$ 	28	20
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{SO})-$ 	56, 6	>40

Tableau 13

Activité thérapeutique vis-à-vis de *Candida albicans* A-26
chez les souris

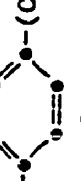
R ⁵ de formule V	DE ₅₀ (mg/kg) :	Dose active la plus faible (mg/kg)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	30	40
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	>40	40
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	9, 2	5
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	4, 5	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	4, 5	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$ 	>40	20

Tableau 13

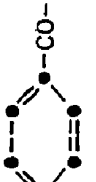
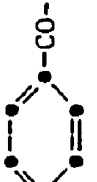
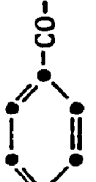
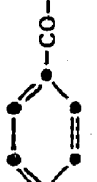
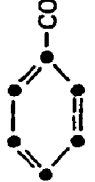
Activité thérapeutique vis-à-vis de *Candida albicans* A-26
chez les souris^{***}

R ⁵ de formule V	DE ₅₀ (mg/kg) ^{***}	Dose active la plus faible (mg/kg)
<chem>CC(C)COc1ccc(C=C)cc1C(=O)O</chem>	21,8	5
<chem>CC(C)COc1ccc(C=C)cc1C(=O)O</chem>	3,75	5
<chem>CC(C)COc1ccc(C=C)cc1C(=O)O</chem>	>40	10
<chem>CC(C)COc1ccc(C=C)cc1C(=O)O</chem>	8,4	10
<chem>CC(C)COc1ccc(C=C)cc1C(=O)O</chem>	16,8	10
<chem>CC(C)COc1ccc(C=C)cc1C(=O)O</chem>	7,4	20

^{**} Programmes de doses : A = 40, 20, 15 et 10 mg/kg ; les doses sont administrées 0, 4 et 24 heures après l'injection, sous forme d'une suspension du composé d'essai dans un mélange à 30 % de PEG dans l'eau. Nombre de souris recevant les composés d'essai pour chaque dose : 6 souris par groupe. Nombre de souris dans le groupe témoin (non traitées) : 10 souris.

^{***} Telle que mesurée par l'augmentation de la durée de survie des animaux traités par rapport aux témoins, calculée par la méthode de Reed v Mueuch, American J. Hygiene, 27, 493 (1938).

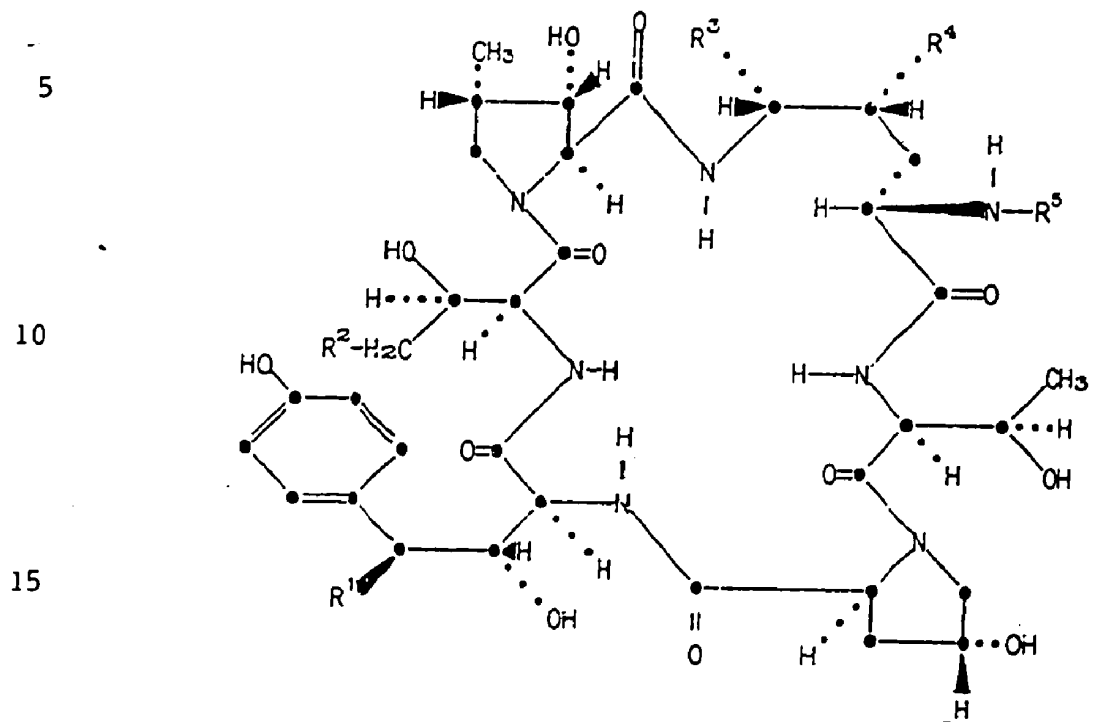
Tableau 14

Taux dans le sang après administration orale chez les souris	
Composé	Taux dans le sang le plus élevé déterminé pendant un intervalle de 4 heures (µg/ml)
R ⁵ de formule V	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{O}-$  $-\text{CO}-$	23
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{O}-$  $-\text{CO}-$	<0,1
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-$  $-\text{CO}-$	5
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{O}-$  $-\text{CO}-$	5
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{S}-$  $-\text{CO}-$	<0,1
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{S}-$  $-\text{CO}-$	5
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{S}-$  $-\text{CO}-$	30
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{S}-$  $-\text{CO}-$	230

* Le composé d'essai est administré à une dose de 416 mg/kg par gavage, sous forme d'une suspension du composé dans 33 % de PEG 400 dans l'eau. L'activité antifongique est déterminée par essai biologique vis-à-vis d'Aspergillus montevidensis A-35137.

REVENDICATIONS

1. Composés de formule :



III

20 dans laquelle R¹ est H ou OH et

quand R¹ est H, R² est H et R³ et R⁴ sont tous deux H ou tous deux OH,

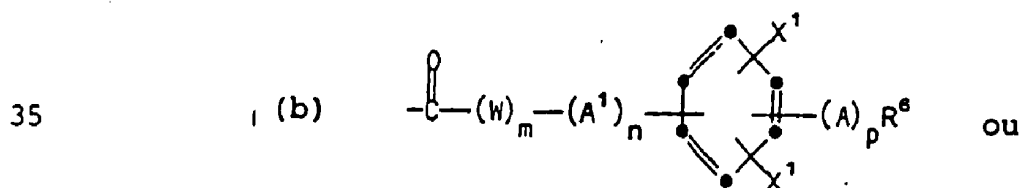
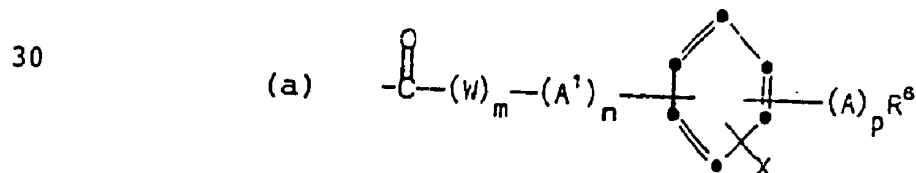
et

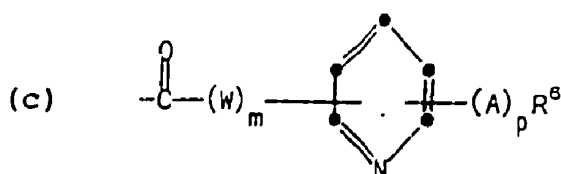
quand R¹ est OH, R² est H, R³ est OH ou un

groupement alkyloxy en C₁-C₆ et R⁴ est OH, ou bien R² est -CO-NH₂ et R³ et R⁴ sont tous deux OH,

et

R⁵ est un groupement de formule :



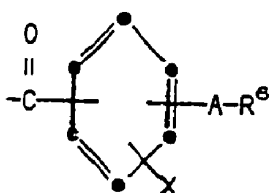


5

où A est un radical divalent oxygène, soufre, sulfinyle ou sulfonyle ; A¹ est un radical divalent oxygène, soufre, sulfinyle, sulfonyle ou -NH- ; X est un atome d'hydrogène ou un radical chloro, bromo, iodo, nitro, alkyle en C₁-C₃,
 10 hydroxy, alcoxy en C₁-C₃, mercapto, alkylthio en C₁-C₃, carbamyle ou alkylcarbamyle en C₁-C₃ ; X¹ est un atome de chlore, de brome ou d'iode ; R⁶ est un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle en C₁-C₁₈ ou alcényle en C₂-C₁₈ ; W est un groupement alkylène en C₁-C₁₀ ou alcénylène en C₂-C₁₀ ;
 15 m, n et p sont 0 ou 1, mais si m = 0, n doit être égal à zéro ; pourvu que la somme des atomes de carbone des groupements R⁶ et W soit supérieure à 4 mais ne puisse dépasser 21 ; que, quand X est un groupement mercapto, A et A¹ ne puissent être des groupements sulfinyle ou sulfonyle
 20 et que, quand A et A¹ sont des groupements sulfinyle ou sulfonyle, ils soient dans des états d'oxydation égaux.

2. Composé selon la revendication 1, où R⁵ est un groupement benzoyle substitué de formule :

25



30

où A est un radical divalent oxygène, soufre, sulfinyle ou sulfonyle, X est un atome d'hydrogène, de chlore, de brome ou d'iode ou un groupement nitro, alkyle en C₁-C₃, hydroxy, alcoxy en C₁-C₃, mercapto, alkylthio en C₁-C₃, carbamyle ou
 35 alkylcarbamyle en C₁-C₃ ; et R⁶ est un groupement alkyle en C₁-C₁₈ ou alcényle en C₅-C₁₈.

3. Composé selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, où A est un atome d'oxygène.

MC

4. Composé selon la revendication 3, caractérisé en ce que R est un atome d'hydrogène et R⁶ est un groupement alkyle en C₅-C₁₈ à chaîne droite.

5. Composé selon la revendication 2, caractérisé en ce que R⁵ est un groupement p-(n-octyloxy)benzoyle, p-(n-décyloxy)benzoyle, p-(n-dodécyloxy)benzoyle, p-(n-tétradécyloxy)benzoyle ou p-(n-hexyloxy)benzoyle.

6. Composé selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que A est un atome de soufre.

7. Composé selon la revendication 6, caractérisé en ce que X est un atome d'hydrogène et R⁶ est un groupement alkyle en C₅-C₁₈ à chaîne droite.

8. Composé selon la revendication 6, caractérisé en ce que R⁵ est un groupement p-(n-octylthio)benzoyle, p-(n-décylthio)benzoyle, p-(n-dodécylthio)benzoyle ou p-(n-tétradécylthio)benzoyle.

9. Composé selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que A est un groupement sulfonyle.

10. Composé selon la revendication 9, caractérisé en ce que X est un atome d'hydrogène et R⁶ est un groupement alkyle en C₅-C₁₈ à chaîne droite.

11. Composé selon la revendication 9, caractérisé en ce que R⁵ est un groupement p-(n-octylsulfonyl)benzoyle, p-(n-décylsulfonyl)benzoyle, p-(n-dodécylsulfonyl)benzoyle ou p-(n-tétradécylsulfonyl)benzoyle.

12. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R⁵ a la formule (a), X est un atome d'hydrogène et m, n et p sont égaux à zéro.

13. Composé selon la revendication 12, caractérisé en ce que R⁵ est un groupement p-(n-octyl)benzoyle.

14. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R⁵ a la formule (a), X est l'hydrogène, A est l'oxygène et n est zéro.

15. Composé selon la revendication 14, caractérisé en ce que R⁵ est un groupement 3-[p-(n-hexyloxy)phényl]-propanoyle, 3-[p-(n-octyloxy)phényl]propanoyle, 3-[p-(n-

dodécyloxy-phényl]propanoyle, p-(n-hexyloxy)cinnamoyle, p-(n-octyloxy)cinnamoyle, [p-(n-octyloxy)phényl]acétyle, [p-(n-dodécyloxy)phényl]acétyle, 3-[p-(n-pentyloxy)phényl]propanoyle ou 3-[p-(n-heptyloxy)phényl]propanoyle.

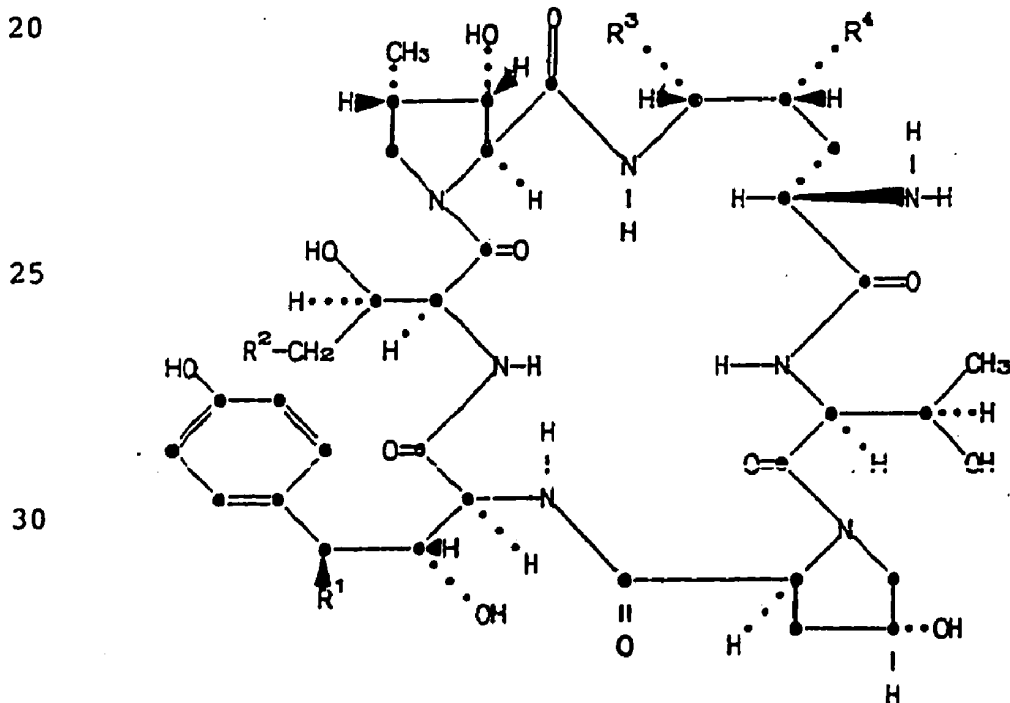
5 16. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R⁵ a la formule (a), X est un atome d'hydrogène et A et A¹ sont tous deux des atomes d'oxygène.

17. Composé selon la revendication 16, caractérisé en ce que R⁵ est un groupement p-(n-octyloxy)phénoxy-
10 acétyle ou p-(n-décyloxy)phénoxyacétyle.

18. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R⁵ a la formule (c).

19. Composé selon la revendication 18, caractérisé en ce que R⁵ est un groupement 6-(n-octyloxy)nicotinoyle,
15 6-(n-dodécyloxy)nicotinoyle ou p-(n-décyloxy)cinnamoyle.

20. Procédé de préparation d'un composé de formule III, caractérisé en ce qu'il consiste à acyler un noyau peptidique cyclique de formule



dans laquelle R¹ est H ou OH et
quand R¹ est H, R² est H et R³ et R⁴ sont tous deux
H ou tous deux OH,

et

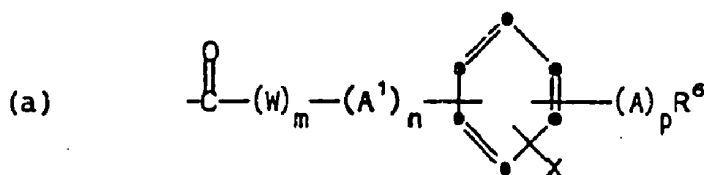
quand R^1 est OH, R^2 est H, R^3 est OH ou un groupement alkyloxy en C_1-C_6 et R^4 est OH, ou bien R^2 est un groupement

5

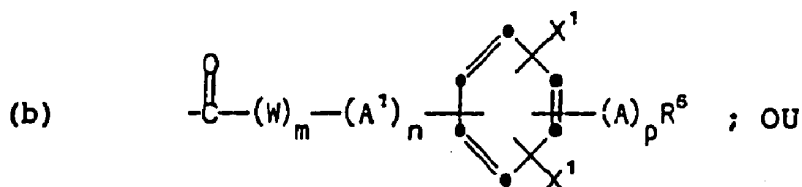
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$ et R^3 et R^4 sont tous deux OH,

avec un dérivé activé du composé substitué de formule IV (a), (b) ou (c) correspondant à la chaîne latérale acyle désirée (R^5) où R^5 a la formule :

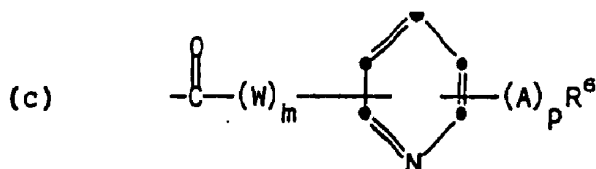
10



15



20

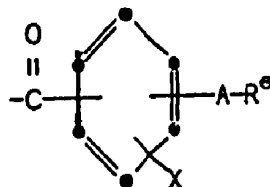


25

où A est un radical divalent oxygène, soufre, sulfinyle ou sulfonyle ; A^1 est un radical divalent oxygène, soufre, sulfinyle, sulfonyle ou $-\text{NH}-$; X est un atome d'hydrogène ou un radical chloro, bromo, iodo, nitro, alkyle en C_1-C_3 , hydroxy, alcoxy en C_1-C_3 , mercapto, alkylthio en C_1-C_3 , carbamyle ou alkylcarbamyle en C_1-C_3 ; X^1 est un atome de chlore, de brome ou d'iode ; R^6 est un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle en C_1-C_{18} ou alcényle en C_2-C_{18} ; W est un groupement alkylène en C_1-C_{10} ou alcénylène en C_2-C_{10} ; m, n et p sont 0 ou 1, mais si $m = 0$, n doit être égal à zéro ; pourvu que la somme des atomes de carbone des groupements R^6 et W soit supérieure à 4 mais ne puisse dépasser 21 ; que, quand X est un groupement mercapto, A et

A^1 ne puissent être des groupements sulfinyle ou sulfonyle et que, quand A et A^1 sont des groupements sulfinyle ou sulfonyle, ils soient dans des états d'oxydation égaux.

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R^5 est un groupement benzoyle substitué de formule :



10

dans laquelle A est un radical divalent oxygène, soufre, sulfinyle ou sulfonyle, X est un atome d'hydrogène, de chlore, de brome ou d'iode ou un groupement nitro, alkyle en C_1-C_3 , hydroxy, alcoxy en C_1-C_3 , mercapto, alkylthio en C_1-C_3 , carbamyle ou alkylcarbamyle en C_1-C_3 ; et R^6 est un groupement alkyle en C_5-C_{18} ou alcényle en C_5-C_{18} .

22. Procédé selon l'une ou l'autre des revendications 20 et 21, caractérisé en ce que A est un atome d'oxygène.

23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que X est un atome d'hydrogène et R^6 est un groupement alkyle en C_5-C_{18} à chaîne droite.

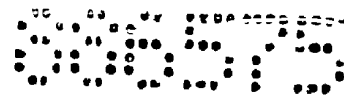
24. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que R^5 est un groupement p-(n-octyloxy)benzoyle, p-(n-décyloxy)benzoyle, p-(n-dodécyloxy)benzoyle, p-(n-tétradécyloxy)benzoyle ou p-(n-hexyloxy)benzoyle.

25. Procédé selon l'une ou l'autre des revendications 20 et 21, caractérisé en ce que A est un atome de soufre.

26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que X est un atome d'hydrogène et R^6 est un groupement alkyle en C_5-C_{18} à chaîne droite.

27. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que R^5 est un groupement p-(n-octylthio)benzoyle, p-(n-décylthio)benzoyle, p-(n-dodécylthio)benzoyle ou p-(n-tétradécylthio)benzoyle.

28. Procédé selon l'une ou l'autre des



revendications 20 et 21, caractérisé en ce que A est un groupement sulfonyle.

29. Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que X est un atome d'hydrogène et R^5 est un groupement alkyle en C_5-C_{18} à chaîne droite.

30. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que R^5 est un groupement p-(n-octylsulfonyl)benzoyle, p-(n-décylsulfonyl)benzoyle, p-(n-dodécylsulfonyl)benzoyle ou p-(n-tétradécylsulfonyl)benzoyle.

10 31. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R^5 a la formule (a), X est un atome d'hydrogène et m, n et p valent zéro.

32. Procédé selon la revendication 31, caractérisé en ce que R^5 est un groupement p-(n-octyl)benzoyle.

15 33. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R^5 a la formule (a), X est un atome d'hydrogène, A est un atome d'oxygène et n est zéro.

34. Procédé selon la revendication 33, caractérisé en ce que R^5 est un groupement 3-[p-(n-hexyloxy)phényl]-
20 propanoyle, 3-[p-(n-octyloxy)phényl]propanoyle, 3-[p-(n-dodécyloxy)phényl]propanoyle, p-(n-hexyloxy)cinnamoyle, p-(n-octyloxy)cinnamoyle, [p-(n-octyloxy)phényl]acétyle, [p-(n-dodécyloxy)phényl]acétyle, 3-[p-(n-pentyloxy)phényl]-propanoyle ou 3-[p-(n-heptyloxy)phényl]propanoyle.

25 35. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R^5 a la formule (a), X est un atome d'hydrogène et A et A^1 sont tous deux un atome d'oxygène.

36. Procédé selon la revendication 35, caractérisé en ce que R^5 est un groupement p-(n-octyloxy)phénoxyacétyle
30 ou p-(n-décyloxy)phénoxyacétyle.

37. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que R^5 a la formule (c).

38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce que R^5 est un groupement 6-(n-octyloxy)nicotinoyle,
35 6-(n-dodécyloxy)nicotinoyle ou p-(n-décyloxy)cinnamoyle.

39. Composition antifongique contenant comme ingrédient actif un composé selon la revendication 1.

40. Composé de formule III, en substance tel que

Me

000000

décrit ci-avant avec référence particulière aux Exemples 1 à 23.

41. Procédé de préparation d'un composé de formule III, en substance tel que décrit ci-avant avec 5 référence particulière aux exemples 1 à 23.

ORIGINAL en CENT TREIZE
PAGES, comportant ZERO
mot nul et ZERO mot
rajouté.

Par Procuration de la Société dite :
ELI LILLY AND COMPANY
LA SOCIETE LANGNER PARRY
C/o M. Frank Seifert
77 Frans de Ceusterlei
SCHOTEN 2120 BELGIQUE.

le 8 décembre 1980

8/ Commune.