



F.C. 19-IV-75

PATENTE DE INVENCION

Lp. 472.

413042

## *Memoria Descriptiva*

*sobre:*

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR PIRONO-RIFAMICINA.-

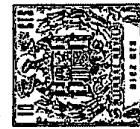
Int. Cl.<sup>2</sup>: C07D//A61K

*Solicitante:* GRUPPO LEPETIT S.p.A., entidad italia, residente en  
Via Durando 38, 20158 MILAN, Italia.-

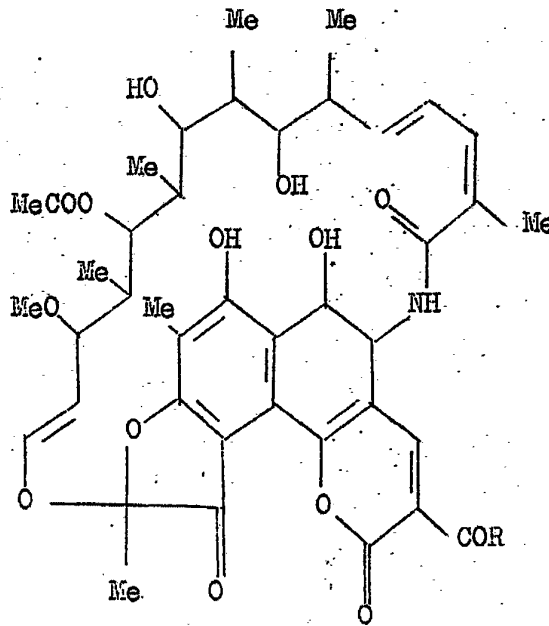
El presente invento se refiere a un proceso para la preparación de nuevos compuestos antimicrobianos. Más especialmente se refiere a la preparación de derivados pirónicos fusionados de rifamicinas, con fórmula:

5.

413042



5.



10.

15.

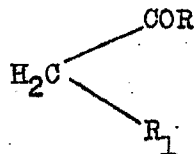
donde R es un alquilo inferior, hidroxilo, o alooxi. También se tiene por objeto del presente invento su relación con los derivados 25-desacetil y las 16, 17, 18, 19, 28, 29 hexahidro rifamicina.

20.

De acuerdo con su uso en el presente descubrimiento de la invención y sus reivindicaciones, las porciones alquilo en el término "alquilo" y "alcoxi" son cadenas alifáticas rectas o ramificadas de 1-4 átomos de carbono.

25.

Los compuestos se preparan por reacción de la 3-formil-rifamicina SV o su derivado 25-desacetil o hexahidro con una cantidad equimolecular del compuesto de la fórmula:



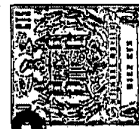
II

30.

donde R tiene el mismo significado que el citado precedentemente y R<sub>1</sub> representa CN, COOH y COOR<sub>3</sub> donde R<sub>3</sub> es una cade-



- na alifática recta de 1-4 átomos de carbono. La reacción de  
cidización pasa por una condensación del grupo  $-CH_2-$  del de-  
rivado II con el grupo formilo en la posición 3 de la rifami-  
cina seguida de una condensación entre el grupo  $R_1$  y el gru-  
po OH en la posición 4 del sistema de la rifamicina. Según  
la naturaleza del radical  $R_1$  existe una eliminación de agua,  
amoníaco o alcoholes inferiores. Las condiciones de la reac-  
ción son las que generalmente se emplean en las síntesis de  
las cumarinas iniciándose a partir de o-hidroxialdehidas  
aromáticas y que son definidas como reacción de Knoevenagel  
(Org. Reactions Vol. 15, 204). Generalmente en este caso se  
usa un catalizador básico que puede seleccionarse entre ba-  
ses amínicas como el amoníaco, piperidina, piridina, dieti-  
lamina. En otros casos se pueden seleccionar los catalizado-  
res entre las sales de amonio o sales metálicas alcalinas  
tales como el acetato de amonio, o el acetato de potasio o  
de sodio. Cuando el compuesto de la fórmula II es especial-  
mente reactivo, se puede realizar la reacción aún en ausen-  
cia del catalizador.
- Los solventes utilizados comúnmente se seleccionan  
entre los alcoholes inferiores, benceno, tetrahidrofureno,  
cloroformo y, cuando se emplean como catalizadores el acetato  
de amonio o las sales metálicas alcalinas, el ácido acético.  
La temperatura de reacción puede oscilar entre alrededor de  
0°C y la temperatura de ebullición del solvente, dependiendo  
de la velocidad de reacción de los compuestos de la fórmula  
II. Los nuevos compuestos son sólidos coloreados que pueden  
ser cristalizados a partir de solventes orgánicos comunes  
como la acetona, los alcoholes inferiores, el acetato de eti-  
lo, el tetrahidrofureno. Su solubilidad en los solventes



413042

- orgánicos depende, obviamente, del tipo y volumen del -COR sustituyente. Cuando existe la presencia de una función ácida, los compuestos también son solubles en agua como sales metálicas alcalinas. Los nuevos compuestos tienen actividad biológica contra las estirpes Gran positivas y Gran negativas y además, tienen baja toxicidad. Algunos experimentos representativos demostraron que concentraciones de compuestos de los ejemplos 1-2 que variaban en márgenes de 0,1 a 5 ml. inhiben el crecimiento del Streptococcus hemolyticus, Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae and Mycobacterium tuberculosis H<sub>37</sub>Rv.
- Estos compuestos también inhiben en bajas concentraciones el crecimiento de microorganismos que son resistentes a otros antibióticos conocidos y de uso amplio.
- Estos compuestos también tienen buena estabilidad química porque el sistema hidroquinónico que puede ser fácilmente influenciado por los agentes oxidantes ya no se halla presente.
- Otra característica muy importante de los compuestos preparados mediante esta invención es su actividad inhibitoria de las DNA-polimerasas que son características de los linfoblastos de la sangre leucémica humana y contra las típicas nucleotidil transferasas (polimerasas) de virus no utilizadas por la célula normal. Es conocido por los estudios de miembros representativos de los grupo de virus que son portadores o que inducen en las células huéspedes polimerasas como parte esencial de su reproducción. De tal modo, existen virus tales como los picornavirus o poliovirus que inducen RNA-polimerasas HNA dependientes mientras que otros grupos tales como los virus de leucemia-sarcoma son portadores de DNA-polimerasa RNA-dependientes. La presencia y el papel muy
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



importante de la DNA-polimerasa inversa transcriptasa RNA-dependiente en los virus RNA oncogénicos ha sido descubierta por D. Baltimore, Nature, 226, 1209, (1970) y por H.M. Temin et al., Nature, 226, 1211 (1970).

5. El reciente descubrimiento de la encima DNA-polimerasa RNA-dependiente en los virus de tumores RNA de especies animales ha sido confirmada por otros autores también, como resulta por ejemplo de los documentos enumerados a continuación:
10. Green y otros: Mecanismo de carcinogénesis por virus de tumor RNA. Una RNA-polimerasa RNA-dependiente en los virus de sarcoma de mûridos. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 385-393, 1970.
15. Spiegelman y otros: Caracterización de los productos de RNA-polimerasas RNA directas en virus RNA oncogénicos, Nature, Londres, 227, 563, 1970.
- Hatanaka y otros: Actividad de DNA-polimerasa asociada con virus de tumores RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 143, 1970.
20. Scolnick y otros: Síntesis del DNA por virus de tumores que contienen RNA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1034, 1970. La inferencia de los virus RNA en ciertos tumores ha sido apoyada también por otros hechos: se ha comprobado que la transcriptasa inversa se halla presente en partículas de
25. lecho humana obtenida de mujeres con historia familiar de cáncer de pecho y de poblaciones de reproducción endógeno. (Scheln y otros, Nature, 231, 97, 1971). Priori y otros (nature New Biology, 232, 16, 1971) aislaron un virus denominado ESP-1 que contenía transcriptasa inversa de células del fluido pleural de un niño con linfoma y lo han cultivado con éxito en
- 30.



cultivos de tejidos.

- La presencia en el cáncer de pecho humano de un homólogo RNA del virus RNA de tumor mamario del ratón ha sido demostrada por medio de experimentos de hibridación molecular por R. Axel y otros (Nature, 235, 32, 1972). La posibilidad de un virus de cáncer de pecho humano también fué apoyada por microscopia electrónica de la leche humana (N.H. Sarkar y otros, Nature, 236, 103, 1972). También se han aislado la actividad de DNA-polimerasa RNA-dirigida y partículas de apariencia virósica de células de rhabdomiosarcoma humano (McAllister y otros, Nature, New Biol., 235, 3, 1972). En la actualidad no hay drogas eficaces para el tratamiento de enfermedades virósicas dado que los virus y las células tienen necesidades para la terapia química es evidentemente la preparación de productos químicos adecuados que se combinan específicamente con las polimerasas virósicas o de células transformadas por los virus pero no con las polimerasas de las células huéspedes que controlan la expresión de la información genética de los virus. Los inhibidores específicos de las encimas virósicas o de las células transformadas por virus y, en particular, los inhibidores de polimerasas de los virus de tumor RNA pueden tener un papel importante en suministrar drogas para la terapia de la leucemia y de otros cánceres. La actividad inhibitoria de los compuestos de esta invención ha sido probada en la DNA-polimerasa RNA-dependiente del virus de sarcoma de múridos (endógeno) y en la actividad de la DNA-polimerasa DNA-dependiente de enzimas purificadas (poli d A-Tas plantilla). La inhibición fué probada de acuerdo con los métodos descriptos por C. Curgo y otros, Nature, New Biology, 229, 111, 1971. El efecto de diferentes concentraciones de drogas en la actividad de poli-
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



merasa fué determinada por la siguiente incorporación de  $H^3$ dATP (trifosfato de deoxiribosido de tiamina tritiada) en la fracción insoluble. El siguiente es un ejemplo característico de los procedimientos experimentales:

5. 1) Aislamiento de virus y purificación de la polimerasa viral

- El virus fué aislado y purificado a partir de células de ratas transformadas por virus de sarcoma de múridos (aislado de Moloney) y de células de ratones transformados por virus de sarcoma de múridos (aislado de Harvey) como se describió previamente (Green y otros, Proc. Nat. USA, 67, 385-393, 1970; Rokutanda y otros, Nature, 227, 1026-1028 1970). La polimerasa viriónica fué purificada 20-40 veces por incubación de virus purificado con 0,5% NP-40 (nonidet P-40) en 0,1 M NaCl, 0,01 M solución amortiguadora Tris (pH 7.6), 0,001 M EDTA durante 5 minutos a temperatura ambiente y contrifugación zonal en gradientes de sacarosa 15-30% en solución amortiguadora de 10 mM de fosfato de sodio (pH 7.4), 2,5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM ditiotreitól y 5% de glicerol durante 24 horas a 38.00 rpm en un rotor Spinco SW 41. Las fracciones de la más elevada actividad enzimática (13-17) de veintidos fracciones obtenidas fueron reunidas y almacenadas en 30% de glicerol a 70°C.

Ensayo de DNA polimerasa

- Se realizó la incubación de enzimas durante 1 hora a 37°C en 100  $\mu$ l de mezcla de reacción que contenía 40 mM de solución amortiguadora Tris (pH 8.0), 5 mM de ditiotreitól, 30 mM NaCl, 2,5 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM dATP, dGTP, dCTP, y 10  $\mu$ Ci de  $^3H$ -dATP (12-18 Ci/mmol) de acuerdo con lo descrito por Green y otros, en Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 385-393, 1970. La reacción fué terminada mediante el agrega-

413042



5. do de 150  $\mu$ l de 1N ácido perclórico. Como vehículo se agregó timo de ternero (100  $\mu$ g); el producto DNA radiactivo fué procesado como se describe en los dos documentos mencionados precedentemente. La actividad de DNA-polimerasa RNA-dependiente endógena fué medida después de agregar 0,01% NP-40 al virus purificado en el momento del ensayo. La actividad de DNA-polimerasa de polimerasa viral purificada fué medida con 2  $\mu$ g de poli d(A-T) como plantilla y sin NP-40.

Prueba de inhibición por derivados de rifamicina

10. Se disolvieron derivados de rifamicina en dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración de 5 mg/ml y se almacenaron a 4°C. Se probó la inhibición de la actividad de DiA-polimerasa RNA-dependiente endógena agregando 2  $\mu$ l de derivado diluido adecuadamente en DMSO o 2  $\mu$ l de DMSO (control) a la mezcla de ensayo antes de agregarla a los virus desorganizados que contenían 15 a 30  $\mu$ g de proteína viral. La incubación de enzimas fué realizada durante 60 minutos a 37°C. La inhibición de la enzima purificada fué probada mediante preincubación de 2  $\mu$ l de derivado o de DMSO con 30  $\mu$ l de enzima (1 a 2  $\mu$ g de proteína) durante 10 minutos a 37°C; luego se agregaron 70  $\mu$ l de mezcla de sustrato y la mezcla fué incubada más tiempo y procesado como se describe precedentemente.

25. En los ensayos representativos los compuestos preparados de acuerdo con este invento en una concentración de 2-100  $\mu$ g/ml o menos redujeron la incorporación de H<sup>3</sup>-dATP a menos de 10 por ciento del encontrado en las pruebas de control demostrando claramente la inhibición del mecanismo de carcinogénesis por los virus de tumor RNA de acuerdo con los puntos de vista bioquímicos más recientes.

30. El efecto inhibitorio de las transcriptasas inver-



5. sas ha sido confirmado también por pruebas sobre la polimerasa de virus de leucemia de muridos. La DNA-polimerasa RNA-dependiente fué preparada a partir de virioneo de Triton X 100 desorganizados de acuerdo con lo descrito por Gallo y otros en Nature, New Biology, 232, 141, (1971). Virus de los tipos Rauscher y Moloney fueron purificados previamente haciéndolos formar bandas en la región de 1.16 g/ml de un gradiente de densidad de sacarosa después de una centrifugación inicial a baja velocidad para eliminar desperdicios celulares y amortiguamiento en 60% de sacarosa hasta 20% de sacarosa. La concentración final de la preparación de los virus fué a  $10^{11}$  partículas/ml. Como plantilla se usó 70S R.N.A. endógeno. Para inhibir la enzima se comprobó que eran eficaces concentraciones de 50  $\mu$ g/ml o menos. Se comprobaron resultados similares usando polimerasas de células de tumores de origen humano. En este caso la actividad inhibitoria fué estudiada también en polimerasas de células normales para caracterizar un efecto selectivo. Los derivados de rifamicina representativos de la fórmula I han sido evaluados en sus efectos en dos DNA-polimerasas purificadas aisladas de (1) linfocitos de sangre normal humana (estimulada con PHA) (2) una línea celular de linfoblastos (derivada de un donante normal) y (3) linfoblastos de sangre leucémica humana. Se usaron plantillas sintéticas y/o naturales.
- 10.
- 15.
20. Un ejemplo típico del procedimiento experimental es el siguiente:
25. Linfoblastos de Sangre Humana
30. Se aislaron los linfoblastos leucémicos de la sangre periférica de pacientes con leucemia linfocítica aguda (ALL) por leucoforesis. Las células fueron lavadas y los eri-



trocitos eliminados por lisis hipotónica.

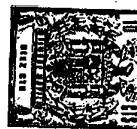
5. Los linfocitos normales fueron obtenidos de la sangre periférica de donantes sanos después de eliminar los granulocitos por cromatografía en columna de nylon. Fueron estimulados con fitohemagglutinina (PHA) durante 72 horas de acuerdo con lo descrito anteriormente (Gallo y otros, Nature, 228, 927, 1970; Gallo y otros, Science, 165, 400, 1968) a fin de llevar al máximo la actividad de la DNA-polimerasa. Sin embargo, a causa de los problemas logísticos para obtener cantidades suficientes de estas células, se utilizó una
10. línea de células de cultivo de tejido humano "normal" (1788) para suministrar DNA-polimerasas menos purificadas para algunos de los estudios iniciales del examen. Luego se estudiaron los compuestos interesantes en más detalle con las
15. enzimas más purificadas de los linfocitos de la sangre normal y leucémica. Estas células de cultivo celular fueron obtenidas de Associated Biomedic Systems, Inc.

Preparaciones de DNA Polimerasas

20. Se extractaron las DNA-polimerasas celulares y purificadas de linfocitos de sangre normal (PHA estimulador), y de linfocitos de sangre leucémica y células linfoides (1788) por homogeneización en solución amortiguadora hipotónica seguida por extracción de Triton X 100 y/o alto contenido de sal del "pellet" extralisosomático. Después de
25. la centrifugación diferencial los extractos celulares fueron purificados luego por cromatografía en columna con DEAE celulosa, fosfocelulosa y Sephadex G200.

Ensayos de DNA Polimerasas

30. Se ejecutaron los ensayos con DNA polimerasas en un volumen final de 100  $\mu$ l. La mezcla del ensayo contenía



solución amortiguadora Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM; MgAc 6.0 mM; ditiotreitól, 8.0; NaCl, 6,0 mM.

5. El ajuste del pH fué efectuado después de la adición de inhibidores que fueron previamente disueltos en DMSO. La concentración final de DMSO fué de 0,5% y todas las muestras de control incluían esta cantidad de DMSO. Una concentración de enzimas que cataliza la incorporación de aproximadamente 1,0 pmol/hora fué usada en el ensayo. La enzima fué en la mayoría de los casos pre-incubada durante
10. 5 minutos con el inhibidor. La reacción fué luego iniciada por la adición de plantillas ya sea sintéticas DNA (poli d(AT) Miles Lab.) é híbrida DNA. RNA(oligo dT. poli rA) a 5  $\mu$ g/ml o plantillas naturales: DNA de esperma de salmón activado a 50  $\mu$ g/ml, y RNA viral endógeno 70S; 10  $\mu$ Ci de
15. ( $^3$ H-metil)-TTP (New England Nuclear, 18,6 mCi/ $\mu$ mol, liofilizado y rediseuelto en 0,01 M HCl inmediatamente antes de usar) y dATP ( $8 \times 10^{-5}$  M, con plantilla sintética) o las tres trifosfatos deoxinucleosidos ( $8 \times 10^{-5}$  M con reacciones plantilladas RNA o DNA. En ciertos experimentos no hubo
20. preincubación de enzimas con el inhibidor. En estos casos las reacciones se iniciaron agregando la enzima a la mezcla completa de reacción que incluía el inhibidor. Se extrajeron muestras al comienzo de la incubación y después de 30 minutos y fueron terminadas por el agregado de 2 ml de pirofosfato de sodio 0,08 M, y precipitadas en 12,5% de ácido
25. tricloroacético (TAC) con RNA de levadura (400  $\mu$ g) como vehículo. Los productos fueron recogidos en filtro Millipore, lavados extensivamente con TCA al 5% y 1 ml. de mezcla de DMSO-etanol-0,1 M NaCl (0,5:70:29,5), secados y contados en
30. 2 ml. de BBS<sub>3</sub> (Beckman) y 10 ml de liquifluor (New England



Nuclear) en un contador de centelleo en líquido Packard.

5. Se comprobó que las concentraciones que variaban de 5 a 20  $\mu\text{g/ml}$  provocaban una inhibición del 50% de polimerasa leucémica con una plantilla de DNA sintética. Las reacciones templadas por una plantilla de RNA sintética (poli rA. rU) fueron todavía más susceptibles.

10. Los experimentos representativos ejecutados con plantillas naturales sobre polimerasas de células normales o de tumor mostraron una mayor susceptibilidad de las enzimas de tumor a los compuestos probados.

15. Otras características biológicas exhibidas por los nuevos derivados de rifamicina comprenden la inhibición de formación de focos en células de ratón, rata y humanas por la estirpe Moloney y Kirsten de virus de sarcoma de móridos; la inhibición selectiva de producción de virus por células de ratón y humanas ya transformadas; la detección de células revertientes usando los sistemas de células de ratón y rata no productores transformados por virus de sarcoma de mórido. Los compuestos de rifamicina preparados de acuerdo con el presente invento además han confirmado su toxicidad selectiva para las células transformadas por el virus de origen de ratones, ratas y seres humanos cuando fueron probadas en su capacidad de formar colonias.

25. En estudios para determinar el efecto de los compuestos para inhibir la formación de focos por el virus de carcinoma Moloney en cultivos de tejidos BALB/3T3 se emplea el siguiente procedimiento. Se prepara un cultivo de células BALB/3T3 en frascos de plástico de 250 ml en un medio de crecimiento que consiste en un medio esencial mínimo de Eagle con 10% de suero fetal bovino. Se efectúan cuentas celulares con

30.



5. un contador Coulter después de suspender las células con tripsin-verseno y diluirlas en el medio de crecimiento. Se emplea el virus de sarcoma de mûridos Moloney como un homogenizado de turmo. Se pasa cuatro veces en una línea celular de embrión de ratón de origen suizo de alto pasado y es ensayada en cuanto a unidades formadores de focos de células BALB/3T3. Para realizar los estudios, se usa una modificación del método descrito por Hartley y Rowe, Nat. Acad. Sci., 55, 780, (1966). En el presente trabajo, los frascos son sembrados con  $1-2 \times 10^6$  células en 25 ml de medio de cultivo e incubados a 37°C durante 24 horas. Después de extraer los fluidos, se introduce virus en una cantidad predeterminada de unidades formadores de focos en 0,5 ml. de medio de cultivo y se los permite adsorber sobre la monocapa o capa única de células durante 90 minutos a 37°C. Siguiendo a este periodo de adsorción, una cantidad predeterminada, generalmente como dosis de proximadamente 5 a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de un compuesto pironerifamicínico (disuelto previamente en dimetilsulfóxido en una concentración de 1 Mg/ml) y llevada en 25 ml de medio de cultivo, es agregada y los cultivos son devueltos a la incubadora. Como control, se agrega a un cultivo separado dimetilsulfóxido solo es agregado al medio de cultivo. Después de tres días de incubación, se les cambia el fluido a los cultivos y se cuentan los focos de células transformadas al séptimo día.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

Con este mismo método, se estudia el virus de la estomatitis vesicular, serotipo de New Jersey. Los métodos utilizados para cultivar y ensayar este virus han sido descritos por Hackett y otros, Virology, 31, 114, (1967).

30. Estas propiedades indican que estos compuestos po-



seen una actividad inhibitoria efectiva sobre tumores producidos por virus en los animales.

Para ilustrar una realizaci3n del invento se proporciona la preparaci3n de los siguientes compuestos en los que la nomenclatura y la numeraci3n se dan en forma arbitraria considerando el sistema 2-pirona fusionado en la posici3n 4,3 con la 4-deoxirifamicina SV. Los n3meros con indice se refieren a las partes relacionadas con el sistema pir3nico mientras que los que no llevan indicaci3n se refieren a la parte del sistema rifamicina.

EJEMPLO 1

3'-Acetil-2'-pirono/5',6'-c/4-desoxirifamicina SV

A una soluci3n de dos moles de 3-formilrifamicina SV en 70 ml de tetrahidrofurano, se agregan 1 ml de piperidina y 2 moles de acetoacetato de etilo. Despu3s de 30 minutos de ebullici3n queda completada la reacci3n. La mezcla de la reacci3n es evaporada hasta desecarse y luego tratada con acetato de etilo y acidificada hasta el pH 2 con 3cido mineral. Se extrae la fase org3nica con 3 veces su volumen de agua. La capa acuosa es luego extraida con acetato de etilo y la soluci3n org3nica, despu3s de secar, es evaporada hasta desecarse. El residuo crudo es cristalizado de acetona.

Punto de fusi3n 175-183°C - Rendimiento 50%

Puede prepararse el mismo compuesto final usando acetoacetato de metilo en lugar de acetoacetato de etilo.

An3lisis:

Calculado para  $C_{42}H_{49}NO_{14}$  C 63,71; H 6,24; N 1,77

Hallado C 60,72; H 6,32; N 1,36

Repectro Ultravioleta  $\lambda$  máx 525 346 311  
 $E_{1cm}$  82,7 295,1 233,1

413042



EJEMPLO 2

3'-carboxi-2'-pirono /5,6'-c/4-desoxirifamicina SV

5. A una solución de 2 moles de 3-formilrifamicina SV en 70 ml de cloroformo se agregan 2 ml de piperidina y 2 moles de ácido malónico. Después de refluir durante 4 horas la reacción queda completada. La mezcla de reacción es evaporada hasta desecarse y luego tratada con acetato de etilo y acidificada hasta el pH 2 con ácido mineral. La fase orgánica es extraída con un volumen de agua de alrededor 3 veces su volumen. La capa acuosa es luego extraída con acetato de etilo y la solución orgánica, después de secar, es evaporada hasta desecarse. El producto crudo es cristalizado de acetona.

10.

Punto de fusión 191-202°C

15. Rendimiento 40%

Análisis:

Calculado para  $C_{41}H_{47}NO_{15}$  C 62,03; H 5,97; N 1,76

Hallado C 61,69; H 5,68; N 1,41.

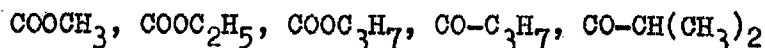
Espectro Ultravioleta  $\lambda$  máx. 475 333 307

20. 1%

E 1 cm. 116,7 328 269,2

De acuerdo con procedimientos alógos a aquellos descriptos en los ejemplos precedentes es posible preparar derivados pirónicos de rifamicina de la fórmula I donde COR tiene el siguiente significado:

25.



N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas,

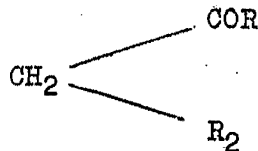
30.



413042<sup>17</sup> 27



o 16, 17, 18, 19, 28, 29 hexahidro con una cantidad aproximadamente equimolecular de un compuesto de la fórmula:



donde R tiene el mismo significado de lo expresado anteriormente y R<sub>2</sub> representa un grupo COOH, CN y COOR<sub>3</sub>, donde R<sub>3</sub> es una cadena alifática recta de 1-4 átomos de carbono.

10. 2.- Procedimiento para preparar pirono-rifamicina, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.-

Esta Memoria consta de 17 hojas escritas a máquina por una sola cara.

27 MAR. 1973

15.

Madrid,

GRUPPO LEPETIT S.p.A.-

J. GOMEZ ACEBO Y MUDEK  
p. p. Firmado: L. Goeta Ferrández