



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101981900000485
Data Deposito	27/03/1981
Data Pubblicazione	27/09/1982

Priorità	38889/80
Nazione Priorità	JP
Data Deposito Priorità	28-MAR-80

Titolo

DI-N6', 03-DEMETILISTAMICINA A AVENTE ATTIVITA' ANTIBATTERICA, E SUA
PREPARAZIONE

DOCUMENTAZIONE RILEGATA

DESCRIZIONE

Questa invenzione riguarda un nuovo derivato della istamicina A denominato come di-N^{6'},O³-demetilistamicina A (cioè 6'-N,3-O-didemetilistamicina A), che è un antibiotico amminoglicosidico sintetico utile come agente antibatterico, e un procedimento per la preparazione di questo ed anche usi terapeutici del nuovo derivato.

Si descrivono e si rivendicano nuovi ed utili antibiotici chiamati istamina A e istamina B che sono prodotti per mezzo di coltivazione di una nuova specie di Streptomyces, cioè Streptomyces tenjimariensis ceppo SS-939 (FERM-P 4932 o ATCC 31603) e che sono notevolmente attivi contro una grande varietà di batteri gram-negativi e gram-positivi (vedi "Journal of Antibiotics" 32, 964-966 (Settembre 1979); domanda di brevetto U.K. GB 2048855A pubblicata il 17/12/1980). Si sono condotti studi estensivi sulla produzione sintetica della istamicina A partendo dalla 3',4'-dideoossineamina (vedi "Journal of Antibiotics" 32, 1365-1366 (1979)). Durante un ulteriore sviluppo degli studi estensivi, è stato preparato con successo un nuovo derivato della istamicina A, di-N^{6'},O³-demetilistamicina A in un modo facile, e è stato trovato che la di-N^{6'},O³-demetilistamicina A presenta una elevata

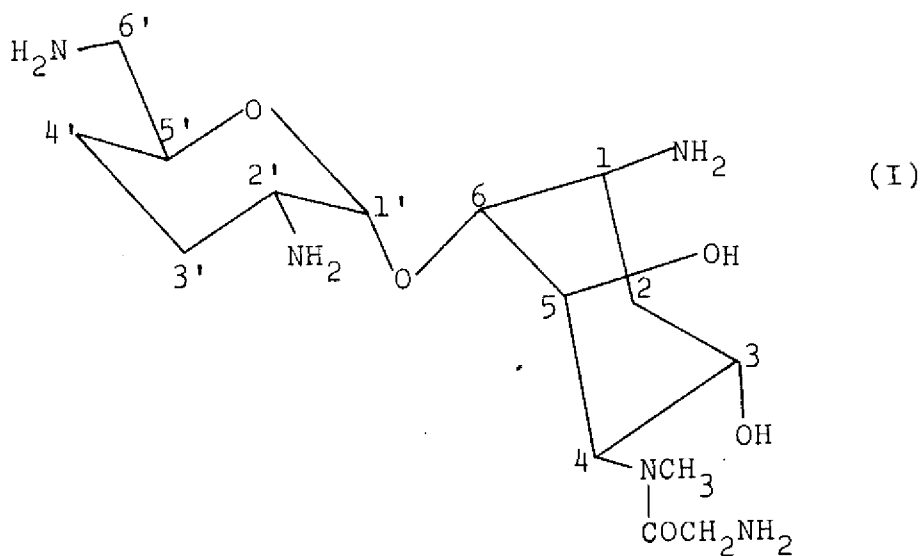
attività antibatterica contro una larga gamma di batteri gram-negativi e gram-positivi e in particolare una maggiore attività contro la Pseudomonas aeruginosa che istamicina A.

Uno scopo di questa invenzione è fornire un derivato antibiotico della istamicina A che è utile come agente antibatterico per il trattamento terapeutico di malattie da batteri dell'uomo e degli animali ed anche per la sterilizzazione di materiali e strumenti chirurgici. Un altro scopo dell'invenzione è fornire un procedimento per la sintesi di detto nuovo derivato antibiotico della istamicina A. Ulteriore scopo dell'invenzione è fornire una composizione farmaceutica comprendente il nuovo derivato antibiotico della istamicina A come ingrediente attivo.

Altri scopi e vantaggi risulteranno dalle seguenti descrizioni.

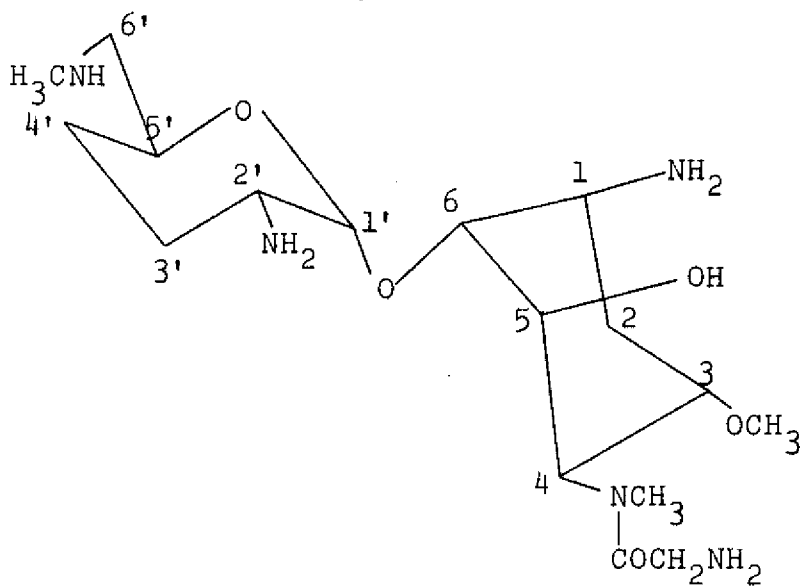
DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Secondo un primo aspetto di questa invenzione, sono **nuove** fornite, come sostanze antibiotiche, la di-N^{6'},O³-demetilistamicina A avente formula strutturale (I):



e sali acidi di addizione di questa.

La istamicina A ha la seguente formula strutturale:



Quindi, il composto di formula (I) è corrispondente a un derivato della istamicina A da cui sono stati eliminati i due gruppi metile del gruppo metossi in posizione 3 e del gruppo metilammino in posizione 6'.

Il nuovo composto (I) di questa invenzione ha le seguenti proprietà biologiche e fisico-chimiche:

Il monocarbonato di di-N^{6'},O³-demetilistamicina A è in forma di polvere incolore che non ha un punto di fusione definito, si decompone a 138-145°C, dà una rotazione ottica specifica di $[\alpha]_D^{22} + 136^\circ$ (c 0,36 in acqua) e indica un'analisi elementare: - Trovato: C, 45,39; H, 7,63; N, 16,42% che è conforme ai valori teorici di C₁₅H₃₁N₅O₅·H₂CO₃ (C, 45,38; H, 7,85; N, 16,54%). La spettrometria di massa del monocarbonato mostra il picco di (M+1)⁺ a m/e = 362 e la cromatografia in strato sottile di questo su gel di silice dà un punto singolo (positivo al reagente ninidrina) a R_F 0,06 se sviluppato con la fase inferiore di un solvente miscela di cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 28% (2:1:1 in volume) o a R_F 0,46 se sviluppato con un solvente miscela di butanolo-etanolo-cloroformio-ammoniaca acquosa al 17% (4:5:2:5 in volume).

Il composto di formula (I) di cui sopra presenta una elevata attività antibatterica contro una larga varietà di batteri gram-negativi e gram-positivi, come appare chiaro dagli spettri antibatterici indicati nella tabella 1 qui sotto, dove sono indicati per confronto anche quelli della istamicina A.

Le concentrazioni inibitorie minime (mcg/ml) indicate sono state determinate secondo un metodo standard di diluizione in serie su piastre di agar nutritiva che furono incubate ad una temperatura di 37°C per 17 ore. I risultati della tabella 1 rivelano che la di-demetil-istamicina A di questa invenzione è sostanzialmente più attiva particolarmente contro lo Pseudomonas aeruginosa della istamicina A.

Tabella 1

<u>Microorganismi di prova</u>	<u>Concentrazioni inibitorie minime (mcg/ml)</u>	
	<u>Di-demetil-istamicina A</u>	<u>Istamicina A</u>
<u>Staphylococcus aureus</u> FDA 209P	1.56	0.78
" " Smith	< 0.20	< 0.20
" " Ap01	1.56	0.78
<u>Staphylococcus epidermidis</u> 109	1.56	0.78
<u>Micrococcus flavus</u> FDA 16	3.13	3.13
<u>Sarcina lutea</u> PCI 1001	0.78	0.20
<u>Bacillus anthracis</u>	0.39	< 0.20
<u>Bacillus subtilis</u> PCI 219	< 0.20	< 0.20
" " NRRL B-558	< 0.20	0.39
<u>Bacillus cereus</u> ATCC 10702	3.13	3.13
<u>Corynebacterium bovis</u> 1810	1.56	1.56
<u>Mycobacterium smegmatis</u> ATCC 607	0.39	1.56

<u>Escherichia coli</u>	NIHJ	6.25	3.13
"	" K-12	6.25	1.56
"	" K-12 R5	100	3.13
"	" K-12 R388	1.56	0.78
"	" K-12 J5R11-2	3.13	3.13
"	" K-12 ML1629	3.13	3.13
"	" K-12 ML1630	12.5	3.13
"	" K-12 ML1410	6.25	3.13
"	" K-12 ML1410 R81	3.13	1.56
"	" K-12 LA290 R55	12.5	3.13

<u>Escherichia coli</u>	K-12 LA290 R56	3.13	1.56
"	" K-12 LA290 R64	3.13	1.56
"	" W677	3.13	1.56
"	" JR66/W677	6.25	3.13
"	" K-12 C600 R135	> 100	> 100
"	" JR225	3.13	1.56

<u>Klebsiella pneumoniae</u>	PCI602	3.13	1.56
"	" 22#3038	12.5	3.13

<u>Shigella dysenteriae</u>	JS11910	12.5	3.13
-----------------------------	---------	------	------

<u>Shigella flexneri</u>	4B JS11811	12.5	6.25
--------------------------	------------	------	------

<u>Shigella sonnei</u>	JS11756	6.25	6.25
------------------------	---------	------	------

<u>Salmonella typhi</u>	T-63	3.13	0.78
-------------------------	------	------	------

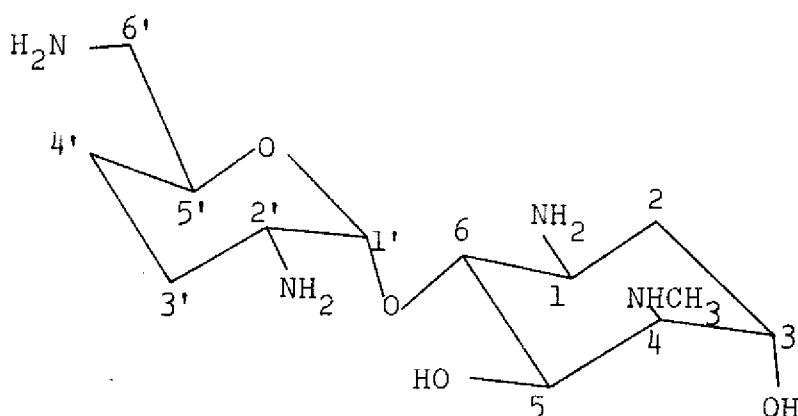
<u>Salmonella enteritidis</u>	1891	6.25	3.13
-------------------------------	------	------	------

<u>Proteus vulgaris</u>	OX19	1.56	0.78
-------------------------	------	------	------

<u>Proteus rettgeri</u> GN311	50	25
" " GN466	12.5	6.25
<u>Serratia marcescens</u>	12.5	6.25
<u>Serratia</u> sp. SOU	> 100	> 100
<u>Serratia</u> sp. 4	50	50
<u>Providencia</u> sp. Pv16	12.5	6.25
<u>Providencia</u> sp. 2991	12.5	25
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> A3	3.13	6.25
" " No.12	25	100
" " H9	12.5	25
" " H11	50	100
" " TI-13	12.5	25
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> GN 315	25	25
" " 99	> 100	> 100
" " B-13	> 100	> 100
" " 21-75	> 100	> 100
" " PST 1	50	100
" " ROS 134/ PV 21	50	100
" " K-Ps 102	12.5	50
<u>Pseudomonas maltophilia</u> GN 907	> 100	> 100

Il composto di questa invenzione, di-N^{6'},O³-demetilistamicina A è ottenuto usualmente in forma di base libera o suo idrato o carbonato, che può essere convertita nella forma di qualunque sale acido di addizione non tossico farmaceuticamente accettabile per mezzo di reazione con un acido farmaceuticamente accettabile in un modo convenzionale. Esempi di acidi farmaceuticamente accettabili da usare a questo scopo includono acidi inorganici come l'acido cloridrico, bromidrico, solforico e nitrico e acidi organici come l'acido acetico, malico, citrico, ascorbico e metansolfonico.

In accordo con un secondo aspetto di questa invenzione, viene fornito un procedimento per preparare il composto di formula (I) di cui sopra, che comprende bloccare simultaneamente con un gruppo ammino-protettivo i tre gruppi ammino nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- del composto di formula strutturale (VIII):



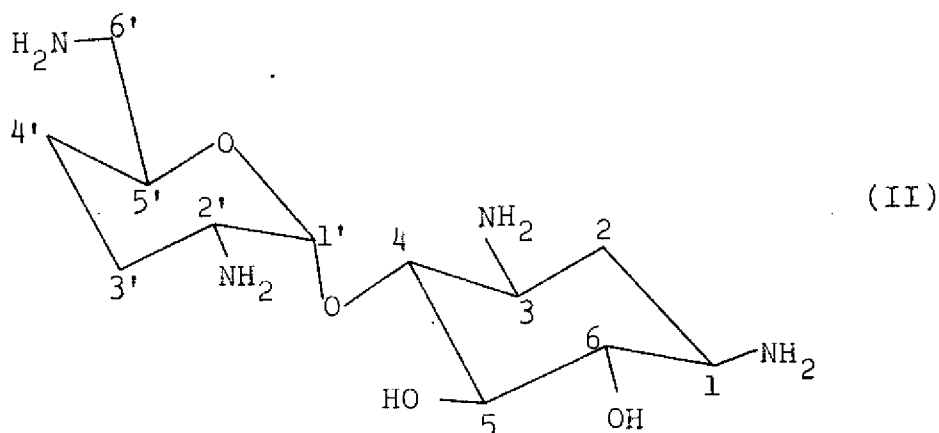
(VIII)

far reagire il risultante derivato tri-N-protetto del composto (VIII) con glicina o glicina N-protetta il cui gruppo ammino è stato bloccato con un gruppo ammino-protettivo o con equivalente funzionale di detta glicina per acilare il gruppo ^{metil}ammino non protetto in posizione 4- del composto (VIII); e rimuovere tutti i rimanenti gruppi ammino-protettivi dal prodotto dell'acilazione. Il procedimento di questa invenzione può includere inoltre una fase di conversione del composto (I) così prodotto nel suo sale acido di addizione o di conversione di un sale acido di addizione del composto prodotto nella base libera o altro sale acido di addizione di questa per mezzo di un metodo convenzionale.

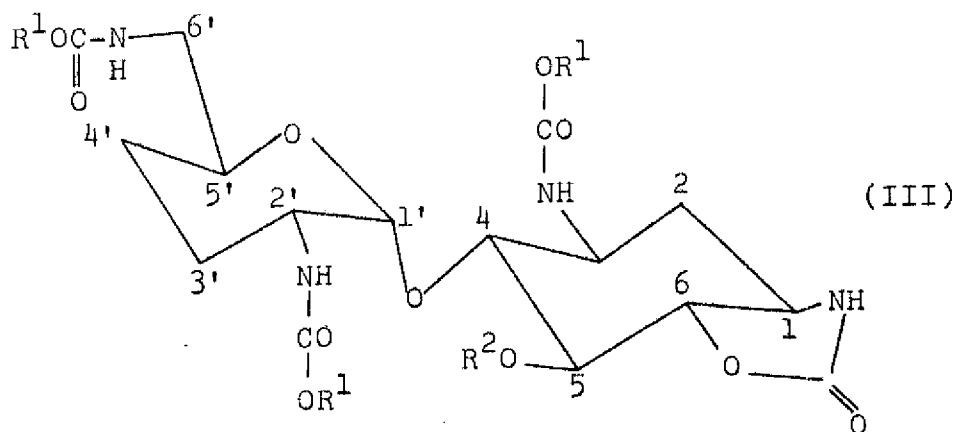
Il composto di partenza avente formula (VIII) da usare nel presente procedimento, che è designato come N⁴-deglicil-di-N^{6'},O³-demetilistamicina A, può essere preparato usando come materiale iniziale 3',4'-dideossineamina che, a sua volta, può essere fatta con tecnica nota descritta nel "Journal of Antibiotics" 24, 711-712 (1971) o nel "Bulletin of the Chemical Society of Japan" 46, 3507-3510 (1973).

Il metodo di preparazione del composto iniziale (VIII) è riassunto come segue:- I quattro gruppi ammino esistenti nella 3',4'-dideossineamina di formula

(II):

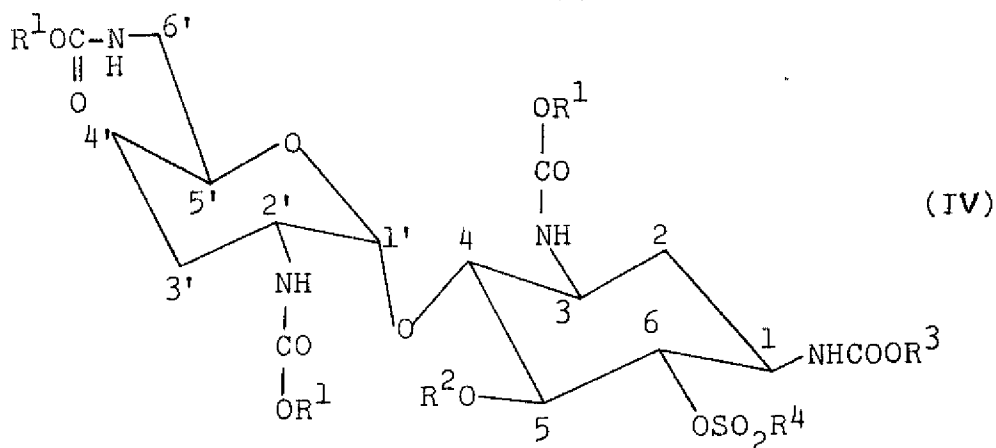


sono bloccati con un gruppo ammino-protettivo di un tipo formante uretano e quindi convertiti nel derivato carbammato 1,6-ciclico del composto (II) N-protetto trattando con una base come un idruro di metallo alcalino. Il gruppo idrossile in posizione 5- del derivato carbammato 1,6-ciclico è bloccato con un gruppo idrossil-protettivo per produrre un composto di formula (III):

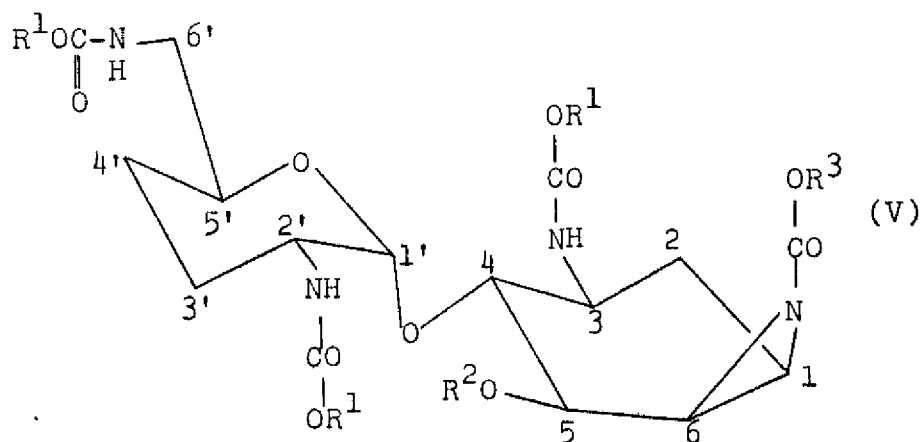


in cui ciascun R^1OCO rappresenta il gruppo ammino-protettivo monovalente di tipo formante uretano dove R^1 è un gruppo alchile (per es. alchile di 1 - 6 atomi di

carbonio), un gruppo cicloalchile (per es. cicloalchile di 5-6 atomi di carbonio) o un gruppo aralchile (per es. fenil- $C_1 - 4$ alchile come benzile) e R^2 rappresenta un gruppo alchile (per es. alchile di 1-6 atomi di carbonio), un gruppo benzile o un gruppo tetra-idropiraniile come il gruppo idrossil-protettivo. Successivamente, il composto di formula (III) è trattato con un alcali come idrato acquoso di sodio o bario per idrolizzare l'anello del carbammato 1,6-ciclico, seguito da protezione del risultante gruppo ammino libero in posizione 1- con un gruppo ammino protettivo di tipo formante uretano diverso dal sopradetto gruppo ammino protettivo R^1OCO- , e da solfonilazione del risultante gruppo idrossile libero nella posizione 6- con un reagente di solfonilazione avente formula R^4SO_3H o un equivalente reattivo di questo per produrre un composto di formula (IV):

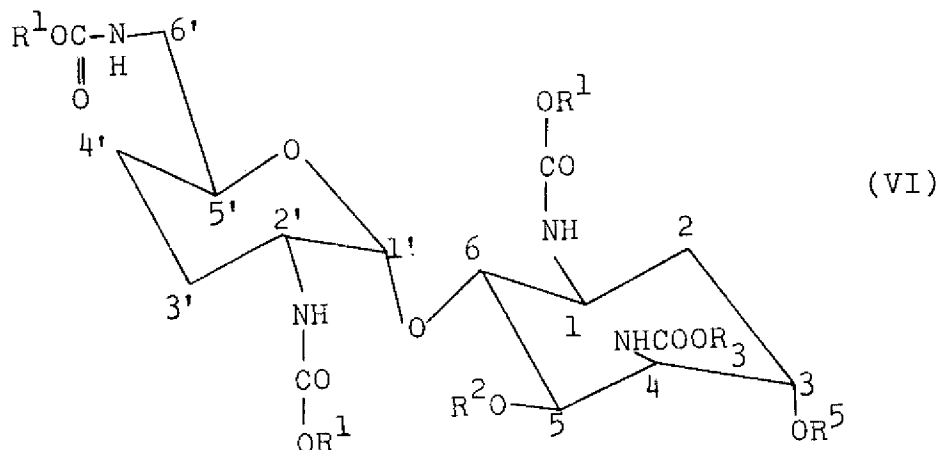


in cui R^1 e R^2 hanno gli stessi significati di cui sopra, R^3OCO- rappresenta il gruppo ammino-protettivo monovalente di tipo formante uretano dove R^3 è un gruppo alchile (per es. alchile di 1 - 6 atomi di carbonio), un gruppo cicloalchile (per es. cicloalchile di 5 - 6 atomi di carbonio) o un gruppo aralchile (per es. benzile) ma diverso dal gruppo R^1 , e R^4 rappresenta un gruppo alchile (per es. alchile di 1 - 4 atomi di carbonio), arile (per es. fenile o metilfenile) o aralchile (per es. benzile). Il composto di formula (IV) è quindi trattato con una base come alcoolato di metallo alcalino per formare un composto portante un anello aziridinico ed avente la formula (V):

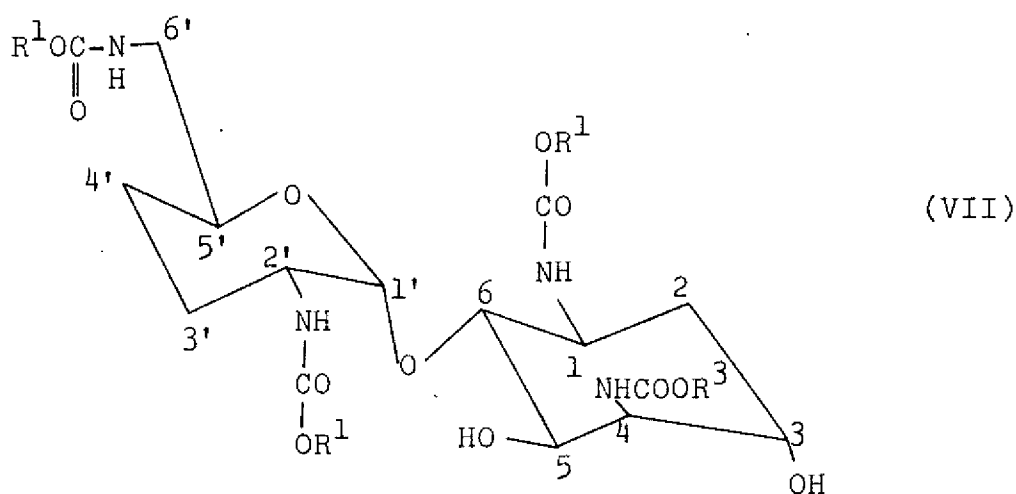


in cui R^1 , R^2 e R^3 sono definiti come sopra. Il composto di formula (V) è ulteriormente trattato con un sale di metallo alcalino di un acido organico come un acido alcanoico inferiore o acido benzoico per aprire l'anello

aziridinico, producendo in tal modo un composto di formula (VI):



in cui R^1 , R^2 e R^3 sono come definiti sopra e R^5 rappresenta un gruppo acile come il gruppo alcanoilico o benzoile che trae origine dall'acido organico impiegato. I gruppi idrossil-protettivi (R^2 e R^5) nelle posizioni 3- e 5- del composto (VI) vengono rimossi da quest'ultimo in un modo convenzionale. Se necessario (cioè, quando il gruppo 4-ammino-protettivo $-COOR^3$ è stato eventualmente rimosso durante il trattamento con il sale di metallo alcalino di ~~acido organico~~ o simultaneamente alla rimozione dei gruppi idrossil-protettivi R_2 , R_5), viene nuovamente introdotto un ulteriore gruppo ammino-protettivo ($-COOR^3$) di tipo formante uretano nel gruppo 4-ammino libero, per dare un composto di formula (VII):

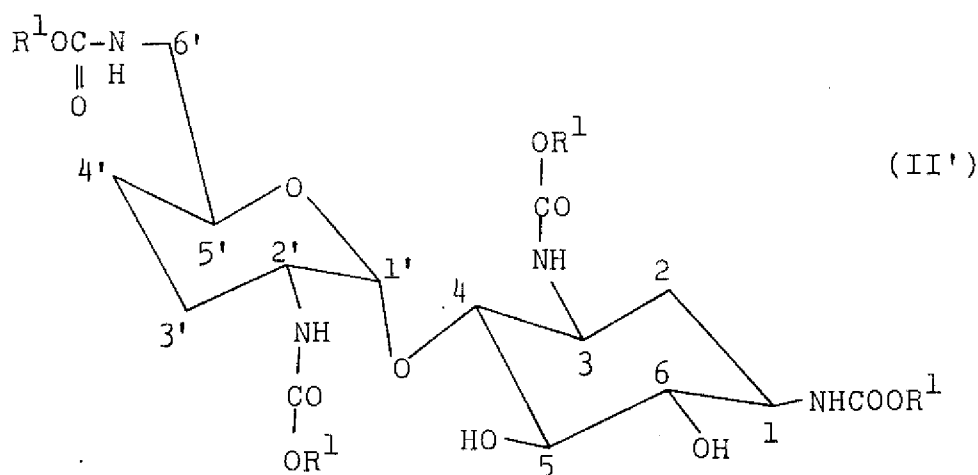


in cui R^1 e R^3 sono come definito sopra. Dopodiché, i gruppi ammino-protettivi ($-\text{COOR}^1$) nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- del composto (VII) sono rimossi da questo in una maniera usuale ma mantenendo il gruppo 4-ammino-protettivo ($-\text{COOR}_3$) deprotetto, seguito da riduzione con un idruro di metallo per convertire il gruppo 4-ammino protetto ($-\text{NHCOOR}^3$) nel gruppo metilammino-4. Viene così prodotto il composto avente formula (VIII) di cui sopra.

Viene data di seguito una descrizione di una applicazione preferenziale del metodo per la preparazione del composto di partenza (VIII).

Nella prima fase, i quattro gruppi ammino nelle posizioni 1-, 3-, 2'- e 6'-della 3',4'-dideossineamina avente formula (II) sono bloccati con un noto gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano per dare un derivato N-protetto della 3',4'-dideossineamina avente

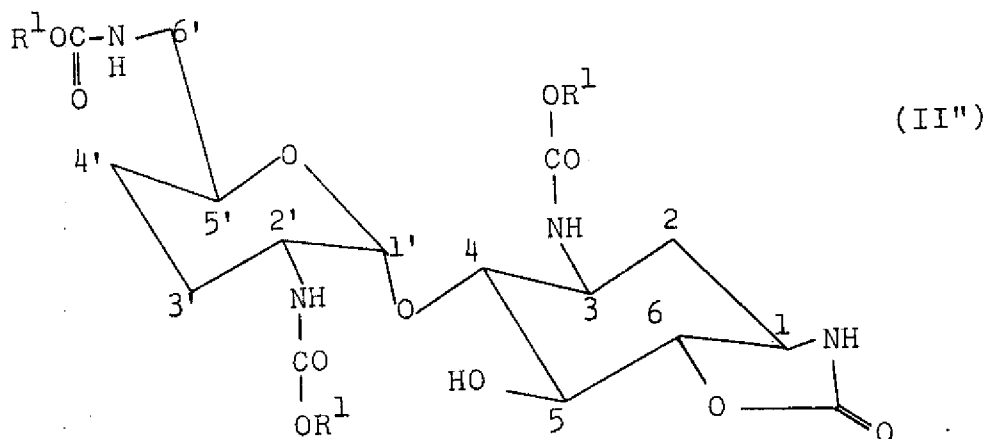
la formula (II'):



in cui ciascun R^1OCO- sta per il gruppo ammino-protettivo monovalente di tipo formante uretano dove R^1 è un gruppo alchile, cicloalchile o aralchile come descritto in precedenza. Il gruppo ammino-protettivo da usare per questo scopo è un tipo capace di far reagire il gruppo idrossile adiacente (dove esiste) per formare un anello carbammato ciclico una volta trattato con una base nella fase seguente. Esempi del gruppo ammino-protettivo atto a questo scopo comprendono i gruppi alchiossicarbonile di 2 - 7 atomi di carbonio come il tert-butossicarbonile e il tert-amilossicarbonile; i gruppi ciclo alchilossicarbonile di 6 - 7 atomi di carbonio come il cicloesilossicarbonile e i gruppi aralchilossicarbonile come il benzilossicarbonile e il para-metossiben_zilossicarbonile. Fra questi è preferibile usare un gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano che è

facilmente rimuovibile senza rompere il gruppo ammino-protettivo $-COOR_3$ che sarà stato introdotto in seguito nel gruppo 1-ammino del composto di formula (IV). A tal fine è raccomandabile selezionare un gruppo aralchilossicarbonile che può essere rimosso per idrogenolisi. L'introduzione del gruppo ammino-protettivo $-OCOR_1$ può essere eseguita facilmente con qualunque procedura convenzionale, per esempio, per mezzo di reazione con un noto reagente ammino-protettivo in forma di alogenuro acido, **azoturo acido**, o estere attivo.

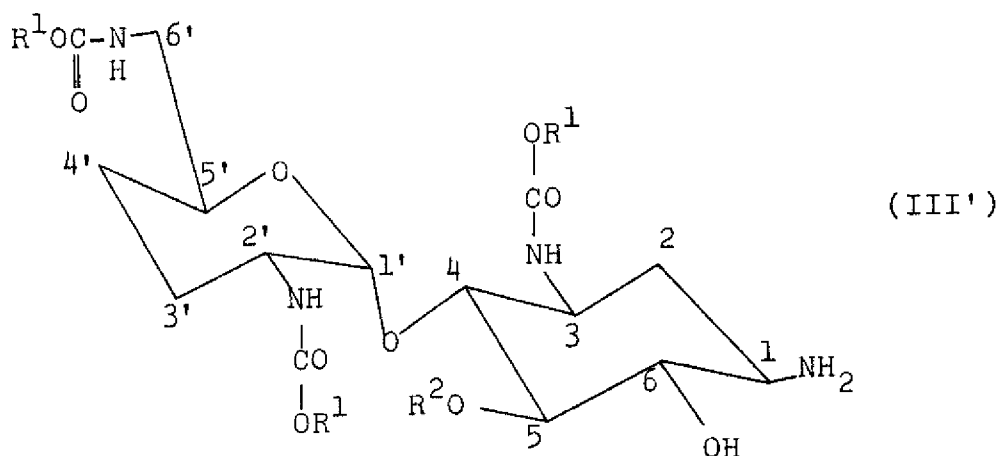
Nella seconda fase, il composto di formula (II') è trattato con una base come idruro di metallo per dare un composto in forma di carbammato 1,6-ciclico avente la formula (II''):



in cui R^1 è come definito sopra. Fra i quattro gruppi ammino-protettivi del composto (II') N-protetto, il gruppo ammino-protettivo in posizione 1- è fatto reagire facilmente persino a bassa

temperatura, per esempio, sotto 0°C con il gruppo idrossile adiacente nella posizione 6- per formare il carbammato ciclico quando sia trattato con una base come un idruro di metallo alcalino, per es. idruro di sodio o idruro di litio in un appropriato solvente organico come dimetilformammide anidra.

Nella terza fase, il gruppo idrossile in posizione 5- del composto carbammato ciclico (II") è bloccato con un noto gruppo idrossil-protettivo in un modo usuale per produrre un composto di formula (III) indicato precedentemente. Questa fase è seguita dal trattamento con un alcali acquoso per idrolizzare l'anello carbammato 1,6-ciclico dando luogo così ad un composto di formula (III'):



Il gruppo protettivo (R^2), per bloccare il gruppo 5-idrossile del composto (II"), deve essere non influenzabile dalle condizioni sotto le quali deve essere condotta l'idrolisi alcalina del composto carbammato

1,6-ciclico (III). Quindi, fra i noti gruppi idrossil-protettivi vengono selezionati quelli di tipo etere come eteri alchilici ed eteri benzilici e quelli di tipo acetale come il tetraidropiranile, i quali tutti possono essere introdotti nel gruppo 5-idrossile per mezzo di una qualunque tecnica convenzionale idrossil-protettiva. In particolare, per il gruppo idrossil-protettivo R^2 , si preferisce usare il gruppo tetraidropiranile che è facilmente rimuovibile per idrolisi in condizioni acide deboli.

La successiva idrolisi del composto carbammato 1,6-ciclico (III) può essere ottenuta con trattamento in una soluzione acquosa diluita di un alcaloide o di idrossido di metallo alcalino terroso come idrossido di sodio o idrossido di bario^e fa aprire l'anello carbammato 1,6-ciclico in forma di un amminoalcool libero rappresentato dalla formula (III') di cui sopra. L'idrolisi può essere preferibilmente eseguita ad una elevata temperatura compresa fra 40 e 60°C e ad una concentrazione di alcaloide di 0,1 M o minore. Queste condizioni di reazione non comportano la rimozione degli altri gruppi ammino- e idrossil-protettivi e quindi danno luogo alla formazione preferenziale del composto 1,6-amminoalcool di formula (III').

Inoltre, il gruppo 1-ammino liberato del composto (III') è bloccato con un gruppo ammino-protettivo ($-\text{COOR}_3$) di tipo formante uretano, che è diverso dal gruppo esistente $\text{R}^1\text{OCO}-$ per bloccare i gruppi ammino del composto (II), e il gruppo 6-idrossile è solfonilato per reazione con un reagente solfonilante, per esempio, un solfonil alogenuro di formula : $\text{R}^4\text{SO}_2\text{X}$ in cui R^4 è il gruppo alchile, arile o aralchile e X è un atomo di cloro o di bromo. In tal modo viene prodotto un composto di formula (IV) di cui sopra.

Come gruppo di tipo formante uretano di protezione del gruppo 1-ammino del composto (III'), si preferisce usare particolarmente un gruppo alchiossicarbonile, poiché quest'ultimo può essere selettivamente trattato nel composto che si deve produrre attraverso il successivo trattamento di rimozione degli altri gruppi ammino-protettivi nelle posizioni 3-, 2'- e 6'- ed è vantaggioso per la formazione riduttiva del gruppo metilammino in posizione 4- del composto (VII), come descritto più avanti.

La summenzionata solfonilazione del gruppo 6-idrossile può essere effettuata facilmente a temperatura ambiente con una buona resa per reazione in un opportuno solvente organico, come piridina secca, con un

noto reagente di solfonilazione come solfonil alogenuro di formula R^4SO_2X , specialmente metanosolfonil, para-toluenesolfonil o benzilsolfonil cloruro.

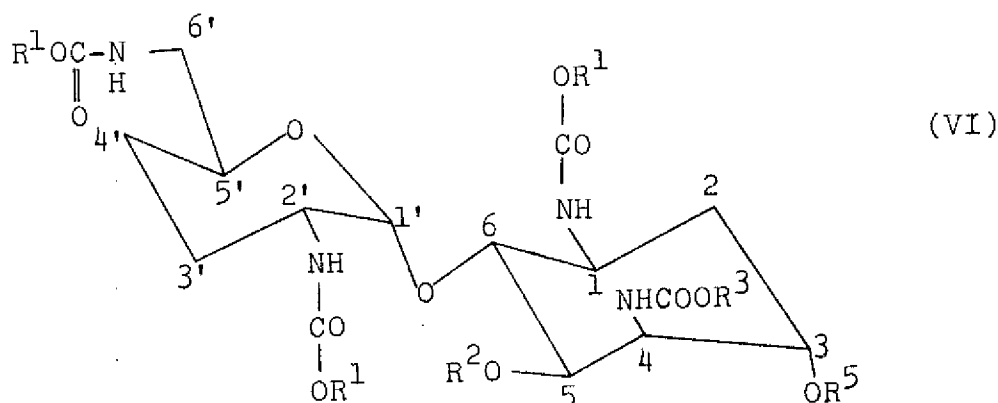
Nella fase successiva, il composto di formula (IV) è trattato con una base per formare un composto avente formula (V) di cui sopra portante l'anello aziridinico, seguito da ulteriore trattamento con un sale di metallo alcalino di un acido organico per aprire l'anello aziridinico.

Il composto di aziridina (V) può essere ottenuto con buona resa trattando il composto (IV) con una base come un alcoolato di metallo alcalino per esempio, alcoolato di sodio, specialmente metilato di sodio in un solvente organico anidro come tetraidrofurano secco. La reazione per formare l'anello aziridinico può procedere anche a bassa temperatura compresa fra 0 e 10°C alla quale temperatura la reazione può essere generalmente completata in 24 ore.

Il composto di aziridina (V) così prodotto, che è un importante nuovo intermedio per la preparazione del composto oggetto di questa invenzione, può essere sottoposto direttamente (cioè senza purificazione) alla successiva reazione di apertura dell'anello.

L'apertura dell'anello aziridinico nel composto

(V) può essere effettuata con una resa favorevole per reazione con un sale di metallo alcalino di un acido organico come un acido alcanoico inferiore o acido benzoico e specialmente, per esempio, con benzoato di sodio o acetato di sodio in un solvente organico anidro come dimetilformammide secca. La reazione dà una ulteriore forma di amminociclitolo avente la formula (VI):



in cui R^1 , R^2 e R^3 sono come definiti precedentemente, e R^5 è il gruppo acile come il gruppo alcanoile o benzoile che trae origine dall'acido organico impiegato.

Come si vede dalle formule (IV) e (VI), lo scambio fra la posizione del gruppo ammino e la posizione del gruppo idrossile ha luogo per l'apertura dell'anello aziridinico, quando generalmente il gruppo protettivo tipo uretano rimane nel gruppo ammino, mentre il gruppo acile derivante dall'acido organico usato nella reazione di apertura dell'anello è introdotto nel gruppo idrossile,

come indicato dalla formula (VI) di cui sopra. Rispetto alla nuova forma di amminociclitolo (1,4-diammino-1, 2,4-trideossiamminociclitol derivato) di formula (VI), la numerazione della parte caratteristica della molecola di amminociclitolo è basata su quella della formimicina e dell'istamicina. La stessa numerazione si applica alle formule (VII), (VII') e (VIII). Per quanto riguarda i composti di amminociclitolo (1,3-diammino-1,2,3-trideossi-amminociclitol derivati) rappresentati dalle formule (I) - (V) di cui sopra, la numerazione è basata su quella della 2-deossistreptamina.

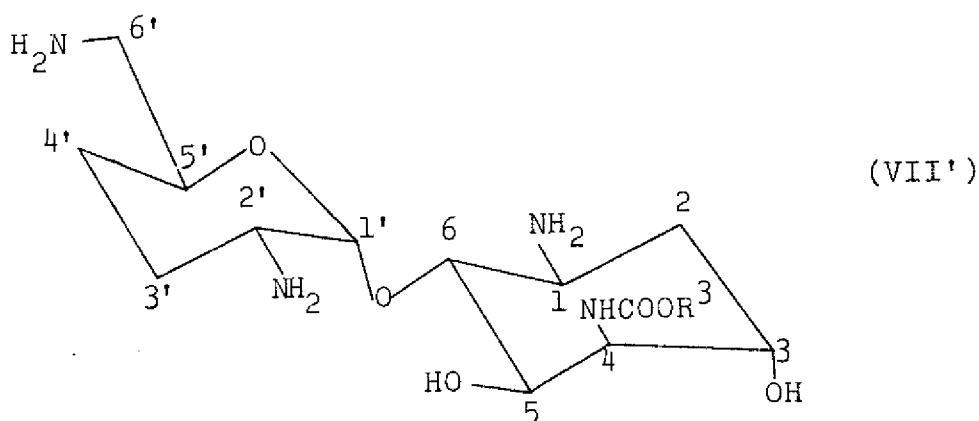
I gruppi idrossil-protettivi (R^2 e R^5) nelle posizioni 3- e 5- del composto (VI) sono quindi rimossi da quest'ultimo per produrre il composto di formula (VII) precedentemente indicato. Il gruppo acile (R^5) come gruppo idrossil-protettivo in posizione 3- può essere facilmente rimosso per mezzo di idrolisi alcalina con una comune base, per esempio, soluzione di ammoniaca metanolica, mentre il gruppo idrossil-protettivo (R^2) in posizione 5- come il gruppo tetraidopiranicile può essere rimosso per mezzo di idrolisi acida in condizioni acide deboli come già menzionato, per esempio, per trattamento con una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico ad una bassa temperatura compresa

fra 0 e 10°C.

In alcuni casi, il gruppo ammino-protettivo ($-\text{COOR}_3$) in posizione 4- può essere rotto nel corso della detta reazione per l'apertura dell'anello aziridinico o qualche volta simultaneamente alla rimozione dei gruppi idrossil-protettivi (R^2 , R^5). E' quindi necessario che il gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano, che è diverso da quello ($-\text{OCOR}^1$) usato per bloccare i gruppi 1-, 2'- e 6'-ammino, sia reintrodotta nel gruppo 4-ammino libero. Questo, per esempio, è il caso in cui il gruppo ammino-protettivo in posizione 4- è il gruppo tert-butossicarbonile che può essere rotto simultaneamente alla rimozione del gruppo idrossil-protettivo (R^2) in posizione 5- per mezzo di idrolisi acida debole. Il gruppo ammino-protettivo ($-\text{COOR}_3$) di tipo formante uretano da reintrodurre nel gruppo 4-ammino, in questo caso, dovrebbe essere possibilmente insensibile alla reazione successiva per la rimozione degli altri gruppi ammino-protettivi ($-\text{OCOR}_1$) nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- e dovrebbe essere utilizzabile per la formazione del gruppo metilammino in posizione 4-.

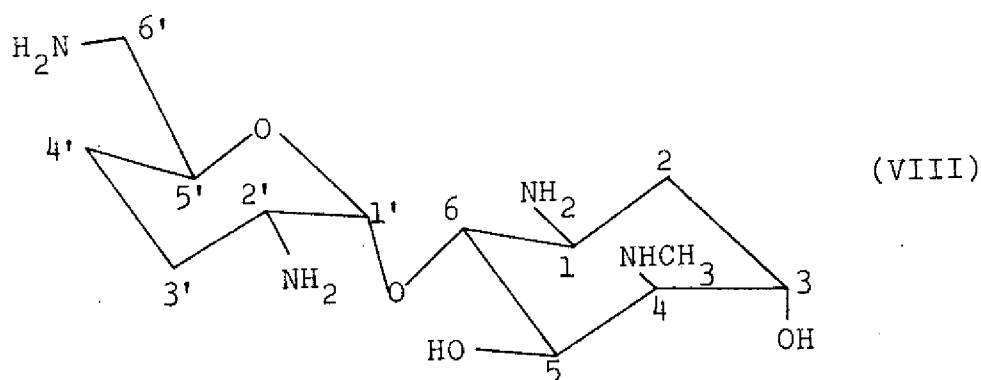
Esempi preferiti di questi sono i gruppi metossicarbonile e etossicarbonile.

Successivamente, i gruppi ammino-protettivi ($-\text{OCOR}^1$) nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- del composto (VII) sono rimossi selettivamente da questo per mezzo di una convenzionale tecnica deprotettiva, che è nota per rimuovere i gruppi protettivi $-\text{OCOR}^1$ ma non $\grave{\text{e}}$ atta a rimuovere il gruppo protettivo $-\text{COOR}^3$ in posizione 4-, per cui viene prodotta una 4-N-protetta N -deglicil-tri- $\text{N}^4, \text{N}^{6'}, \text{O}^3$ -demetilistamicina A di formula (VII'):



in cui R^3 è come definito sopra.

Nella fase finale, il composto (VII') viene ridotto con un idruro di metallo, in modo che il gruppo 4-ammino protetto ($-\text{NHCOOR}^3$) sia convertito nel gruppo 4-metilammino (4-N-metilazione), dando luogo a N^4 -deglicil-di- $\text{N}^{6'}, \text{O}^3$ -demetilistamicina A di formula (VIII):



La 4-N-metilazione può essere effettuata riducendo il composto (VII') con un idruro metallico come idruro di ^{litio} alluminio o di boro in un solvente organico anidro come tetraidrofurano secco. La reazione è generalmente effettuata ad una temperatura di 40 fino a 60°C per un periodo di 10 ore o più a lungo.

Il composto N⁴-deglicil-di-N^{6'},O³-demetilistamicina A così prodotto, che è usato come materiale iniziale nel procedimento di questa invenzione, ha le seguenti proprietà:-

Il monocarbonato di N⁴-deglicil-di-N^{6'},O³-demetilistamicina A è in forma di polvere incolore che non ha alcun punto di fusione definito, decompone a 115-118°C, dà una reazione ottica specifica di $[\alpha]_D^{22} +102^\circ$ (c 0,65, acqua) ed indica un'analisi elementare:-
Trovato: C, 46,15; H, 7,97; N, 15,37% che è coincidente con i valori teorici di C₁₃H₂₅N₄O₄•H₂CO₃ (C,

45,89; H, 8,25; N, 15,29%). La spettrometria di massa del monocarbonato mostra il picco M^+ a $m/e = 304$, e la cromatografia in strato sottile su gel di silice di questo dà un punto singolo (positivo al reagente ninidrina) a R_f 0,12 quando sviluppata con la fase inferiore di un solvente miscela di cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 28% (2:1:1 in volume) o a R_f 0,50 quando sviluppata con un solvente miscela di butanolo-etanolo-cloroformio-ammoniaca acquosa al 17% (4:5:2:5 in volume).

Secondo il procedimento di questa invenzione, principalmente il composto in oggetto di questa invenzione, di- $N^{6'}$, O^3 -demetilistamicina A di formula (I) è preparato per mezzo di acilazione con glicina (cioè glicilazione) del gruppo metilammino in posizione 4- del composto (VIII). Allo scopo di fare una selettiva glicilazione del gruppo 4-metilammino con un'alta resa, è necessario bloccare precedentemente gli altri gruppi ammino nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- con un gruppo ammino-protettivo. Fortunatamente, vi è una considerevole differenza nella reattività fra questi tre gruppi ammino e il gruppo 4-metilammino. Quindi può essere preparato con alta resa un derivato N-protetto del composto (VIII), i tre gruppi ammino del quale sono stati

bloccati in posizioni 1-, 2'- e 6', per mezzo di un metodo convenzionale per l'introduzione di un noto gruppo ammino-protettivo, per esempio, facendo reagire il composto (VIII) con 3 - 3,5 equivalenti molari di un noto reagente ammino-protettivo in forma di alogenuro acido, azoturo acido, estere acido o anidride acida. Esempi di questi noti gruppi ammino-protettivi adatti allo scopo comprendono gruppi alcossicarbonile come il tert-butossicarbonile e il tert-amlossicarbonile; i gruppi cicloalchilossicarbonile come il cicloesilossicarbonile; i gruppi aralchilossicarbonile come il benzilossicarbonile; i gruppi acide come trifluoroacetile e O-nitrofenossiacetile; i gruppi fosfinotioile come il difenilfosfinotioile e il dimetilfosfinotioile; e i gruppi fosfinile come il difenilfosfinile. Anche noti gruppi bivalenti ammino-protettivi possono essere usati per bloccare i gruppi ammino in forma di base Schiff.

Il derivato 1,2',6'-tri-N-protetto della N⁴-deglicil-di-N^{6'},O³-demetilistamicina A così preparato può essere usato direttamente senza purificazione, per la successiva glicilazione del gruppo 4-metilammino. La reazione di 4-N-glicilazione può essere effettuata usando la glicina stessa o un equivalente funzionale

di questa secondo una qualunque tecnica nota impiegata per la sintesi dei peptidi. L'equivalente funzionale della glicina per il presente uso comprende dicicloesilcarbodiimmidi, anidridi acide miscelate, azoturi ed esteri attivi della glicina. E' preferibile che il gruppo ammino della glicina debba essere precedentemente bloccato con un gruppo ammino-protettivo che può essere lo stesso o diverso da quello usato per i gruppi ammino del composto (VIII). Esempi preferenziali del gruppo ammino-protettivo da usarsi convenientemente sono il gruppo benzilossicarbonile che è rimuovibile per idrogenolisi in presenza di un catalizzatore, come l'ossido di palladio o di platino, o il gruppo tert-butossicarbonile che è rimuovibile con idrolisi acida, per esempio, in soluzione acquosa di acido trifluoroacetico o acetico o soluzione diluita di acido cloridrico.

In una forma preferenziale del presente procedimento, la reazione di 4-N-glicilazione può essere eseguita usando un estere attivo di una glicina N-protetta ad una elevata temperatura compresa fra 40 e 60°C in un opportuno solvente organico come il diossano. Come estere attivo di alta reattività si può menzionare l'estere N-idrosuccinimide della

N-benzilossi-carbonilglicina, che può essere prodotto in un modo convenzionale e che può essere usato per la glicilazione in una proporzione di 1 a 1,5 equivalenti molari.

Dopo il completamento della glicilazione, tutti i gruppi ammino-protettivi rimanenti nel prodotto della reazione sono rimossi con un metodo convenzionale, per esempio con idrogenolisi o idrolisi acida come descritto sopra, per cui viene prodotto il composto in oggetto di formula (I).

Come già descritto, il nuovo composto (I) di questa invenzione possiede un'elevata attività antibatterica contro una larga varietà di batteri. Inoltre, il composto ha una bassa tossicità verso gli animali, come viene dimostrato dal fatto che i topi tollerarono una somministrazione endovenosa di 100 mg/Kg del composto. Quindi, il composto è molto utile come agente antibatterico e per questo scopo esso è generalmente formulato in forma di composizione farmaceutica, che può essere somministrata nell'uomo o nell'animale in un modo di per sé noto.

Perciò, questa invenzione fornisce anche una composizione farmaceutica comprendente una quantità terapeuticamente o battericidamente efficace del

composto di formula (I) o un sale acido di addizione di questo farmaceuticamente accettabile in combinazione con un ~~veicolo~~ o coadiuvante farmaceuticamente accettabile. Questa invenzione fornisce anche un metodo di inibizione della crescita di batteri in un animale, che comprende ^{il} somministrare una quantità terapeuticamente o battericidicamente efficace del composto (I) o un sale farmaceuticamente accettabile di questo ad un animale che è infettato da batteri o è suscettibile di diventare infetto. Si comprenderà che una quantità appropriata dell'ingrediente efficace da somministrarsi per lo scopo prefisso varierà a seconda della particolare composizione formulata, del modo di somministrazione, delle condizioni di trattamento e della natura dei batteri da controllare. Come indicazione orientativa, l'ingrediente efficace potrà essere somministrato in un animale con dosi di 0,5 - 5 mg per Kg di peso corporeo dell'animale.

Questa invenzione è ulteriormente illustrata ma non limitata dal seguente esempio.

Esempio 1

Sintesi della di-N^{6'},O³-demetilistamicina A di formula (I)

- (a) Preparazione di 1,3,2',6'-tetra-N-benzilossicarbonil-3',4'-dideoossineamina (R¹ = benzile in

formula II')

2,10 g (7,23 mmoli) di 3',4'-dideossineamina furono disciolti in 100 ml di un miscuglio di acqua e metanolo (1:5 in volume), ed alla soluzione furono aggiunti 11,9 g (4,3 mmoli) di benzil 4,6-dimetilpirimidil-2-tiolcarbonato e 2,3 ml di trietilammina, facendo seguire agitazione a temperatura ambiente per 15 ore. La soluzione di reazione risultante fu concentrata fino a secchezza (essiccazione) a pressione ridotta ed il residuo fu lavato successivamente con 300 ml di acqua e 200 ml di etere etilico per dare 6,0 g (100%) del composto del titolo in forma di polvere giallo pallida. Punto di decomposizione 237-238°C.

[d] $\frac{20}{D} + 45^\circ$ (c 2, CHCl₃).

(b) Preparazione di 3,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-3',4'-dideossineamina 1,6-carbammato (R¹ = benzil in formula II'')

1,34 g (1,62 mmoli) del prodotto ottenuto nella fase (a) furono disciolti in 13 ml di dimetilformammide anidra, a cui furono aggiunti 235 mg (4,9 mmoli) di idruro di sodio (50% di sospensione in olio) mediante raffreddamento con ghiaccio in atmosfera di gas argon. La miscela fu agitata a temperatura ambiente per 4 ore, dopo di che la soluzione di reazione risultante fu

neutralizzata con acido acetico e versata in 500 ml di acqua ghiacciata per separare un precipitato. Il precipitato fu raccolto per filtrazione e purificato per mezzo di cromatografia in colonna su gel di silice (50 g di Wako-gel C-200 prodotta dalla Wakojunyaku Co., Japan) sviluppato con solventi miscelati di cloroformio/acetone (2:1 e 1:1 in volume) per dare 683 mg (62%) del composto del titolo. $[\alpha]_D^{28} + 58^\circ$ (c 2, CHCl_3). R_f 0,25 in cromatografia in strato sottile (TLC) su gel di silice sviluppata con cloroformio-etanolo (20:1).

(c) Preparazione di 3,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-3',4'-dideoossi-5-O-tetraidropiranylneamina 1,6-carbammato (R^1 = benzile e R^2 = tetraidropiranylne in formula III)

3,7 g (5,15 mmoli) del prodotto ottenuto nella fase (b) di cui sopra furono disciolti in 50 ml di dimetilformammide, e alla soluzione furono aggiunti 1,3 g (15,5 mmoli) di 3,4-diidro-2H-pirano e 196 mg (1,14 mmoli) di acido para-toluene-solfonico anidro. La miscela fu lasciata riposare a temperatura ambiente per 72 ore, e 1 ml di trietilammina fu aggiunto alla soluzione di reazione risultante, che fu poi fatta evaporare a pressione ridotta per lasciare un residuo.

Quest'ultimo fu cromatografato su gel di silice (300 g di Wako-gel C-200) usando cloroformio-etanolo (100:1) come solvente di sviluppo per produrre 2,4 g (57%) del composto del titolo. Punto di decomposizione 79 - 83°C. $[\alpha]_D^{22} + 33^\circ$ (c 0,5, CHCl_3). R_f 0,51 in TLC su gel di silice sviluppata con cloroformio-etanolo (15:1).

(d) Preparazione di 3,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-1-N-tert-butossicarbonil-3',4'-dideoossi-6-O-mesil-5-O-tetraidropirani-neamina (R^1 = benzile, R^2 = tetraidropirani-le, R^3 = tert-butile e R^4 = metile in formula IV)

2,3 g (2,86 mmoli) del prodotto proveniente dalla fase (c) di cui sopra furono disciolti in 80 ml di diossano, e 25 ml di idrossido di bario 0,05M furono aggiunti alla soluzione risultante. La miscela fu agitata a 60°C per 30 minuti, seguita da ulteriore aggiunta di 30 ml di idrossido di bario 0,05M in acqua ed agitazione per un'ora. Furono poi aggiunti altri 30 ml di idrossido di bario 0,05M e tutta la miscela fu agitata per una ulteriore ora per aprire l'anello carbamato 1,6-ciclico. Dopo il completamento della reazione, il biossido di carbonio gassoso fu passato nella soluzione di reazione per separare il precipitato, che fu filtrato. Il filtrato fu fatto evaporare a pressione

ridotta e il residuo fu estratto con 200 ml di cloroformio. L'estratto fu concentrato a secchezza a pressione ridotta per dare 2,24 g di una polvere giallo pallido di 3,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-3',4'-dideossi-5-O-tetraidropirani-neamina (R^1 = benzile e R^2 = tetraidropirani-le in formula III').

La polvere così ottenuta fu disciolta in 50 ml di metanolo, al quale furono poi aggiunti 0,4 ml di trietilammina e 1,35 g (5,7^m-moli) di tert-butil 4,6-dimetilpirimidil-2-tiolcarbonato. Dopo agitazione per tutta la notte a temperatura ambiente, la soluzione di reazione risultante fu evaporata a pressione ridotta per lasciare un residuo, che fu raccolto in 20 ml di toluene, seguito da aggiunta di n-esano per separare un precipitato. Il precipitato fu raccolto per filtrazione e lavato con acqua per produrre 2,24 g di una polvere di 3,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-1-N-tert-butossicarbonil-3',4'-dideossi-5-O-tetraidropirani-neamina.

Una soluzione di questa polvere disciolta in 50 ml di piridina fu mescolata con 574 mg (5,7^m moli) di metano-sulfonil cloruro, e la miscela fu agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La soluzione di reazione risultante fu concentrata a secchezza e

il residuo fu purificato per mezzo di cromatografia in colonna su gel di silice (150 g di Wako-gel C-200) sviluppata con toluene-acetone (5:1) per dare 1,65 g (60%) del composto del titolo. Punto di decomposizione 101-105°C. $[\alpha]_D^{22} +29^\circ$ (c 0,44, CHCl_3).

(e) Preparazione di 3-O-benzoil-1,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-4-N-tert-butossicarbonil-5-O-tetraidropirani- N^4 -deglicil-tri- $\text{N}^4, \text{N}^{6'}, \text{O}^3$ -demetilistamicina A (R^1 = benzile, R^2 = tetraidropirani-le, R^3 = tert-butile e R^5 = benzoile in formula VI)

1,37 g (1,43 mmoli) del prodotto della fase (d), di cui sopra furono disciolti in 55 ml di tetraidrofuran secco, ed alla soluzione furono aggiunti 194 mg (3,6 mmoli) di metilato di sodio a 0°C in atmosfera di argon. La miscela ottenuta fu agitata per 30 minuti e quindi lasciata riposare a 10°C per 15 ore. La soluzione di reazione risultante fu mescolata con una quantità in eccesso di cloruro di ammonio e acqua, seguita da estrazione con cloroformio. L'estratto fu concentrato a secchezza per dare 1,23 g di una polvere del derivato di aziridina (R^1 = benzile, R^2 = tetraidropirani-le e R^3 = tert-butile in formula V). $[\alpha]_D^{22} + 10^\circ$ (c 0,5, CHCl_3). R_f 0,41 in TLC su gel di silice sviluppata con benzene-etil acetato (1:1).

1,12 g della polvere così ottenuta furono disciolti in 50 ml di dimetilformammide, a cui furono poi aggiunti 1,3 g di benzoato di sodio e la miscela fu lasciata riposare a temperatura ambiente per 10 ore per effettuare la fissione dell'anello aziridinico. La soluzione di reazione risultante fu mescolata con 300 ml di cloroformio e lavata due volte con cloruro di sodio acquoso saturato. Lo strato di cloroformio fu separato, essiccato con solfato di sodio anidro e concentrato a secchezza. Il residuo fu purificato per mezzo di cromatografia in colonna su gel di silice (180 g di Wako-gel C-200) sviluppata con toluene-etil acetato (5 : 2) per produrre 878 mg (76%) del composto del titolo. Punto di decomposizione 84-86°C. $[\alpha]_D^{22} +61^\circ$ (c 0,49, CHCl_3). R_f 0,54 in TLC su gel di silice sviluppata con benzene-etil acetato (1 : 1).

(f) Preparazione di tri- $\text{N}^1, \text{N}^{2'}, \text{N}^{6'}$ -benzilossicarbonil- N^4 -tert-butossicarbonil- O^5 -tetraidropiranil- N^4 -deglicil-tri- $\text{N}^4, \text{N}^{6'}, \text{O}^3$ -demitilistamicina A ($\text{R} =$ benzile, $\text{R}^2 =$ tetraidropiranile, $\text{R}^3 =$ tert-butile e $\text{R}^5 = \text{H}$ in formula IV).

860 mg ($0,88 \text{ moli}$) del prodotto ottenuto nella fase (e) furono disciolti in 20 ml di una miscela di ammoniacale metanolica al 12% e la soluzione fu lasciata

riposare a temperatura ambiente per 40 ore per effettuare la rimozione del gruppo 3-O-benzoile. La soluzione di reazione risultante fu concentrata a secchezza e il residuo fu cromatografato su gel di silice (70 g di Wako-gel C 200) usando benzene-etil acetato (1 : 1) come solvente di sviluppo per dare 693 mg (90%) del composto del titolo. Punto di decomposizione 88 - 90°C. $[\alpha]_D^{22} +44^\circ$ (c 0,5, CHCl_3). R_f 0,18 in TLC su gel di silice sviluppata con benzene-etil acetato (1 : 1).

(g) Preparazione di N⁴-deglicil-di-N^{6'},O³-demetil-istamicina A (composto di formula VIII)

.680 mg (0,78 ^mmoli) del prodotto della fase (f) di cui sopra furono disciolti in 10 ml di acido trifluoroacetico acquoso al 90% a 0°C e lasciati riposare per due ore per effettuare la rimozione idrolitica del gruppo tetraidropiranicile con eventuale rimozione del gruppo tert-butossicarbonile. La soluzione di reazione fu quindi concentrata a secchezza. Il residuo ottenuto fu messo in 50 ml di cloroformio e lavato successivamente con idrossido di sodio acquoso 1N e acqua. Lo strato di cloroformio fu separato, essiccato con solfato di sodio anidro e concentrato fino a secchezza. Il residuo fu purificato per mezzo di cromatografia in colonna su gel di silice (50 g di

Wako-gel C 200) sviluppata con un solvente miscelato di cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 17% (80 : 10 : 1) per dare 350 mg (65%) di una polvere di $N^1, N^{2'}, N^{6'}$ -benzilossicarbonil- N^4 -deglicil-tri- $N^4, N^{6'}, O^3$ -demitilistamicina A.

A una soluzione di 293 mg ($0,42^{m/z}$ moli) della polvere ottenuta come sopra in 5 ml di metanolo fu aggiunta una soluzione di 27 mg di carbonato di sodio in 0,5 ml di acqua, e quindi 55 mg ($0,5^{m/z}$ moli) di cloroformato di etile a 0°C. La miscela risultante fu agitata a temperatura ambiente per due ore per effettuare l'introduzione del gruppo etossicarbonile, dopo di che la soluzione di reazione fu concentrata a secchezza e il residuo fu messo in 30 ml di cloroformio e lavato con acqua. Lo strato di cloroformio fu quindi essiccato con solfato di sodio anidro ed ancora concentrato a secchezza per dare 318 mg (98%) di una polvere di tri- $N^1, N^{2'}, N^{6'}$ -benzilossicarbonile- N^4 -etossicarbonil- N^4 -deglicil-tri- $N^4, N^{6'}, O^3$ -demitilistamicina A (R^1 = benzile e R^3 = etile in formula VII). R_f 0,62 in TLC su gel di silice sviluppata con un solvente miscelato di cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 17% (80 : 10 : 1).

La polvere così ottenuta fu disciolta in 8 ml di

una miscela di metanolo, acqua e acido acetico (2 : 1 : 1), a cui furono poi aggiunti 100 mg di palladio-carbonio 5% come catalizzatore di idrogenolisi e la miscela fu lasciata riposare sotto una corrente di gas idrogeno per due ore per effettuare la rimozione dei gruppi benzilossicarbonilici. Dopo di ciò, il catalizzatore fu rimosso dalla miscela di reazione, che fu quindi concentrata a secchezza. Una soluzione del residuo disciolto in acqua fu passato attraverso una colonna di 11 ml di Amberlite CG-50 (forma NH_4 , un prodotto della Rohm & Haas Co., USA). La colonna fu successivamente lavata con acqua e ammoniacca acquosa 0,1M e quindi eluita con ammoniacca acquosa 0,2M. L'eluato proveniente dalla colonna fu concentrato a secchezza per dare 143 mg (95%) di una polvere di N^4 -etossi-carbonil- N^4 -deglicil-tri- $\text{N}^4, \text{N}^{6'}, \text{O}^3$ -demetil-istamicina A (R^3 = etile in formula VII'). R_f 0,55 in TLC su gel di silice sviluppata con cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 17% (3 : 3 : 1).

130 mg ($0,36 \times 10^{-3}$ moli) della polvere preparata come sopra furono disciolti in 6 ml di acido trifluoroacetico anidro a 0°C , la soluzione fu concentrata a secchezza e il residuo fu messo in 3 ml di tetraidrofurano secco. Alla soluzione risultante furono

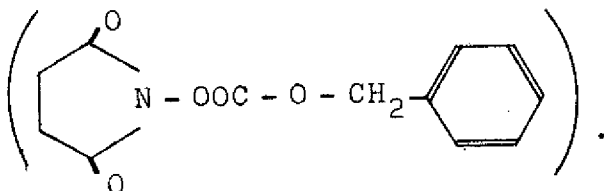
aggiunti 15 ml del complesso tetraidrofurano-idruro di boro 1M (un prodotto della Aldorich Co., USA) e la miscela fu agitata a 50°C per 18 ore per effettuare la conversione riduttiva del gruppo etossicarbonilammino nel gruppo metilammino. Una certa quantità d'acqua fu aggiunta alla soluzione di reazione, che fu quindi concentrata a secchezza e il residuo fu messo in 10 ml di acqua. La soluzione acquosa fu regolata a pH 8 con addizione di ammoniaca acquosa e passata attraverso una colonna di 30 ml di Amberlite CG-50 (forma NH_4). La colonna fu quindi successivamente lavata con acqua e soluzioni di ammoniaca acquosa 0,2 M, 0,3 M e 0,4 M e quindi eluita con ammoniaca acquosa 0,5 M. L'eluato fu raccolto e concentrato a secchezza per dare 45 mg (40%) di monocarbonato del composto del titolo in forma di polvere. Punto di decomposizione 115-118°C. $[\alpha]_D^{22} + 102^\circ$ (c 0,65, H_2O). Spettrometria di massa: m/e 304 (M^+). TLC su gel di silice: R_f 0,12 se sviluppata con lo strato inferiore di cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 28% (2:1:1) e R_f 0,50 se sviluppata con butanolo-etanolo-cloroformio-ammoniaca acquosa al 17% (4:5:2:5).

Esempio 2

Preparazione di di- $\text{N}^{6'}$, O^3 -demetilistamicina A

(composto finale di formula I)

45 mg ($0,123 \times 10^{-3}$ moli) di N^4 -deglicil-di- $N^{6'}, O^3$ -demetilistamicina A monocarbonato ottenuta nella fase (g) dell'esempio 1 di cui sopra furono disciolti in 3 ml di metanolo, e alla soluzione furono aggiunti 0,017 ml ($0,123 \times 10^{-3}$ moli) di trietilammina e 94,9 mg ($0,38 \times 10^{-3}$ moli) di N-benzilossicarbonilossisuccinammide



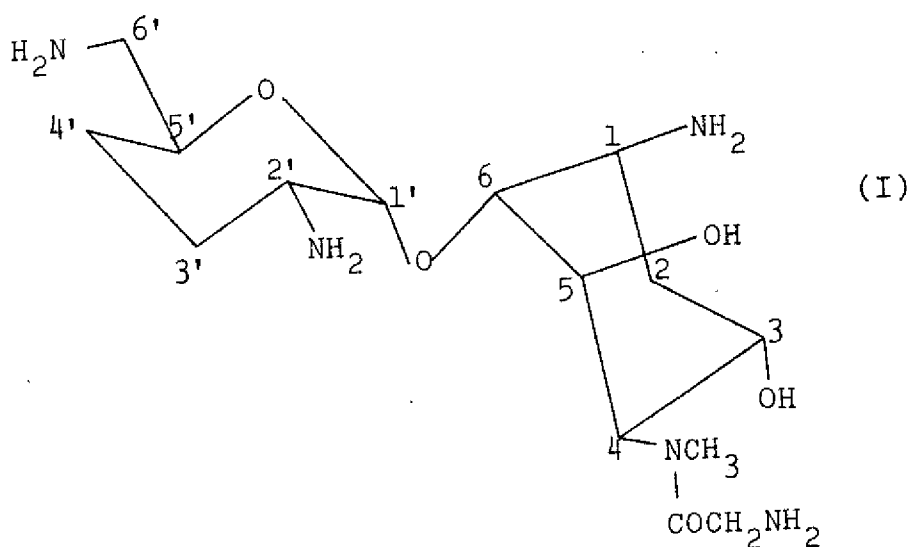
La miscela risultante fu lasciata riposare a temperatura ambiente per 6,5 ore per effettuare l'introduzione dei gruppi benzilossicarbonilici come gruppo ammino-protettivo. La soluzione di reazione comprendente la tri- $N^1, N^{2'}, N^{6'}$ -benzilossicarbonil- N^4 -deglicil-di- $N^{6'}, O^3$ -demetilistamicina A così prodotta fu quindi concentrata a secchezza e il residuo fu raccolto in 3 ml di diossano, facendo seguire l'aggiunta di 67,9 mg ($0,18 \times 10^{-3}$ moli) di estere N-idrossisuccinimide di benzilossicarbonilglicina. La miscela così ottenuta fu lasciata riposare a 60°C per 6 ore per effettuare l'introduzione del gruppo glicile, dopo di che la soluzione di reazione comprendente la tetra- $N^1, N^{2'}, N^{6'}, N^{2''}$ -benzilossicarbonil-di- $N^{6'}, O^3$ -demetilistamicina A così formata

fu concentrata a secchezza e il residuo fu disciolto in 4 ml di un solvente miscelato di acido acetico, metanolo e acqua (2 : 1 : 1).

Alla soluzione risultante furono aggiunti 50 mg di palladio-carbonio 5% come catalizzatore di idrogenolisi e la miscela fu lasciata riposare sotto una corrente di idrogeno per 4 ore per effettuare la reazione di deprotezione per la rimozione dei gruppi benzilossi-carbonilici. La miscela di reazione fu filtrata per rimuovere il catalizzatore, il filtrato fu concentrato a secchezza e il residuo fu versato in acqua. La soluzione acquosa ottenuta fu passata attraverso una colonna di 6 ml di Amberlite CG-50 (forma NH_4) e la colonna fu successivamente lavata con acqua, ammoniaca acquosa 0,1 M e ammoniaca acquosa 0,3 M e quindi eluita con ammoniaca acquosa 0,4 M. L'eluato fu raccolto in frazioni da 1 ml, e le frazioni attive N° 4 - 10 furono combinate insieme e concentrate a secchezza per dare 15 mg (29%) di di-N^{6'},O³-demetilistamicina A monocarbonato in forma di polvere. Punto di fusione 138 - 145°C (decomposizione), $[\alpha]_D^{22} +136^\circ$ (c 0,36, acqua).

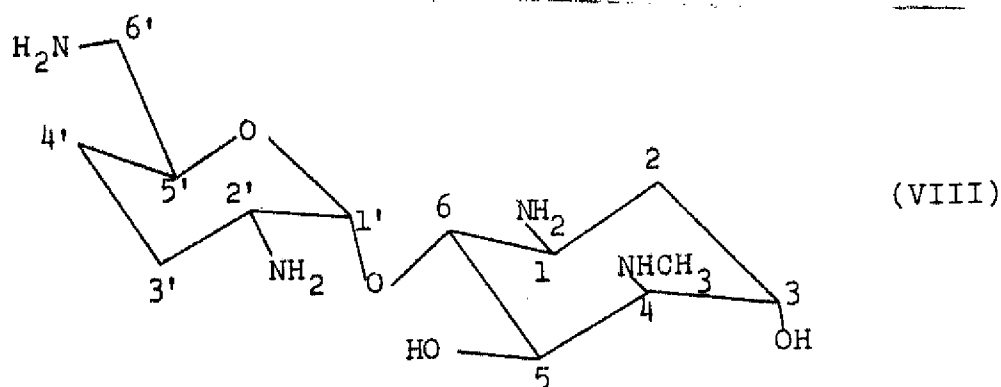
RIVENDICAZIONI :

1. Il composto, designato come di-N^{6'},O³-demetilistamicina A, di formula strutturale:



e un sale acido di addizione di questo.

2. Un procedimento per preparare il composto di formula (I) secondo la rivendicazione 1 che comprende bloccare simultaneamente con un gruppo ammino-protettivo i tre gruppi ammino nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- del composto avente formula strutturale:



far reagire il risultante derivato tri-N-protetto del composto (VIII) con glicina o una glicina N-protetta, il cui gruppo ammino è stato bloccato con un gruppo ammino-protettivo o con un equivalente

funzionale di detta glicina per acilare il gruppo metilammino non protetto nella posizione 4- del composto (VIII); e rimuovere tutti i rimanenti gruppi ammino-protettivi dal prodotto dell'acilazione.

3. Un procedimento come rivendicato nella rivendicazione 2, in cui il gruppo ammino-protettivo per il bloccaggio dei tre gruppi ammino è il gruppo benzilossicarbonile.

4. Un procedimento come rivendicato nelle rivendicazioni 3 o 4, in cui il derivato protetto del composto (VIII) è fatto reagire con l'estere N-idrossisuccinimide della N-benzilossicarbonilglicina.

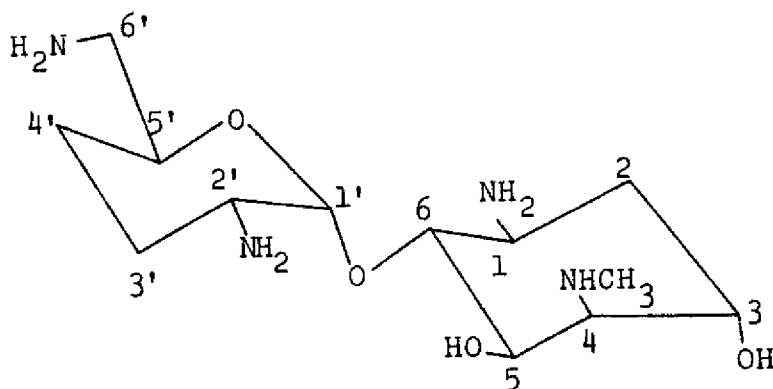
5. Un procedimento come rivendicato nella rivendicazione 2, 3 o 4, in cui i rimanenti gruppi ammino-protettivi sono rimossi per mezzo di idrogenolisi.

6. Una composizione farmaceutica comprendente una quantità terapeuticamente efficace del composto di formula (I) secondo la rivendicazione 1 o un sale di addizione acido farmaceuticamente accettabile di questo, in combinazione con un **veicolo** o coadiuvante farmaceuticamente accettabile.

7. Un metodo di inibizione della crescita di batteri in un animale che comprende somministrare una quantità terapeuticamente efficace del composto (I) secondo la

rivendicazione 1 o un sale farmaceuticamente accettabile di questo ad un animale infettato da batteri o suscettibile di esserlo.

8. Il composto, N⁴-deglicil-di-N^{6'},O³-demetilistamicina A avente formula strutturale:



FIRENZE 25 MAR. 1987

UFFICIO TECNICO ING. A. MANNUCCI

PER INCARICO



[Handwritten signature]

Traduzione del documento estero di Priorità relativo alla domanda di brevetto di Invenzione Industriale di ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI di nazionalità giapponese a SHINAGAWA-KU, TOKYO (Giappone); depositata il 27 Marzo 1981; N. Prot. 9369 A/81.

UFFICIO BREVETTI

GOVERNO GIAPPONESE

Questo è per certificare che la copia annessa è una copia autentica della seguente domanda come depositata presso questo Ufficio.

Data della domanda: 28 Marzo 1980

Numero della domanda: Domanda di brevetto N. 38889/80

Richiedente: ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU
KENKYU KAI

Questo giorno 10 Marzo 1981

Direttore Generale

Ufficio Brevetti

Haruki SHIMADA

Certificato N. 5259/81

Yen 5.400

Domanda di brevetto (brevetto depositato

a norma della clausola dell'art. 38 della Legge sui brevetti)

28 Marzo 1980

Direttore Generale

UFFICIO BREVETTI

UFF. TECN. ING. A. MANNUCCI

1. Titolo dell'Invenzione:

Di-N⁶, O³-demetilistamicina A e processo per la sua preparazione.

2. Numero delle rivendicazioni: 2

3. Inventori:

Indirizzo: 23, Toyotama Kita 4-chome, Nerima-ku, Tokyo
Nome: Hamao UMEZAWA ed altri due

4. Richiedente:

Indirizzo: 14-23, Kami Osaki 3-chome, Shinagawa-ku, Tokyo
Nome: ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI
Rappresentante: Tokuji ICHIKAWA

5. Agenti:

Indirizzo: (105) Bussan Building Bekkan, N.1-15,
Nishi-Shimbashi 1-chome, Minato-ku,
Tokyo Tel. (591) 0261
Nome: (6145) Tadao ASAUCHI ed altri tre

6. Annessi:

(1) Descrizione	1 copia
(2) Disegno	1 copia
(3) Procura da depositare in un secondo tempo	1 copia

(4) Duplicato dei documenti
della domanda

1 copia

7. Altri inventori ed agenti

(1) Inventori:

Indirizzo: 1157-1, Ichigao-cho, Midori-ku, Yokohama-shi
Kanagawa-ken

Nome: Shinichi KONDO

Indirizzo: 29-8, Yoyogi 5-chome, Shibuya-ku, Tokyo

Nome: Daishiro IKEDA

(2) Agenti:

Indirizzo: Bussan Building Bekkan, N. 1-15, Nishi-
-Shimbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo

Indirizzo: come sopra

Nome: Takao HAMANO

Indirizzo: come sopra

Nome: Tetsuji MORITA

UFF. TECN. ING. A. MANNUCCI

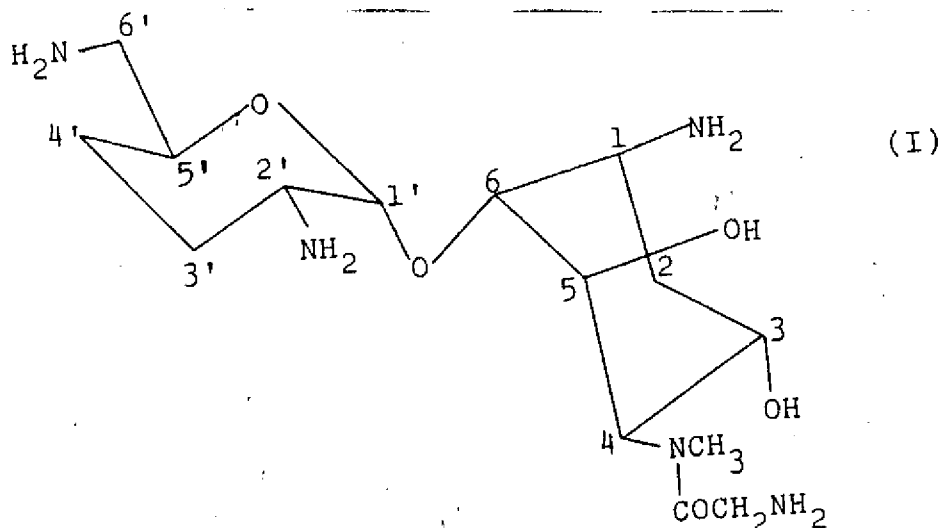
DESCRIZIONE

1. TITOLO DELL'INVENZIONE

Di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A e processo per la sua preparazione.

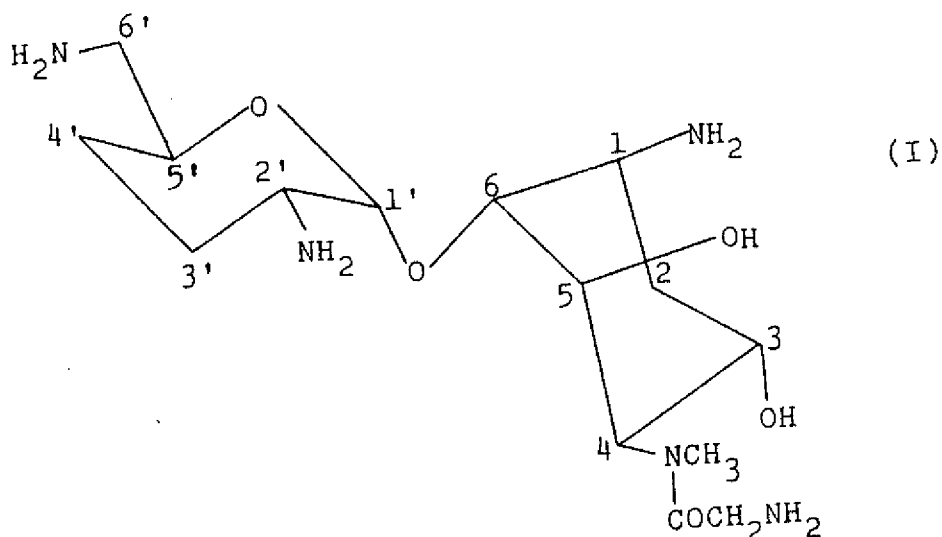
2. RIVENDICAZIONI

1. Di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A della formula (I)

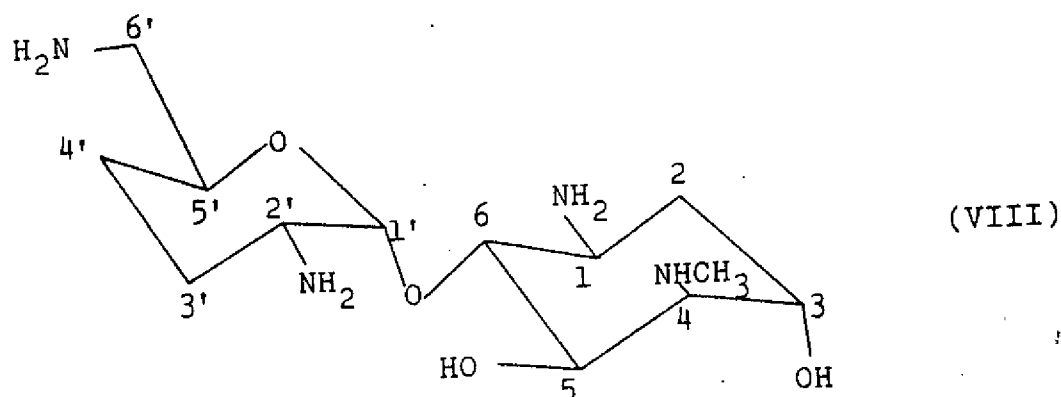


ed un suo sale di addizione acido.

2. Un processo per la preparazione di di-N^{6'}, O³-dimetilistamicina A della formula (I):



che comprende il bloccaggio simultaneo con un gruppo ammino-protettivo dei tre gruppi ammino nelle posizioni 1-, 2'- e 6' del composto di partenza, N⁴-deglicil-di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A, della formula (VIII):



la reazione del risultante derivato protetto del composto (VIII) con glicina, il cui gruppo ammino è stato bloccato con un gruppo ammino protettivo o con un equivalente funzionale di detta glicina per acilare il gruppo metilammino non protetto nella posizione 4- del composto (VIII) e la rimozione di tutti i rimanenti gruppi ammino protettivi dal prodotto di acilazione.

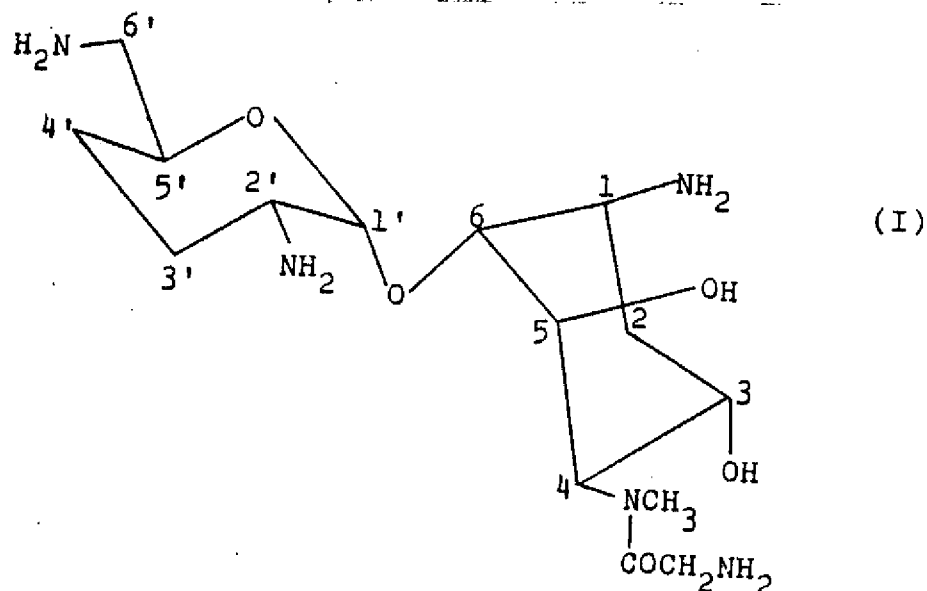
3. DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE.

Questa invenzione si riferisce a nuovi composti, di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A e suoi sali di addizione acidi, che sono utili come antibiotici aminoglicosidici sintetici, nonché ad un processo per la preparazione dei composti.

Abbiamo scoperto antibiotici della istamicina A e della istamicina B che vengono prodotti con la coltivazione di una nuova specie di Streptomyces, e cioè il ceppo Streptomyces tenjimariensis SS-939 (Domanda di brevetto giapponese N. 52517/79).

Abbiamo condotto studi approfonditi sulla produzione sintetica della istamicina A partendo dalla 3', 4'-dideossineamina (vedere "Journal of Antibiotics", 32, 1365-1366 (1979)). In un ulteriore sviluppo dei nostri ~~ampi studi ora~~ abbiamo con successo preparato un nuovo composto, di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A, e trovato che il composto presenta un'attività antibatterica contro la Pseudomonas aeruginosa più alta di quella della istamicina A.

Secondo un primo aspetto di questa invenzione, come nuovi composti sono forniti di-N^{6'}, O³-dimetilistamicina A della formula (I):



e suoi sali di addizione acidi.

Il nuovo composto di questa invenzione ha le seguenti proprietà biologiche e fisico-chimiche:

Il monocarbonato di di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A è in forma di polvere incolore che si decompone a 138-145°C, dà una rotazione ottica specifica di $\left[\alpha\right]_D^{22} + 136^\circ$ (c 0,36 in acqua) e presenta un'analisi degli elementi: - Trovato: C, 45,39%; H, 7,63%; N, 16,42% che è conforme ai valori teorici di C₁₅H₃₁N₅O₅·H₂CO₃ (C, 45,38%; H, 7,85%; N, 16,54%). La spettrometria di massa del monocarbonato mostra il picco di (M+1)⁺ a m/e = 362 e la sua cromatografia in strato sottile su gel di silice dà una macchia singola (positivo al reagente ninidrina) a R_f 0,06 se sviluppato con la fase inferiore di una miscela solvente di cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 28% (2:1:1 in volume) o a R_f 0,46 se sviluppato con una miscela solvente di butanolo-etanolo-cloroformio-ammoniaca acquosa al 17% (4:5:2:5 in volume).

Gli spettri antibatterici della di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A secondo questa invenzione sono indicati in tabella 1 per raffronto con quelli della istamicina A.

TABELLA 1

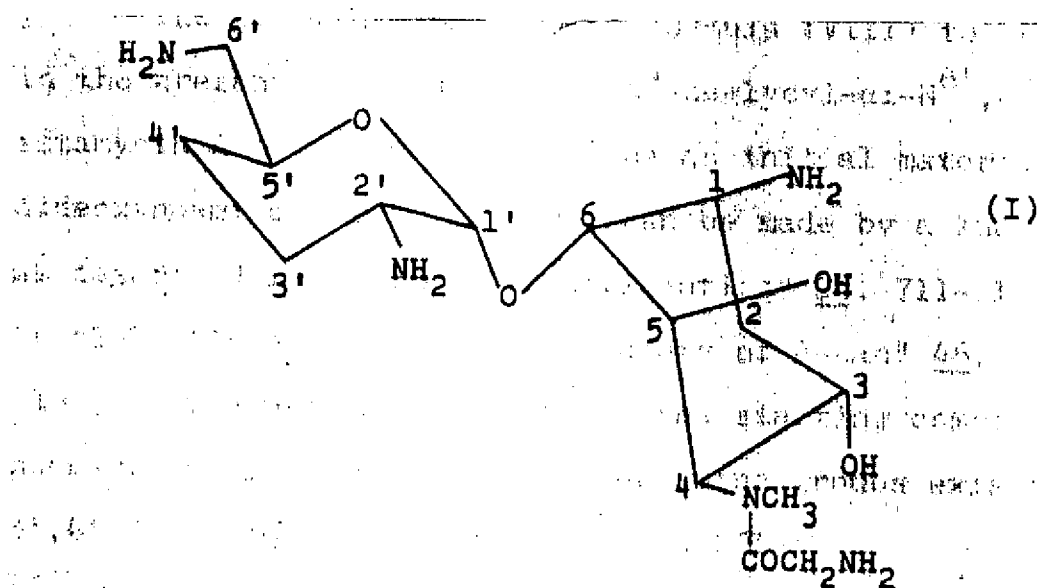
Microorganismi di prova	Concentrazioni inibitorie minime (mcg/ml)	
	Di-demethyl- istamicina A	Istamicina A
<u>Staphylococcus aureus</u> FDA 209P	1,56	0,78
" " Smith	< 0,20	< 0,20
" " Ap01	1,56	0,78
<u>Staphylococcus epidermidis</u> 109	1,56	0,78
<u>Micrococcus flavus</u> FDA 16	3,13	3,13
<u>Sarcina lutea</u> PCI 1001	0,78	0,20
<u>Bacillus anthracis</u>	0,39	< 0,20
<u>Bacillus subtilis</u> PCI 219	< 0,20	< 0,20
<u>Bacillus subtilis</u> NRRL B-558	< 0,20	0,39
<u>Bacillus cereus</u> ATCC 10702	3,13	3,13
<u>Corynebacterium bovis</u> 1810	1,56	1,56
<u>Mycobacterium smegmatis</u> ATCC 607	0,39	1,56
<u>Escherichia coli</u> NIHJ	6,25	3,13
" " K-12	6,25	1,56
" " K-12 R5	100	3,13
" " K-12 R388	1,56	0,78
" " K-12 J5R11-2	3,13	3,13
" " K-12 ML1629	3,13	3,13
" " K-12 ML1630	12,5	3,13
" " K-12 ML1410	6,25	3,13
" " K-12 ML1410 R81	3,13	1,56
" " K-12 LA290 R55	12,5	3,13

<u>Escherichia coli</u> K-12 LA290 R56	3,13	1,56
" " K-12 LA290 R64	3,13	1,56
" " W677	3,13	1,56
" " JR66/W677	6,25	3,13
" " K-12 C600 R135	>100	>100
" " JR225	3,13	1,56
<u>Klebsiella pneumoniae</u> PCI602	3,13	1,56
" " 22 = 3038	12,5	3,13
<u>Shigella dysenteriae</u> JS11910	12,5	3,13
<u>Shigella flexneri</u> 4B JS11811	12,5	6,25
<u>Shigella sonnei</u> JS11756	6,25	6,25
<u>Salmonella typhi</u> T-63	3,13	0,78
<u>Salmonella enteritidis</u> 1891	6,25	3,13
<u>Proteus vulgaris</u> OX19	1,56	0,78
<u>Proteus rettgeri</u> GN311	50	25
" " GN466	12,5	6,25
<u>Serratia marcescens</u>	12,5	6,25
<u>Serratia</u> sp. SOU	>100	>100
<u>Serratia</u> sp. 4	50	50
<u>Providencia</u> sp. Pv16	12,5	6,25
<u>Providencia</u> sp. 2991	12,5	25
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> A3	3,13	6,25
" " No.12	25	100
" " H9	12,5	25
" " H11	50	100

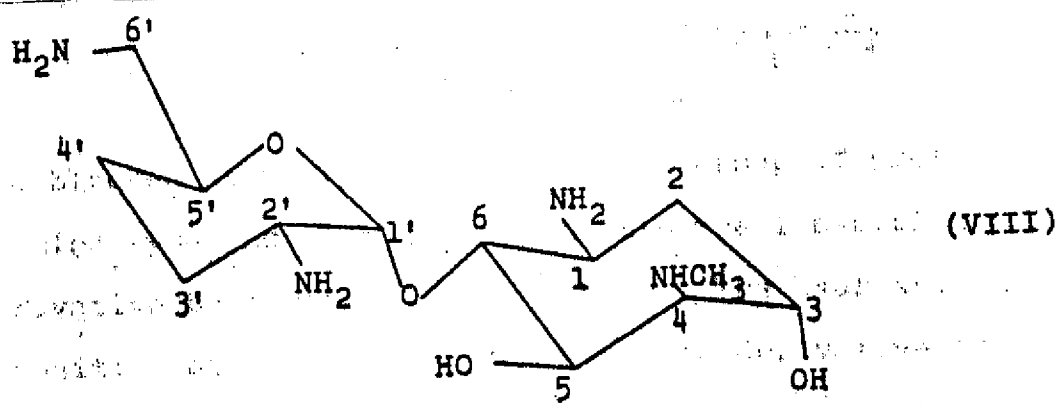
<u>Pseudomonas</u>	<u>aeruginosa</u>	TI-13	12,5	25
"	"	GN 315	25	25
"	"	99	>100	>100
"	"	B-13	>100	>100
"	"	21-75	>100	>100
"	"	PST 1	50	100
"	"	ROS 134/ PU 21	50	100
"	"	K-Ps 102	12,5	50
Pseudomonas	maltophilia	GN 907	>100	>100

Il composto di questa invenzione, di-N^{6'},O³-deme-tilistamicina A è ottenuto usualmente in forma di base libera o suo idrato o carbonato, che può essere convertita nella forma di qualunque sale acido di addizione non tossico farmaceuticamente accettabile per mezzo di reazione con un acido farmaceuticamente accettabile in un modo convenzionale. Esempi di acidi da usare a questo scopo includono acidi inorganici come l'acido cloridrico, bromidrico, solforico, fosforico e nitrico e acidi organici come l'acido acetico, malico, citrico, ascorbico e metansolfonico.

In accordo con un secondo aspetto di questa invenzione, viene fornito un procedimento per preparare la di-N^{6'},O³-demetilistamicina A della formula (I):



che comprende: il bloccaggio simultaneo con un gruppo ammino protettivo dei tre gruppi ammino nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- del composto di partenza, N⁴-deglicil-di-N⁶', O³-demetilistamicina A, formula (VIII):

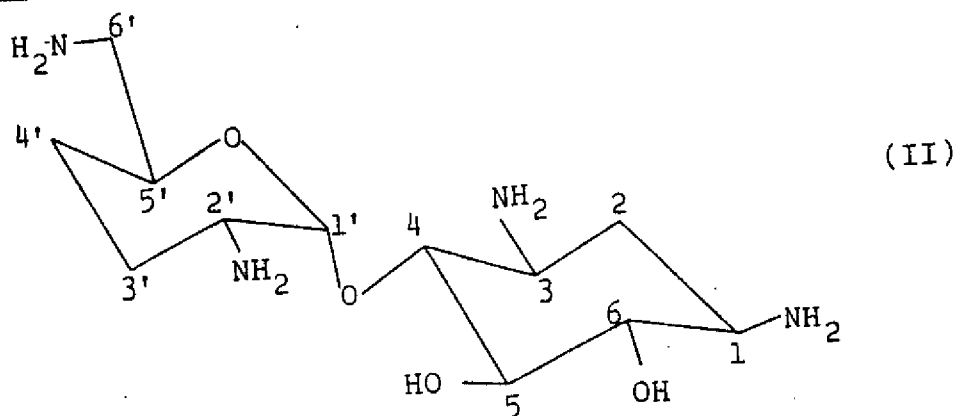


la reazione del risultante derivato ^{protetto} del composto (VIII) con glicina, il cui gruppo ammino è stato bloccato con un gruppo ammino-protettivo o con un equivalente funzionale di detta glicina per acilare il gruppo metilammino non protetto nella posizione 4- del composto (VIII); e la rimozione di tutti i rimanenti gruppi am-

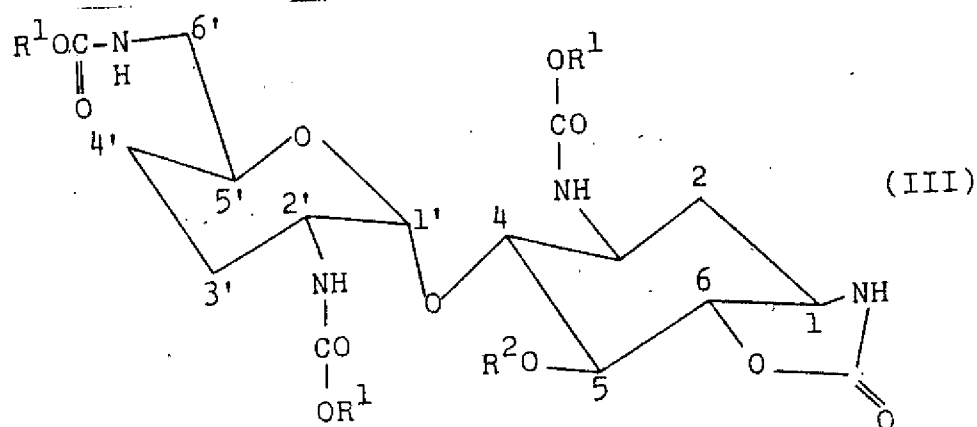
mino-protettivi dal prodotto dell'acilazione.

Il composto di partenza della formula (VIII) da usare nel presente procedimento, e cioè N⁴-deglicil-di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A, può essere preparato usando come materiale iniziale 3',4'-dideoossineamina che, a sua volta, può essere ottenuta con una tecnica nota descritta nel "Journal of Antibiotics" 24, 711-712 (1971) o nel "Bulletin of the Chemical Society of Japan" 46, 3507-3510 (1973). Il metodo di preparazione del composto iniziale è riassunto come segue: -

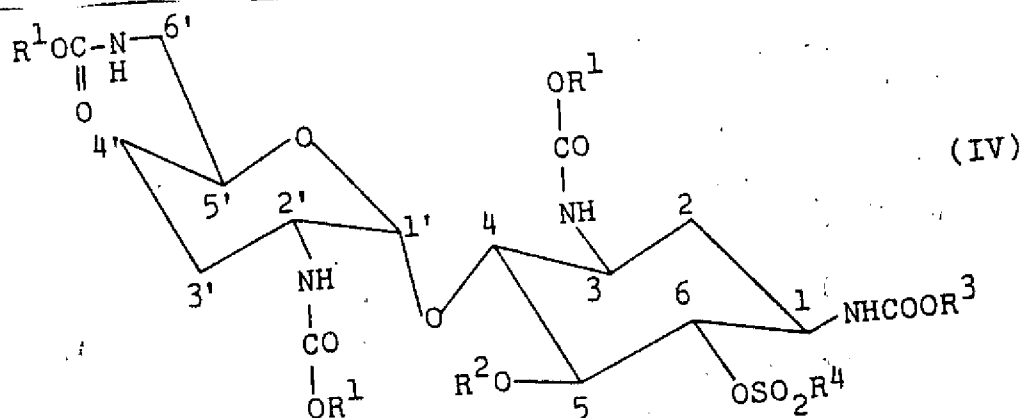
I quattro gruppi ammino esistenti nella 3', 4'-dideossi-
neamina della formula (II):



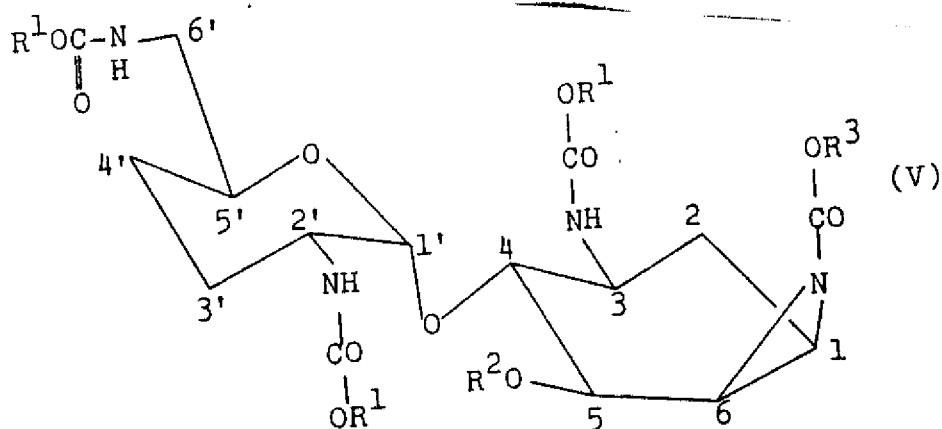
sono bloccati con un gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano e quindi convertiti nel derivato carbammato 1,6-ciclico trattando con una base. Il gruppo idrossile in posizione 5-del derivato carbammato 1,6-ciclico è bloccato con un gruppo idrossil-protettivo per produrre un composto della formula (III):



in cui ciascun $R^1\text{OCO}$ rappresenta il gruppo ammino-protettivo monovalente di tipo formante uretano, dove R^1 è un gruppo alchile, un gruppo cicloalchile o un gruppo aralchile e R^2 rappresenta un gruppo alchile, un gruppo benzile o un gruppo tetraidropiranile come il gruppo idrossil-protettivo; Successivamente, il composto della formula (III) è trattato con un alcali per idrolizzare la forma del carbammato 1,6-ciclico, seguito dalla protezione del gruppo ammino libero nella posizione 1- con un gruppo ammino protettivo di tipo formante uretano diverso dal sopradetto gruppo ammino protettivo, e dalla solfonilazione del gruppo idrossile libero nella posizione 6- in forma di estere solfonico per produrre un composto della formula (IV):

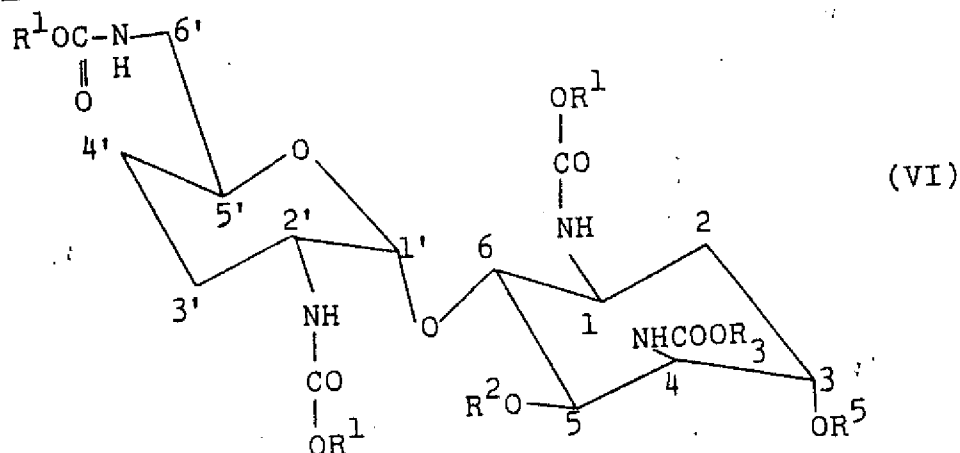


in cui R^1 e R^2 hanno gli stessi significati di cui sopra, $R^3\text{OCO-}$ rappresenta il gruppo ammino-protettivo monovalente di tipo formante uretano, dove R^3 è un gruppo alchile, un gruppo cicloalchile o un gruppo aralchile ma diverso dal gruppo R^1 , e R^4 rappresenta un gruppo alchile, arile o aralchile. Il composto della formula (IV) è quindi trattato con una base per formare un composto portante un anello aziridinico ed avente la formula (V):

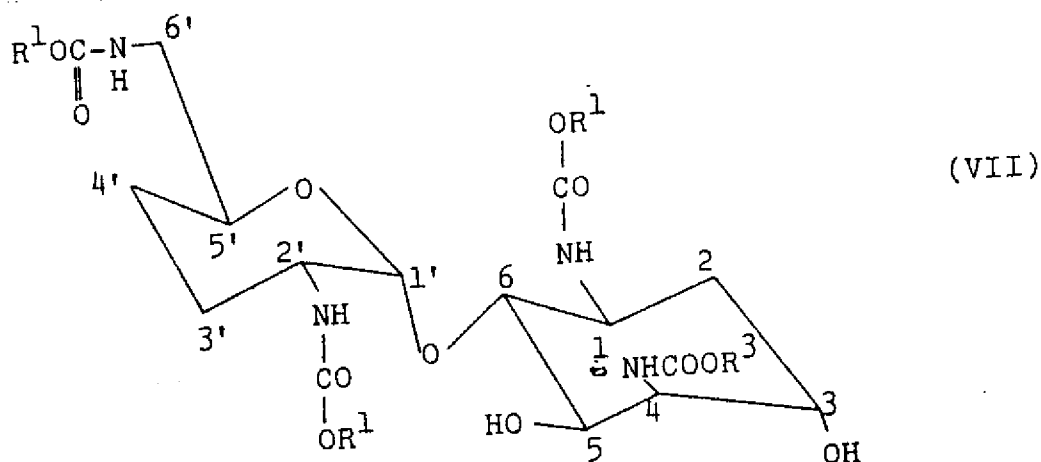


in cui R^1 , R^2 e R^3 sono come definiti sopra. Il com-

posto della formula (V) è ulteriormente trattato con un sale di metallo alcalino di un acido organico per aprire l'anello aziridinico, producendo in tal modo un composto della formula (VI):



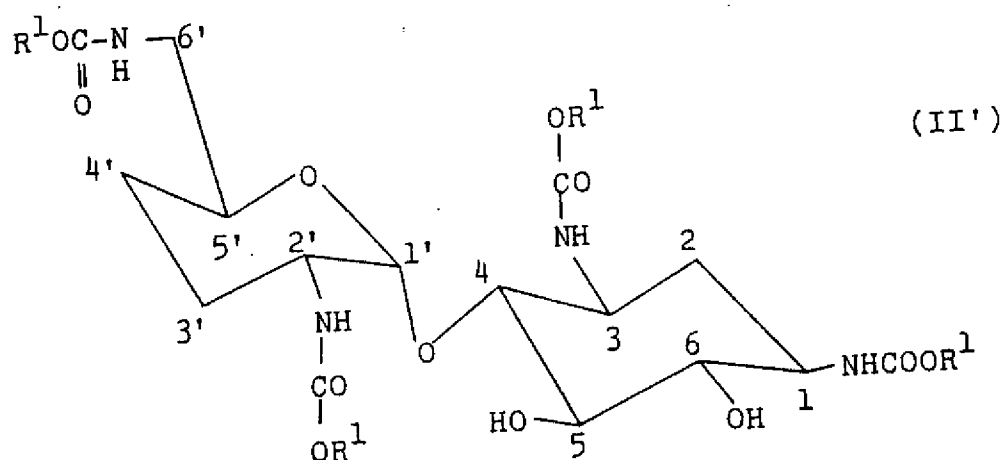
in cui R^1 , R^2 e R^3 sono come definiti sopra e R^5 rappresenta un gruppo acile come il gruppo alcanoile o benzoile. I gruppi idrossil-protettivi nelle posizioni 3- e 5- del composto (VI) vengono rimossi da quest'ultimo in un modo convenzionale e, se necessario, viene nuovamente introdotto un gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano nel gruppo 4-ammino libero, per dare un composto della formula (VII):



in cui R^1 e R^3 sono come definiti sopra. Dopodichè, i gruppi ammino-protettivi nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- del composto (VII) sono rimossi da questo in una maniera usuale, cui fa seguito la riduzione con un idruro di metallo per metilare il gruppo 4-ammino. Viene così prodotto il composto di partenza della formula (VIII) di cui sopra.

Viene data di seguito una descrizione di una applicazione preferenziale del metodo per la preparazione del composto di partenza (VIII).

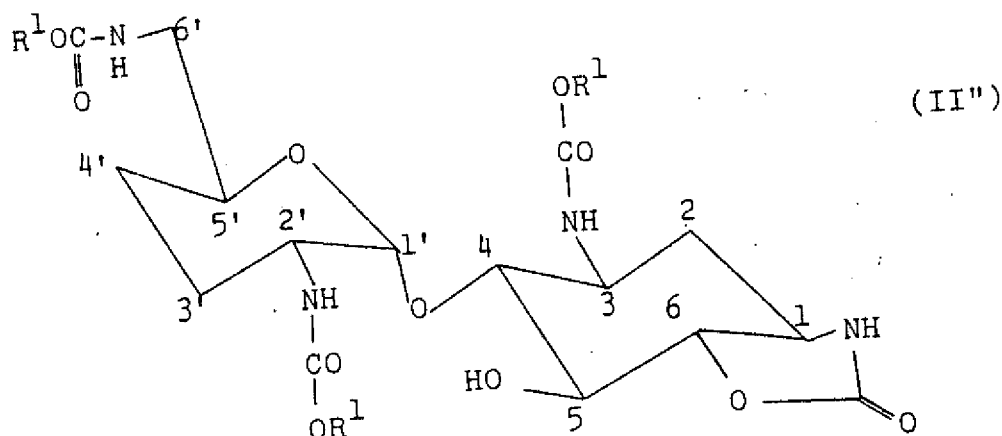
Nella prima fase, i quattro gruppi ammino nelle posizioni 1-, 3-, 2'- e 6'- della 3',4'-dideossineamina della suesposta formula (II) sono bloccati con un noto gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano per dare un derivato ammino-protetto della 3',4'-dideossineamina avente la formula (II'):



in cui ciascun R^1OCO- sta per il gruppo ammino-protettivo monovalente di tipo formante uretano, dove R^1 è un gruppo alchile, cicloalchile o aralchile. Il gruppo ammino-protettivo da usare per questo scopo è un gruppo capace di formare un anello carbammato ciclico se trattato con una base nella fase seguente. Esempi del gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano comprendono gruppi alchilossicarbonile come tert-butosicarbonile e tert-amilossicarbonile; e gruppi cicloalchilossicarbonile come cicloesilossicarbonile e gruppi aralchilossicarbonile come benzilossicarbonile e para-metossibenzilossicarbonile. Fra questi è preferibile usare un gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano, che è facilmente rimovibile dal gruppo ammino-protettivo che sarà stato successivamente introdotto nel gruppo 1-ammino della 3'-4'-dideossineamina come esposto di seguito. A tal fine è raccomandabile scegliere un gruppo aralchilossicarbonile che può essere rimosso per idrogenolisi. L'introduzione del gruppo ammino-protettivo può essere eseguita facilmente con qualunque procedura convenzionale, per esempio per reazione con un alogenuro acido, azoturo acido o estere attivo.

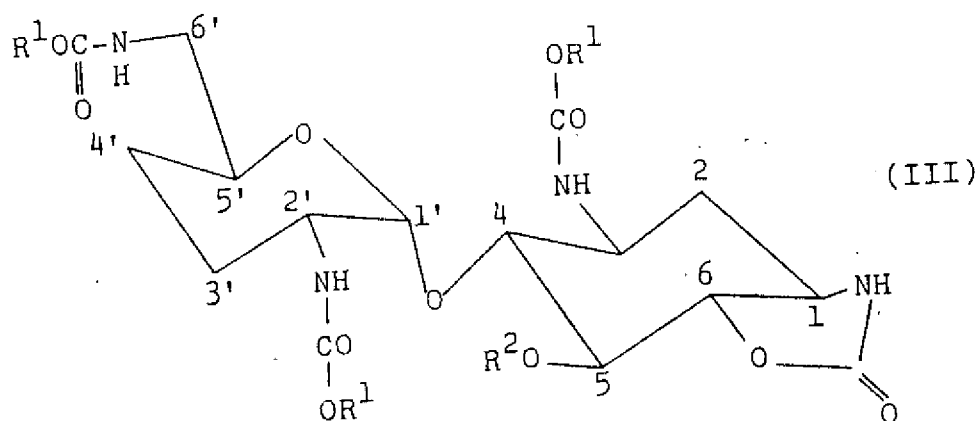
Nella seconda fase, il composto della formula (II') è trattato con una base per dare un composto in

forma di carbammato 1,6-ciclico avente la formula (II''):

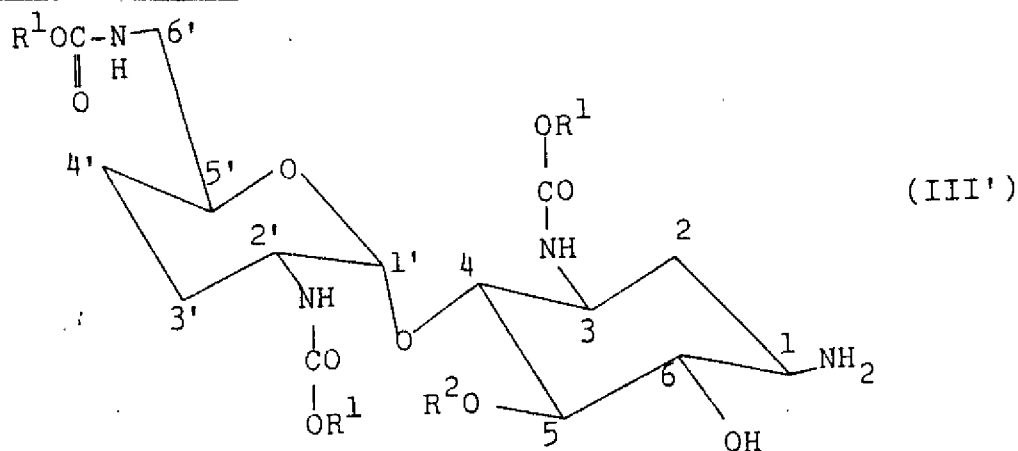


in cui R^1 è come definito sopra. Fra i quattro gruppi ammino-protettivi del derivato (II') tetra-N-protetto della 3',4'-dideossineamina, il gruppo ammino-protettivo in posizione 1- è fatto reagire facilmente persino a bassa temperatura, per esempio inferiore a 0°C , con il gruppo idrossile adiacente nella posizione 6- per formare il carbammato ciclico quando sia trattato con una base come idruro di sodio o idruro di litio in un appropriato solvente come dimetilformammide anidra.

Nella terza fase, il gruppo idrossile in posizione 5- del composto carbammato ciclico (II'') è bloccato con un noto gruppo idrossil-protettivo in un modo usuale per produrre un composto della formula (III):



in cui R^1 è come definito sopra e R^2 è un gruppo alchile, benzile o tetraidropiranile. Questa fase è seguita dal trattamento con un alcali per idrolizzare l'anello di carbammato 1,6-ciclico, ottenendo un composto della formula (III'):



in cui R^1 e R^2 sono come definiti sopra.

Il gruppo protettivo per bloccare il gruppo 5-idrossile del composto (II') di carbammato 1,6 ciclico non deve essere suscettibile alle condizioni in cui è condotta detta idrolisi alcalina. Di conseguenza, fra i gruppi idrossili-protettivi noti, vengono scel-

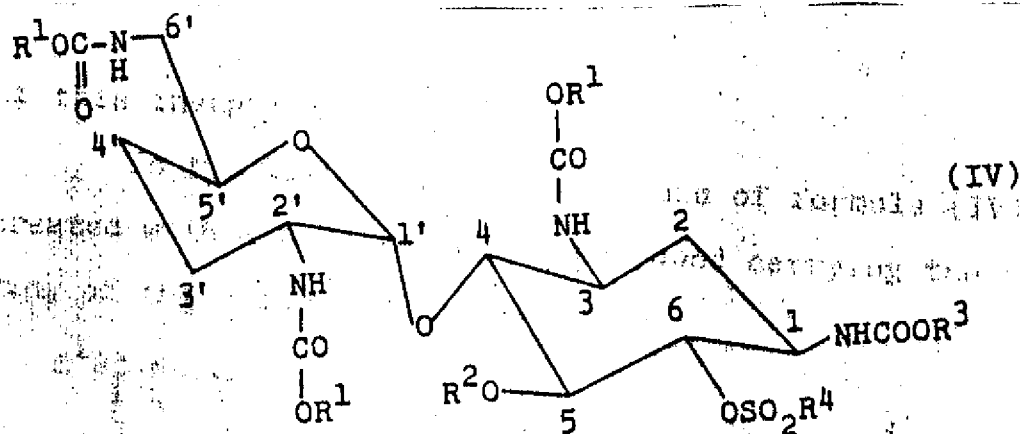
ti, quelli del tipo etere come alchil eteri e benzil eteri e quelli del tipo acetale come tetraidropiranile, i quali possono essere tutti introdotti nel gruppo 5-idrossile con una tecnica qualsiasi convenzionale. In particolare, è preferibile impiegare un gruppo tetra-idropiranile che è facilmente rimovibile per idrolisi in condizioni moderatamente acide.

La successiva idrolisi del composto carbammato 1,6-ciclico (III) può essere ottenuta con trattamento in una soluzione acquosa diluita, ad esempio di idrossido di sodio o idrossido di bario e porta alla formazione di un amminoalcool libero rappresentato dalla formula (III') di cui sopra. L'idrolisi può essere preferibilmente eseguita ad una elevata temperatura compresa fra 40 e 60°C e ad una concentrazione di alcali di 0,1 M o minore. Queste condizioni di reazione non hanno alcun effetto sugli altri gruppi ammino- e idrossil- protettivi e danno quindi luogo alla formazione preferenziale del composto 1,6-amminoalcool della formula (III').

Inoltre, il gruppo 1-ammino del composto (III') è bloccato con un diverso gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano, e il gruppo 6-idrossile è solfonilato per reazione con un reagente solfonilante, per esempio un solfonil alogenuro della formula:

R^4SO_2X , in cui R^4 è come definito sotto e X è Cl o Br.

In tal modo viene prodotto un composto della formula (IV):



in cui R^1 e R^2 hanno gli stessi significati come sopra, R^3 è un gruppo alchile, cicloalchile o aralchile ma differente dal gruppo R^1 , e R^4 rappresenta un gruppo alchile, arile o aralchile.

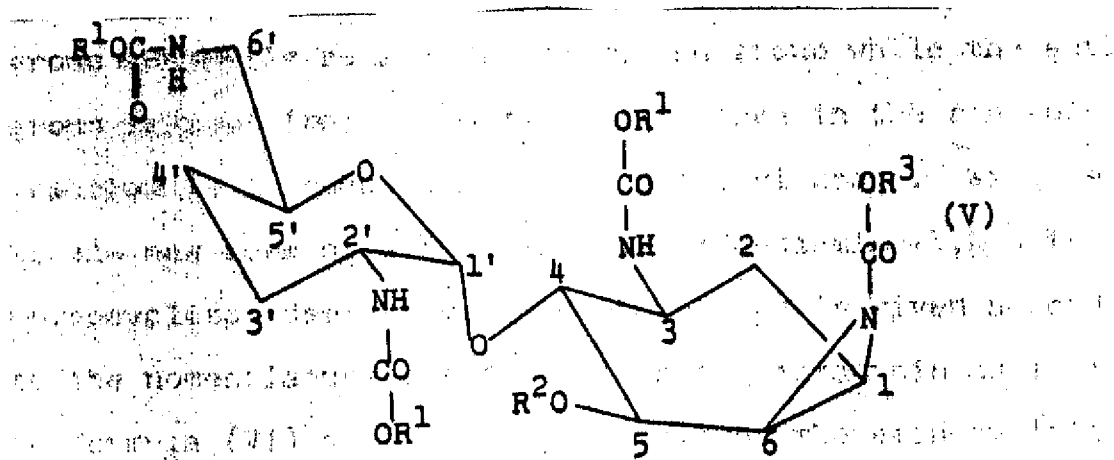
Come gruppo di protezione del gruppo 1-ammino libero del composto (III') 1,6-amminoalcool si preferisce usare ancora un gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano e particolarmente un gruppo alchilsicarbonile, poichè quest'ultimo può essere selettivamente trattenuto nel composto che si deve produrre attraverso il successivo trattamento di rimozione degli altri gruppi ammino-protettivi nelle posizioni 3-, 2'- e 6'- ed è molto vantaggioso, come specificato in seguito, per la reazione di N-metilazione.

La summenzionata solfonilazione del gruppo 6-idros

sile può essere effettuata facilmente a temperatura ambiente con una buona resa per trattamento in un opportuno solvente organico, come piridina secca, con un noto reagente di solfonilazione come solfonil alogenuro della formula R^4SO_2X , specialmente metanosolfonil, paratoluenesolfonil o benzilsolfonil cloruro.

In tal modo, viene prodotto un composto della suesposta formula (IV) che è un utile composto intermedio nel processo di questa invenzione.

Nella fase successiva, il composto della formula (IV) è trattato con una base per trattare un composto che porta l'anello di aziridina della formula seguente (V):



in cui R^1 , R^2 e R^3 sono come definiti sopra, detta fase essendo seguita da un ulteriore trattamento con un sale di metallo alcalino di un acido organico per aprire l'anello di aziridina.

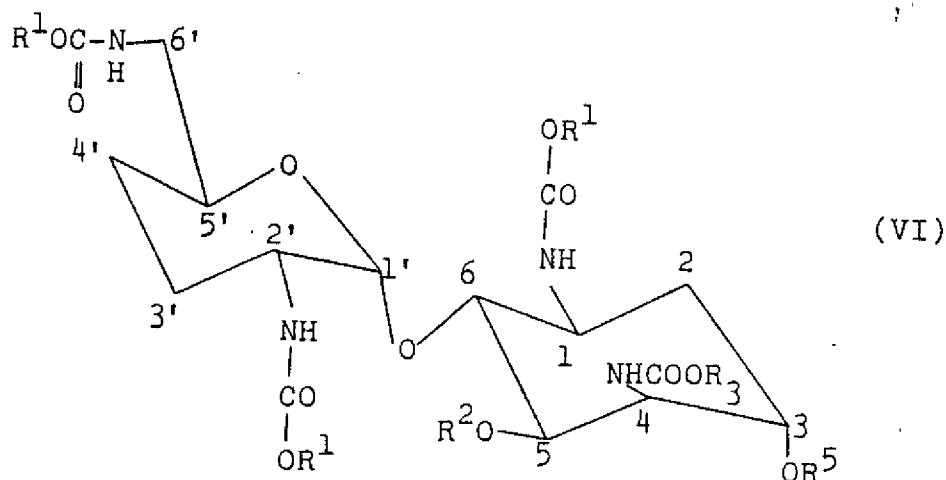
Il composto di aziridina può essere ottenuto

con una buona resa trattando il composto (IV) con una base come alcoolato di sodio in un solvente anidro come tetraidrofurano secco. La reazione può procedere anche a bassa temperatura, compresa fra 0 e 10°C, alla quale temperatura la reazione può essere generalmente portata a termine in una notte. Il composto di aziridina (V) così prodotto, che è un importante composto intermedio per la preparazione del composto oggetto di questa invenzione, può essere sottoposto direttamente (cioè senza purificazione) alla successiva reazione di apertura dell'anello.

L'apertura dell'anello aziridinico può essere effettuata con una resa favorevole per reazione con un sale di metallo alcalino di un acido organico come benzoato di sodio o acetato di sodio in un solvente anidro come dimetilformammide secca, dando luogo alla produzione di una nuova forma di aminociclitolo con trasposizione tra gruppo ammino ed il gruppo idrossile. Allora, il gruppo protettivo di tipo uretano rimane **generalmente** nel gruppo ammino, mentre il gruppo acile derivato dall'acido organico usato nella reazione di apertura dell'anello viene introdotto nel gruppo idrossile. Rispetto alla nuova forma di aminociclitolo (1,4-diammino-1,2,4-trideossiamminociclitolo derivato), la numerazione è data conformemente alla

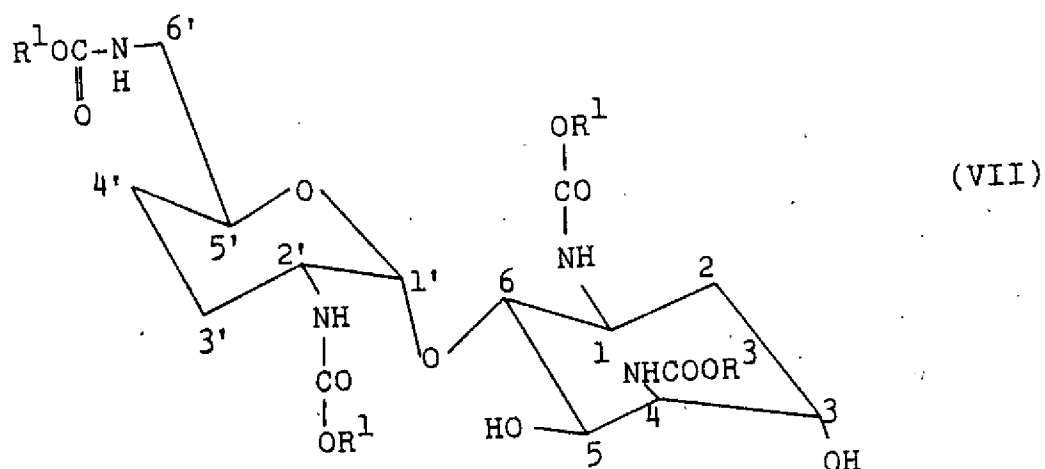
nomenclatura per la fortimicina e la istamicina come indicato a partire dalla formula (VI). Per quanto riguarda i composti di amminociclitolo (1,3-diammino-1,2,3-trideossiamminociclitolo derivati) rappresentati dalle suesposte formule (I) e (V), la numerazione è data conformemente alla nomenclatura della 2-deossistreptamina.

L'apertura dell'anello di aziridina porta alla formazione di un composto della formula (VI):



in cui R^1 , R^2 e R^3 sono come definiti in precedenza e R^5 è un gruppo acile come ad esempio un gruppo alcanoile o benzoile.

I gruppi protettivi idrossile nelle posizioni 3- e 5- del composto (VI) sono quindi rimossi da questo e, se necessario, il gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano viene di nuovo introdotto nel gruppo 4-ammino per la produzione di un composto della formula (VII):



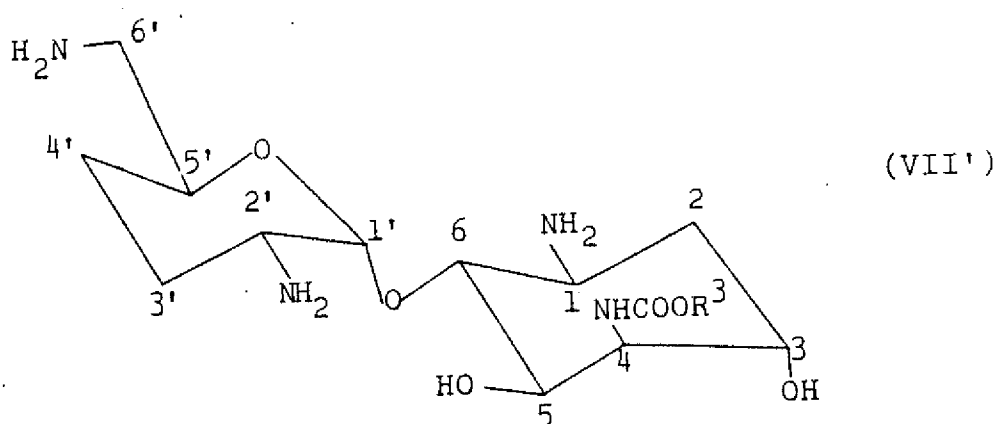
in cui R^1 e R^3 sono come definiti sopra.

Il gruppo acile quale gruppo idrossil-protettivo nella posizione 3- può essere facilmente rimosso per mezzo di un comune alcali, per esempio una soluzione di ammoniaca metanolica, mentre il gruppo idrossil-protettivo nella posizione 5- come il gruppo tetraidro piranile può, come già detto, essere rimosso con l'idrolisi acida in condizioni moderatamente acide per esempio trattandolo con una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico ad una temperatura bassa compresa fra 0 e 10°C. Se il gruppo ammino-protettivo del tipo uretano nella posizione 4- è sensibile all'idrolisi moderatamente acida, come è il caso del gruppo terbutossicarbonile, esso sarà rimosso nel corso della reazione. E' allora necessario che il gruppo ammino-protettivo di tipo formante uretano che è differente da quello usato per bloccare i gruppi 1-, 2'- e 6'- ammino venga nuovamente introdotto nel gruppo 4- ammino

libero.

Il gruppo ammino-protettivo del tipo formante uretano che deve essere nuovamente introdotto dovrebbe essere preferibilmente non sensibile alla successiva reazione per la rimozione degli altri gruppi ammino-protettivi nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- ed essere utilizzabile per la N-metilazione nella posizione 4-. Esempi preferiti di essi sono gruppi metossicarbonile e etossicarbonile.

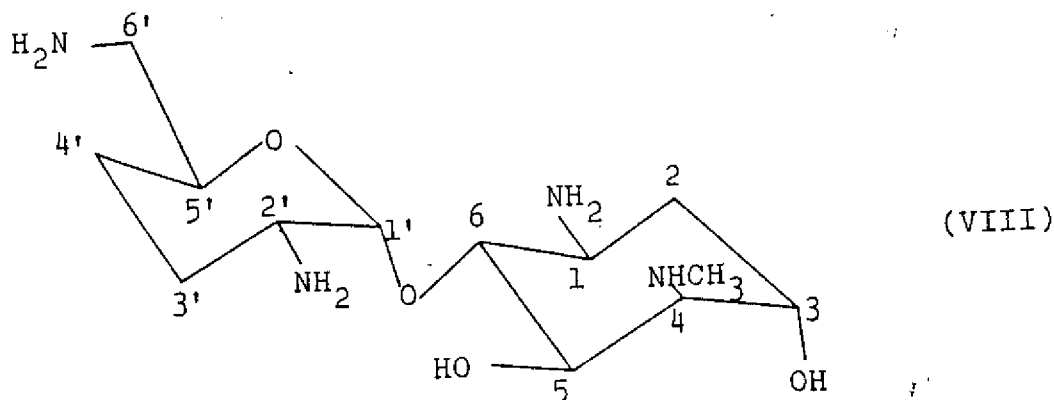
Successivamente, i gruppi ammino-protettivi nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- del composto (VII) vengono rimossi da esso per produrre un composto della formula (VII'):



in cui R^3 è come definito sopra.

Nella suesposta reazione i gruppi ammino-protettivi nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- sono rimossi selettivamente per dare il composto (VII'), cioè N⁴-deglicil-tri-N⁴, N^{6'}, O³-demetilistamicina A, in cui soltanto il gruppo 4-ammino rimane bloccato con il gruppo protettivo del tipo uretano.

Nella fase finale, il composto (VII') è ridotto con un idruro di metallo per metilare il gruppo 4-ammino, producendo N⁴-deglicil-di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A della formula (VIII):



La 4-N-metilazione può essere effettuata riducendo il composto (VII') con un idruro di metallo come idruro di litio-alluminio o idruro di boro in un solvente anidro quale tetraidrofurano secco. La reazione è preferibilmente effettuata ad una temperatura compresa fra 40 e 60°C per un periodo minimo di 10 ore. Viene così prodotto N⁴-deglicil-di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A (formula VIII), che è usata come materiale di partenza del processo di questa invenzione.

Il monocarbonato di N⁴-deglicil-di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A così prodotto è in forma di polvere incolore che si decompone a 115-118°C, dà una reazione ottica specifica di $[\alpha]_D^{22} + 102^\circ$ (c 0,65, acqua) e presenta un'analisi degli elementi: Trovato: C, 46,15; H, 7,97 ; N, 15,37% che è coincidente con i valori

teorici di $C_{13}H_{25}N_4O_4 \cdot H_2CO_3$ (C, 45,89 ; H, 8,25 ; N, 15,29%). La spettrometria di massa del monocarbonato mostra il picco M^+ a $m/e = 304$, e la sua cromatografia in strato sottile su gel di silice dà una singola macchia (positiva al reagente ninidrina) a R_f 0,12 se sviluppata con la fase inferiore di una miscela di solvente di cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 28% (2:1:1 in volume) o a R_f 0,50 se sviluppata con un solvente miscela di butanolo-etanolo-cloroformio-ammoniaca acquosa al 17% (4:5:2:5 in volume).

Secondo il procedimento di questa invenzione, il composto oggetto di questa invenzione, di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A (formula I) è preparato per mezzo di glicilazione, cioè di acilazione con glicina del gruppo metilammino in posizione 4- del composto N⁴-deglicil-di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A (formula VIII). Allo scopo di acilare il gruppo 4-metilammino con glicina con un'alta resa, è preferibile bloccare precedentemente i gruppi ammino nelle posizioni 1-, 2'- e 6'- con un gruppo ammino-protettivo. Fortunatamente, vi è una considerevole differenza di reattività fra questi tre gruppi ammino e il gruppo 4-metilammino. Pertanto, può essere preparato con alta resa un derivato tri-N-protetto del composto (VIII), i cui gruppi ammino sono stati bloccati nelle posizioni 1-,

2'- e 6'-, per mezzo di un metodo convenzionale per l'introduzione di un noto gruppo ammino-protettivo, per esempio facendo reagire il composto N⁴-deglicil-di-N⁶, O³-demetilstamicina A con 3 - 3,5 equivalenti molari di un noto reagente ammino-protettivo in forma di alogenuro acido, azotur acido, estere attivo o anidride acida. Esempi di questi noti gruppi ammino-protettivi adatti allo scopo comprendono gruppi alcossicarbonile come il tert-butossicarbonile e il tert-amilossicarbonile; gruppi cicloalchilossicarbonile come il cicloesilossicarbonile; gruppi aralchilossicarbonile come il benzilossicarbonile; gruppi acile come trifluoroacetile e O-nitrofenossiacetile; gruppi fosfinotioile come il difenilfosfinotioile e il dimetilfosfinotioile; e gruppi fosfinile come il difenilfosfinile. Noti gruppi bivalenti ammino-protettivi possono essere usati per bloccare i gruppi ammino in forma di base Schiff.

Il derivato tri-N-protetto così preparato può essere usato direttamente senza purificazione, per la successiva glicilazione del gruppo 4-metilammino. La reazione di glicilazione può essere effettuata usando la glicina stessa o un equivalente funzionale di questa secondo una qualunque tecnica nota impiegata per la sintesi dei peptidi, l'equivalente funzionale

della glicina comprendendo dicicloesilcarbodiimmidi, anidridi acide miscelate, azoturi ed esteri attivi della glicina. E'preferibile che il gruppo ammino della glicina debba essere precedentemente bloccato con un gruppo ammino-protettivo, che può essere lo stesso o diverso da quello usato per i gruppi ammino del composto N^4 -deglicil-di- N^6 , O^3 -demetilistamicina A. Esempi preferenziali del gruppo ammino-protettivo da usarsi convenientemente sono il gruppo benzilossicarbonile che è rimovibile per idrogenolisi in presenza di un catalizzatore, come l'ossido di palladio o di platino, o il gruppo tert-butossicarbonile che è rimovibile con idrolisi acida, per esempio in una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico o acetico o in una soluzione diluita di acido cloridrico.

In una forma preferenziale del presente procedimento, la reazione di glicilazione può essere eseguita usando un estere attivo di glicina ad una elevata temperatura compresa fra 40 e 60°C in un opportuno solvente organico come il diossano. Come estere attivo di alta reattività, si può menzionare l'estere N-idrosuccinimide della N-benzilossicarbonilglicina, che può essere prodotto in un modo convenzionale e che può essere usato in una proporzione di 1 a 1,5 equivalenti molari.

Il seguente riferimento illustra la preparazione del composto di partenza da usare nel procedimento dell'invenzione, e l'esempio riportato di seguito illustra il presente procedimento.

Riferimento 1

- (a) Preparazione di 1,3,2',6'-tetra-N-benzilossicarbonil-3',4'-dideossineamina (R^1 = benzile nella formula II').

2,10 g (7,23 mmoli) di 3',4'-dideossineamina sono sciolti in 100 ml di una miscela di acqua e metanolo (1:5) ed alla soluzione sono aggiunti 11,9 g (43 mmoli) di benzil 4,6-dimetilpirimidil-2-tiolcarbonato e 2,3 ml di trietilammina, facendo seguire agitazione a temperatura ambiente per 15 ore. La soluzione di reazione risultante è concentrata fino a essiccazione a pressione ridotta e, successivamente, il residuo è lavato con 300 ml di acqua e 200 ml di etere etilico per dare 6,0 g del composto del titolo in forma di polvere giallo pallida. Resa 100%. Punto di decomposizione 237-238°C.

$$[\alpha]_D^{20} + 45^\circ (c\ 2, CHCl_3).$$

- (b) Preparazione di 3,2', 6'-tri-N-benzilossicarbonil-3',4'-dideossineamina 1,6-carbammato (R^1 = benzil nella formula II").

1,34 g (1,62 mmoli) di 1,3,2',6'-tetra-N-benzi

l'ossicarbonil-3',4'-dideossineamina ottenuta nella suddetta fase (a) sono sciolti in 13 ml di dimetilformammide anidra, a cui sono aggiunti 235 mg (4,9 mmoli) di idruro di sodio (50% di sospensione in olio) mediante raffreddamento con ghiaccio in un'atmosfera di gas argon. La miscela è agitata per 4 ore, dopo di che la soluzione di reazione risultante è neutralizzata con acido acetico e versata in 500 ml di acqua ghiacciata per separare un precipitato. Il precipitato è raccolto per filtrazione e depurato per mezzo di cromatografia in colonna su gel di silice (50 g di Wako-gel C-200 prodotto dalla Wakojunyaku Co., Giappone) sviluppato con miscele di solventi di cloroformio/acetone (2:1 e 1:1) per dare 683 mg del composto del titolo. Resa 62%.

$$\left[\alpha \right]_D^{28} + 58^\circ \text{ (c 2, CHCl}_3\text{)}.$$

R_f 0,25 in cromatografia in strato sottile (TLC) su gel di silice sviluppata con cloroformio-etanolo (20:1).

(c) Preparazione di 3,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-3',4'-dideossi-5-O-tetraidropiranilneamina 1,6-carbammato (R^1 = benzile e R^2 = tetraidropirane nella formula III).

3,7 g (5,15 mmoli) di 3,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-3',4'-dideossineamina 1,6 carbammato ottenu-

ti nella fase (b) di cui sopra sono sciolti in 50 ml di dimetilformammide, e alla soluzione sono aggiunti 1,3 g (15,5 mmoli) di 3,4-diidro-2H-pirano e 196 mg (1,0 mmoli) di acido para-toluene-solfonico anidro. La miscela è lasciata riposare a temperatura ambiente per 72 ore, e 1 ml di trietilammina è aggiunto alla soluzione di reazione risultante, che è poi fatta evaporare a pressione ridotta per lasciare un residuo. Quest'ultimo è cromatografato su gel di silice (300 g di Wako-gel C-200) usando cloroformio-etanolo (100:1) come solvente di sviluppo per produrre 2,4 g del composto del titolo. Punto di decomposizione 79 - 83°C. Resa 57%. $[\alpha]_D^{22} + 33^\circ$ (c 0,5, CHCl₃). R_F 0,51 in TLC su gel di silice sviluppata con cloroformio-etanolo (15:1).

(d) Preparazione di 3,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-1-N-tert-butossicarbonil-3',4'-dideossi-6-O-mesil-5-O-tetraidropiranylneamina (R¹ = benzile, R² = tetraidropiranyle, R³ = tert-butile e R⁴ = metile nella formula IV).

2,3 g (2,86 mmoli) di 3',2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-3',4'-dideossi-5-O-tetraidropiranylneamina 1,6-carbammato proveniente dalla fase (c) di cui sopra sono sciolti in 80 ml di diossano, e 25 ml di idrossido di bario 0,05M sono aggiunti alla soluzione risul-

tante. La miscela è agitata a 60° C per 30 minuti, seguita da ulteriore aggiunta di 30 ml di idrossido di bario 0,05M ed agitazione per un'ora. Vengono poi aggiunti altri 30 ml di idrossido di bario 0,05M e tutta la miscela è agitata ancora per un'ora. Al termine della reazione, il biossido di carbonio gassoso è passato nella soluzione di reazione per separare il precipitato, che viene filtrato. Il filtrato è fatto evaporare a pressione ridotta e il residuo è estratto con 200 ml di cloroformio. L'estratto è concentrato fino all'essiccazione a pressione ridotta per dare 2,24 g di una polvere giallo pallido di 3,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-3',4'-dideossi-5-O-tetraidropiraniilneamina (R^1 = benzile e R^2 = tetraidropiraniile nella formula III').

La polvere così ottenuta è sciolta in 50 ml di metanolo, al quale sono poi aggiunti 0,4 ml di trietilammina e 1,35 g (5,7 mmoli) di tert-butil 4,6-dimetilpirimidil-2-tiolcarbonato. Dopo l'agitazione della miscela per tutta la notte a temperatura ambiente, la soluzione di reazione risultante è fatta evaporare a pressione ridotta per lasciare un residuo, che è assorbito in 20 ml di toluene, seguito da aggiunta di n-esano per separare un precipitato. Il precipitato è raccolto per filtrazione e lavato con acqua per pro

durare 2,24 g di una polvere di 3,2',6'-tri-N-benzilosicarbonil-1-N-tert-butossicarbonil-3',4'-dideossi-5-O-tetraidropirasilneamina.

Una soluzione di questa polvere sciolta in 50 ml di piridina è mescolata con 574 mg (5,7 mmoli) di metano-sulfonil cloruro, e la miscela è agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La soluzione di reazione risultante è concentrata fino all'essiccazione e il residuo purificato per mezzo di cromatografia in colonna su gel di silice (150 g di Wako-gel C-200) sviluppata con toluene-acetone (5:1) per dare 1,65 g del composto del titolo. Resa (60%). Punto di decomposizione 101-105°C. $[\alpha]_D^{22} + 29^\circ$ (c 0,44, CHCl_3).

(e) Preparazione di 3-O-benzoil-1,2',6'-tri-N-benzilossicarbonil-4-N-tert-butossicarbonil-5-O-tetraidropirasil-N⁴-deglicil-tri-N⁴,N⁶',O³-demetilistamicina A (R^1 = benzile, R^2 = tetraidropirasil, R^3 = tert-butile e R^5 = benzoile nella formula VI).

1,37 g (1,43 mmoli) di 3,2',6'-tri-N-benzilosicarbonil-1-N-tert-butossicarbonil-3',4'-dideossi-6-O-metil-5-O-tetraidropirasilneamina della fase (d) di cui sopra sono sciolti in 55 ml di tetraidrofurano secco, ed alla soluzione sono aggiunti 194 mg (3,6 mmoli) di metilato di sodio a 0°C in un'atmosfera di gas argon. La miscela ottenuta è agitata per 30 minu-

ti e quindi lasciata riposare a 10°C per 15 ore. La soluzione di reazione risultante è mescolata con una quantità in eccesso di cloruro di ammonio e acqua, seguita da estrazione con cloroformio. L'estratto è concentrato fino all'essiccazione per dare 1,23 g di una polvere del derivato di aziridina (R^1 = benzile, R^2 = tetraidropiranile e R^3 = tert-butile nella formula V). $[\alpha]_D^{22} + 10^\circ$ (c 0,5, CHCl_3). R_f 0,41 in TLC su gel di silice sviluppata con benzene-etil acetato (1:1).

1,12 g della polvere così ottenuta sono sciolti in 50 ml di dimetilformammide, a cui sono poi aggiunti 1,3 g di benzoato di sodio e la miscela è fatta reagire a 105°C per 10 ore. La soluzione di reazione risultante è mescolata con 300 ml di cloroformio e lavata due volte con cloruro di sodio acquoso saturato. Lo strato di solvente è separato, essiccato con solfato di sodio anidro e concentrato fino all'essiccazione. Il residuo è depurato per mezzo di cromatografia in colonna su gel di silice (180 g di Wako-gel C-200) sviluppata con toluene-etil acetato (5:2) per produrre 878 mg del composto del titolo. Resa 76%. Punto di decomposizione 84-86°C. $[\alpha]_D^{22} + 61^\circ$ (c 0,49, CHCl_3). R_f 0,54 in TLC su gel di silice sviluppata con benzene-etil acetato (1:1).

(f)- Preparazione di tri- $N^1, N^{2'}, N^{6'}$ -benzilossicarbonil- N^4 -tert-butossicarbonil- O^5 -tetraidropiranil- N^4 -deglicil-tri- $N^4, N^{6'}, O^3$ -demitilistamicina A (R^1 = benzile, R^2 = tetraidropiranile, R^3 = tert-butile e R^5 = H nella formula IV).

860 mg (0,88 mmoli) di O^3 -benzoil-tri- $N^1, N^{2'}, N^{6'}$ -benzilossicarbonil- N^4 -tert-butossicarbonil- O^5 -tetraidropiranil- N^4 -deglicil-tri- $N^4, N^{6'}, O^3$ -demitilistamicina A ottenuti nella fase (e) sono sciolti in 20 ml di una miscela di ammoniaca al 12% e metanolo e la soluzione è lasciata riposare a temperatura ambiente per 40 ore. La soluzione di reazione risultante è concentrata fino all'essiccazione e il residuo cromatografato su gel di silice (70 g di Wako-gel C 200) usando benzene-etil acetato (1:1) come solvente di sviluppo per dare 693 mg del composto del titolo. Resa 90%. Punto di decomposizione $88 - 90^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{22} + 44^\circ$ (c 0,5, CHCl_3). R_f 0,18 in TLC su gel di silice sviluppata con benzene-etil acetato (1:1).

(g) Preparazione di N^4 -deglicil-di- $N^{6'}, O^3$ -demitilistamicina A (composto della formula VIII).

680 mg (0,78 mmoli) di tri- $N^1, N^{2'}, N^{6'}$ -benzilossicarbonil- N^4 -tert-butossicarbonil- O^5 -tetraidropiranil- N^4 -deglicil-tri- $N^4, N^{6'}, O^3$ -demitilistamicina A, della fase (f) di cui sopra sono sciolti in 10 ml di aci-

do trifluoroacetico al 90% a 0°C e lasciati riposare per due ore, dopo di che la soluzione di reazione è concentrata ad essiccazione. Il residuo ottenuto è assorbito in 50 ml di cloroformio e lavato successivamente con idrossido di sodio acquoso 1N e acqua. Lo strato di cloroformio è separato, essiccato con solfato di sodio anidro e concentrato fino all'essiccazione. Il residuo è depurato per mezzo di cromatografia in colonna su gel di silice (50 g di Wako-gel C 200) sviluppata con un solvente miscelato di cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 17% (80 : 10 : 1) per dare 350 mg di una polvere di N¹,N²,N⁶'-benzilossicarbonil-N⁴-deglicil-tri-N⁴,N⁶',O³-demetilistamici na A. Resa 65%.

A una soluzione di 293 mg (0,42 mmoli) della polvere ottenuta come sopra in 5 ml di metanolo è aggiunta una soluzione di 27 mg di carbonato di sodio **segundo un'aggiunta di** in 0,5 ml di acqua, ^ 55 mg (0,5 mmoli) di clorocarbonato di etile a 0°C. La miscela risultante è agitata per due ore, dopo di che la soluzione di reazione è concentrata fino all'essiccazione e il residuo è assorbito in 30 ml di cloroformio e lavato con acqua. Lo strato di cloroformio è quindi essiccato con solfato di sodio anidro ed ancora concentrato fino alla essiccazione per dare 318 mg di una polvere

di tri- N^1, N^2, N^6 -benzilossicarbonile- N^4 -etossicarbo-
nil- N^4 -deglicil-tri- N^4, N^6, O^3 -demetilistamicina A
(R^1 = benzile e R^3 = etile nella formula VII). Resa
98%. R_f 0,62 in TLC su gel di silice sviluppata con
una miscela di solvente di cloroformio-metanolo-ammo-
niaca acquosa al 17% (80 : 10 : 1).

La polvere così ottenuta è sciolta in 8 ml di
una miscela di metanolo, acqua e acido acetico (2 :
1 : 1), a cui sono poi aggiunti 100 mg di palladio-carbonio
al 5% e la miscela è lasciata riposare sot-
to una corrente di gas idrogeno per due ore per effet-
tuare la idrogenolisi. Dopo di ciò, il catalizzatore
è rimosso dalla miscela di reazione, che è quindi
concentrata fino all'essiccazione. Una soluzione del
residuo sciolto in acqua è passata attraverso una
colonna di Amberlite CG-50 (forma NH_4 , 11 ml).
La colonna è successivamente lavata con acqua e am-
moniaca acquosa 0,1M e quindi eluita con ammoniaca
acquosa 0,2M. L'eluato della colonna è concentrato
fino alla essiccazione per dare 143 mg di una polve-
re di N^4 -etossicarbonil- N^4 -deglicil-tri- N^4, N^6, O^3 -de-
metilistamicina A (R^3 = etile nella formula VII').
Resa 95%. R_f 0,55 in TLC su gel di silice sviluppata
con cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 17%
(3 : 3 : 1).

130 mg (0,36 mmoli) di questa polvere sono sciolti in 6 ml di acido trifluoroacetico anidro a 0°C, la soluzione è concentrata fino alla essiccazione e il residuo assorbito in 3 ml di tetraidrofurano secco. Alla soluzione risultante sono aggiunti 15 ml del complesso tetraidrofurano-idruro di boro 1M (un prodotto della Aldorich Co., USA) e la miscela è agitata a 50°C per 18 ore. Una certa quantità d'acqua è aggiunta alla soluzione di reazione, che è quindi concentrata fino all'essiccazione e il residuo è assorbito in 10 ml di acqua. La soluzione acquosa è regolata a pH 8 e passata attraverso una colonna di Amberlite CG-50 (forma NH_4 30 ml). La colonna è successivamente lavata con acqua e soluzioni di ammoniaca acquosa 0,2 M, 0,3 M e 0,4 M e quindi eluita con ammoniaca acquosa 0,5 M. L'eluato è raccolto e concentrato fino all'essiccazione per dare 45 mg di monocarbonato del composto del titolo in forma di polvere. Resa 40%. Punto di decomposizione 115-118°C.

$\left[\alpha\right]_D^{22} + 102^\circ$ (c 0,65, H_2O). Spettrometria di massa: m/e 304 (M^+). TLC su gel di silice: R_f 0,12 se sviluppata con lo strato inferiore di cloroformio-metanolo-ammoniaca acquosa al 28% (2:1:1) e R_f 0,50 se sviluppata con butanolo-etanolo-cloroformio-ammoniaca acquosa al 17% (4:5:2:5).

Esempio 1

Preparazione di di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A
(formula I).

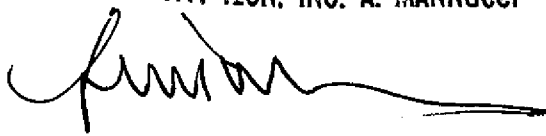
45 mg (0,123 mmoli) di monocarbonato di N⁴-de-
glicil-di-N^{6'}, O³-demetilistamicina A ottenuti nella
fase (g) del riferimento 1 sono sciolti in 3 ml di
metanolo, e alla soluzione sono aggiunti 0,017 ml
(0,123 mmoli) di trietilammina e 94,9 mg (0,38 mmoli)
di benzilossicarbonil N-idrossisuccinimide. La mi-
scela risultante è lasciata riposare a temperatura
ambiente per 6,5 ore per effettuare l'introduzione
del gruppo benzilossicarbonile come gruppo ammino-
-protettivo. La soluzione di reazione è quindi con-
centrata fino all'essiccazione e il residuo è raccol-
to in 3 ml di diossano, facendo seguire l'aggiunta
di 67,9 mg (0,18 mmoli) di estere N-idrossisuccinim-
ide di N-benzilossicarbonilglicina. La miscela co-
si ottenuta è lasciata riposare a 60°C per 6 ore per
effettuare l'introduzione del gruppo glicile, dopo
di che la soluzione di reazione è concentrata fino
all'essiccazione e il residuo è sciolto in 4 ml di
un solvente miscelato di acido acetico, metanolo e
acqua (2 : 1 : 1).

Alla soluzione risultante sono aggiunti 50 mg
di palladio-carbonio al 5% e la miscela è sottopo-

sta a idrogenolisi sotto una corrente di gas idrogeno per 4 ore per effettuare la reazione di deprotezione. La miscela di reazione è filtrata per rimuovere il catalizzatore, il filtrato concentrato fino all'essiccazione e il residuo versato in acqua. La soluzione acquosa ottenuta è passata attraverso una colonna di 6 ml di Amberlite CG-50 (forma NH_4) e la colonna è successivamente lavata con acqua, ammoniaca acquosa 0,1 M e ammoniaca acquosa 0,3 M e quindi eluita con ammoniaca acquosa 0,4 M. L'eluato è raccolto e concentrato fino all'essiccazione per dare 15 mg del monocarbonato del composto del titolo in forma di polvere. Resa 29%.

Il testo italiano qui sopra steso è la fedele traduzione dell'annessa copia autentica.

UFF. TECN. ING. A. MANNUCCI



UFFICIALE POGANTE

