



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



(51) Int.Cl.⁴ C 07 F 9/65

- (21) Patentansøgning nr.: 2693/80
 (22) Indleveringsdag: 24 jun 1980
 (41) Alm. tilgængelig: 29 dec 1980
 (44) Fremlagt: 08 maj 1989
 (86) International ansøgning nr.: -
 (30) Prioritet: 28 jun 1979 GB 7922461

- (71) Ansøger: *GRUPPO LEPETIT S.P.A.; via Durando 38; 20158 Milano, IT
 (72) Opfinder: Renato *Cricchio; IT

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af vandopløselige hydrazoneer af 3-formylrifamycin SV

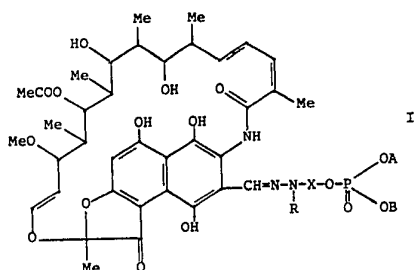
(56) Fremdragne publikationer

DK freml. skrift nr. 115993 (dansk patent 115993)

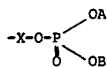
2693-80

(57) Sammendrag:

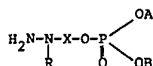
Fremstilling af hidtil ukendte vandopløselige 3-formyl-
rifamycin SV-hydrazoneer med den almene formel



hvor R betegner hydrogen, C₁₋₅ alkyl eller



X C₁₋₅ alkylen, A hydrogen, C₁₋₅ alkyl, fenyl, benzyl eller en kation og B hydrogen eller en kation, ved omsætning af 3-formylrifamycin SV eller en ækivalent dertil, især en acetal eller Schiffsk base deraf, med et hydrazinoalkylfosfat med formlen

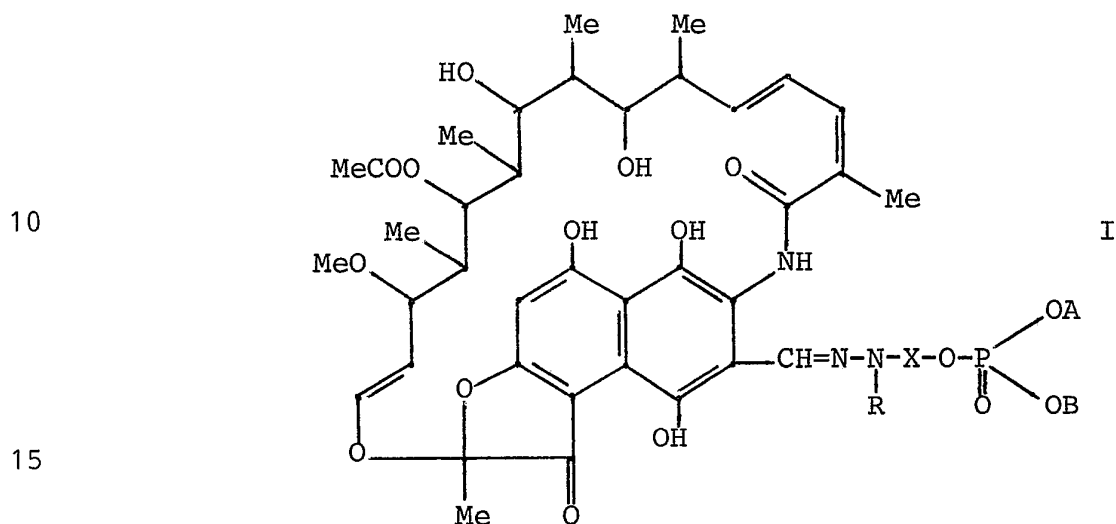


II

hvor R, X, A og B har de angivne betydninger. Forbindelserne er effektive antibiotika, fx mod Staphylococcus aureus eller Escherichia coli, og har den særlige fordel at de er i høj grad vandopløselige og derfor egner sig godt til parenteral indgift.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte vandopløselige rifamycinderivater, nærmere betegnet vandopløselige hydrazoner af 3-formylrifamycin SV og med den almene formel

5



15

hvor

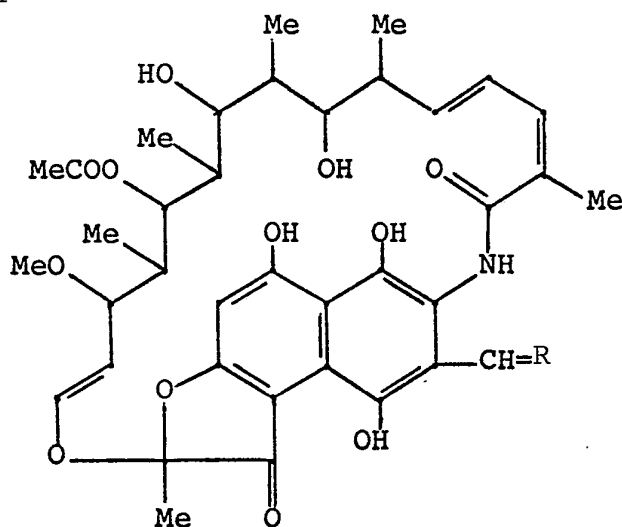
20 R er et hydrogenatom eller en alkylgruppe med 1-5 kulstofatomer,
 X en alkylgruppe med 1-5 kulstofatomer,
 A et hydrogenatom eller en farmaceutisk acceptabel kation og
 B et hydrogenatom eller en farmaceutisk acceptabel kation.

I nærværende beskrivelse med tilhørende krav kan alkyl-
 25 og alkylengrupper med 1-5 kulstofatomer have lige eller grenet
 kæde. Repræsentative eksempler på førstnævnte er metyl, ætyl,
 propyl, isopropyl, isobutyl, pentyl og neopentyl. Som eksem-
 pler på alkylengrupper med 1-5 kulstofatomer kan nævnes lige-
 kædede eller gredede divalente sådanne grupper såsom metylen,
 30 ætyliden, ætylen, propylen, ætylætylen, trimetylen, tetramety-
 len og pentametylen. Med betegnelsen "farmaceutisk acceptable
 kationer" menes kationer afledet af uorganiske eller organiske
 baser som danner vandopløselige salte med fosforsyredelen af
 molekylet og som ikke bevirker ugunstige fysiologiske virknin-
 35 ger når de indgives til dyr eller mennesker i doser der er i
 overensstemmelse med god farmakologisk aktivitet. Kationerne

er fortrinsvis afledet af sådanne baser som natriumhydroxyd, kaliumhydroxyd, kalciumhydroxyd, magnesiumkarbonat og ammoniak samt primære, sekundære og tertiære aminer såsom ætanolamin, diætanolamin, diætylamin, triætylamin, dimetylamin, triætanolamin og N,N'-dibenzylætylendiamin.

De omhandlede vandopløselige rifamycinderivater kan bruges som antibakterielle midler og indgå i farmaceutiske præparater som bruges til sådanne formål. Foruden at have bevaret de bemærkelsesværdige antibakterielle egenskaber hos rifamycin-antibiotika såsom hydrazoner af 3-formylrifamycin SV, udviser de omhandlede forbindelser høj opløselighed i vandige medier og tåles godt lokalt. På grund af disse egenskaber er disse nye rifamycinderivater meget velegnede som antibakterielle midler til parenteral indgift.

Fra DK patentskrift nr. 115 993 kendes der derivater af rifamycin SV med den almene formel



hvor R - blandt mange muligheder - kan være en hydrazongruppe med formlen $=N-NR^2R^3$ (hvor R^2 og R^3 bl.a. kan være hydrogen eller alkyl). De fra skriftet kendte rifamycinderivater er generelt tungt eller ikke vandopløselige. Det kunne ikke ud fra kendskabet til nævnte skrift forudses at man ved at vælge netop hydroxyætylhydrazoner mellem de mange muligheder, skriftet anviser, og omdanne dem til netop fosforsyreestere ville opnå rifamyciner med god vandopløselighed. Man kunne end ikke forudse at sådanne forbindelser overhovedet kunne fremstilles. Forestringen med fosforsyre må nødvendigvis ske i surt miljø, og det er velkendt at fosforsyre kan hydro-

lysere hydrazoner. Der forelå således en nærliggende risiko for at hydrolysere hydrazonbindingen og at få dannet 25-desacetylrifamycinderivatet som biprodukt, idet det er kendt at dette biprodukt dannes i surt miljø. Det er således
5 overraskende at de foreliggende forbindelser kan fremstilles og er stabile. Deres antibakterielle egenskaber afviger ikke væsentligt fra de antibakterielle egenskaber af de fra nævnte patentskrift kendte hydrazonderivater.

Rifamycinerne med den almene formel I er fuldstændig
10 opløselige i vand eller i blandinger af vand med andre farmaceutisk acceptable opløsningsmidler som er blandbare med vand. Hensigtsmæssige opløsningsmidler der kan blandes med vand er fx polyvalente alifatiske alkoholer såsom ætylenglykol, propylenglykol, glycerol og blandinger deraf. Til sådanne opløsninger kan der sættes puffere for at opretholde pH-værdien i et
15 fysiologisk hensigtsmæssigt område. Fx er 10 g af den forbindelse med den almene formel I, hvor R betegner metyl og X en gruppe $-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-$, fuldstændig opløselig i 100 ml vand som er

20 pufret til pH 7,38 (fosfatpuffer). Den tilsvarende forbindelse hvor A og B begge er en natriumkation er endog endnu mere opløselig; 100 ml vand kan opløse ca. 50 g af denne forbindelse.

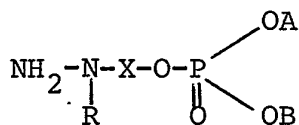
Når de bruges til parenteral indgift kan opløsningerne i
25 deholdende de omhandlede rifamycinderivater også få tilsat andre bestanddele for at give isotoni med legems væsker. Desuden kan det være hensigtsmæssigt i opløsningerne at inkorporere et lokalanæstetikum som velkendt på området.

Selv om de vandige opløsninger af rifamycinderivaterne med formel I er særlig velegnede til parenteral indgift, kan
30 de også med fordel bruges til indgift via fordøjelseskanalen i form af fx dråber til pædiatrisk anvendelse, eller forbindelsen kan bruges til extern påføring i form af opløsninger, mund-

skyllevæsker eller collyria.

Når de omhandlede rifamycinderivater bruges til parenteral eller oral indgift kan de let absorberes fra bæreropløsningen og overføres hurtigt i de inficerede legemsområder via cirkulationssystemet.

Ifølge opfindelsen fremstilles de omhandlede forbindelser på den i krav 1's kendetegnende del angivne måde. Man kondenserer med andre ord et passende rifamycinsubstrat med et fosforyleret hydrazin. Egnede rifamycinsubstrater er fx rifamycin SV som er substitueret i stilling 3 med en formylgruppe, eller en kemisk ækvivalent dertil såsom en schiffsk base eller en acetal. Nærmere betegnet kan der ifølge opfindelsen som udgangsmateriale anvendes 3-formylrifamycin SV eller en tilsvarende acetal eller schiffsk base. Udgangsmaterialet bringes i et passende opløsningsmiddelsystem i kontakt med et hydrazinoalkylfosforsyrederivat med formlen



hvor R, X, A og B har de foran angivne betydninger.

Andre rifamycinderivater som vides at opføre sig på samme måde som 3-formylrifamycin over for hydraziner kan også bruges som rifamycinsubstrater til kondensation med de fosforylerede hydraziner. Fx kan man ved den foreliggende fremgangsmåde som udgangsmaterialer også anvende de 1,3-oxazin(5,6-c)-rifamycinderivater der anvendes som udgangsmaterialer i fremgangsmåden ifølge britisk patentskrift nr. 1.454.802 eller de pyrimidorifamyciner der anvendes som udgangsforbindelser i den fremgangsmåde der er beskrevet i japansk patentansøgningspublikation nr. JP 2087198 (Derwent C.P.I. 62189 Y).

Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen opløses rifamycinsubstratet i et organisk opløsningsmiddel der er blandbart med vand eller en blanding af et vandblandbart organisk opløsningsmiddel og vand. Eksempler på sådanne opløsningsmidler er acetone, en lavtkogende alkanol, tetrahydrofuran, dioxan eller dimetylformamid, og den dannede opløsning bringes i kontakt med det ønskede hydrazinoalkylfosforsyrederivat, fortrinsvis opløst i vand og fortrinsvis i overskud

i forhold til den molmængde der er støkiometrisk udkrævet. Blandingen omrøres ved stuetemperatur indtil tyndlagskromatografisk bedømmelse viser at reaktionen er fuldført. Efter yderligere tilsætning af vand syrnes reaktionsblandingen til en pH-værdi på 2-3 og ekstraheres derefter med et ikke-vandblandbart organisk opløsningsmiddel. Reaktionsproduktet udvindes fra det organiske lag ved koncentrering. De salte af forbindelserne med formel I, hvor A og B begge er hydrogen, dvs. forbindelser med formel I hvor A og/eller B er en farmaceutisk acceptabel kation, fremstilles ved tilsætning af den ønskede base til en opløsning af den tilsvarende syre i et vandigt opløsningsmiddel og påfølgende inddampning af blandingen til tørhed.

Ifølge opfindelsen kan hydrazinoalkylfosforsyrederivatet bruges i overskud ud over den støkiometrisk udkrævede mængde. Særlig fordelagtigt fremstiller man ifølge opfindelsen en forbindelse I hvor R er hydrogen eller metyl, X ætylen, metylætylen eller ætylætylen og A og B uafhængigt af hinanden hydrogen eller natrium.

De hydrazinoalkylfosforsyrederivater der bruges til fremstilling af de omhandlede forbindelser kan fremstilles ved den fremgangsmåde der er beskrevet for hydrazinoætylfosforsyre af J. Rabinowitz et al. i *Helvetica Chimica Acta*, 52, 250 (1969). De hydroxyalkylhydrazinderivater der bruges til fremstilling af hydrazinoalkylfosforsyrerne kan fremstilles ved metoder der er beskrevet i litteraturen ved direkte alkylering af hydrazin med hydroxyalkylhalogenider eller -sulfater. Når X er en ætylengruppe eller en alkylsubstitueret ætylengruppe er en foretrukken fremgangsmåde til fremstilling af β -hydroxyalkylhydrazinerne den som er beskrevet af D.L. Trepanier et al. i *J. Org. Chem.* 29, 673 (1964).

Den antibakterielle aktivitet af de omhandlede forbindelser kan eftervises i repræsentative forsøg med to sæt mus inficeret med henholdsvis *Staphylococcus aureus* Tour og stammer af *Escherichia coli*. Værdierne for ED_{50} for forbindelserne ifølge omstående eksempler 2, 3 og 4 mod de to mikroorganismestammer samt toxiciteten (LD_{50}) af forbindelserne fremgår af nedenstående tabel, hvor s.c. står for subkutan, i.v. for intravenøs og i.p. for intraperitoneal indgift.

Forbindelse ifølge eks.	ED ₅₀ (mg/kg)		LD ₅₀ (mg/kg) hos mus	
	S. aureus Tour	s.c. E. coli	i.v.	i.p.
2	0,812	98,5	665	770
3	0,812	130	525	>500
4	1,51	106	507	592

Når forbindelserne bruges som antibakterielle midler kan de indgives til patienter i mængder som varierer i afhængighed af flere faktorer såsom sygdommens alvor, indgiftsperioden og indgiftsmåden. I almindelighed ligger en daglig effektiv dosis ved parenteral eller oral indgift fra ca. 0,5 til 50 mg pr. kg legemsvægt idet en dagsdosis på 1-20 mg/kg legemsvægt foretrækkes.

Nogle eksempler tjener til nærmere belysning af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Eksempel 1

3-[[[2-(Fosfonoxy)-ætyl]-hydrazono]-metyl]-rifamycin SV (formel I: R=H, X=-CH₂-CH₂-, A = B = H).

Til en opløsning af 7,25 g 3-formylrifamycin SV i 50 ml acetone sættes der 4 g 2-hydrazinoætanolfosfat (fremstillet ifølge J. Rabinowitz et al., Helv. Chim. Acta 52, 250, 1969), opløst i 200 ml vand. Blandingen omrøres i 4 timer ved stuetemperatur og fortyndes derefter med 250 ml vand og ekstraheres to gange med 100 ml butanol for at eliminere de dannede biprodukter. Den vandige fase syres til pH 2,5 og ekstraheres derefter med 3 x 200 ml ætylacetat. De organiske ekstrakter forenes og tørres over vandfrit natriumsulfat. Inddampning af ætylacetatopløsningen under vakuum giver 4 g af den i overskriften angivne forbindelse i form af et fast stof som sønderdeles ved opvarmning til 200°C.

Beregnet for C₄₀H₅₄N₃O₁₆P: C 55,61 H 6,30 N 4,86 P 3,58

Fundet: C 53,94 H 6,27 N 4,98 P 3,60%.

UV-spektrum i pH 7,38 puffer:

λ_{\max}	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$
230	330
330	251
470	146

IR- og NMR-data er i overensstemmelse med den antagne struktur.

Eksempel 2

3-[[[2-(Fosfonoxy)-propyl]-metylhydrazono]-metyl]-rifamycin
 SV (formel I: R = CH₃, X = -CH₂-CH(CH₃)-, A = B = H)

Til en opløsning af 7 g 3-formylrifamycin SV i 250 ml
 5 50% vandig acetone sættes der 12 g 1-(1-metylhydrazino)-2-
 propanolfosfat (fremstillet ved samme fremgangsmåde som den
 der er beskrevet for det tilsvarende ætylderivat af J.
 Rabinowitz et al., Helvetica Chimica Acta 52, 250, 1969;
 produktet bruges uden yderligere rensning). Blandingen omrøres
 10 ved stuetemperatur i 4 timer og fortyndes derefter med 250 ml
 vand og ekstraheres med 2 x 100 ml butanol. Den vandige fase
 syrnes til pH 2,7 og ekstraheres derefter med 3 x 200 ml ætyl-
 acetat. De forenede organiske lag tørres over natriumsulfat
 og koncentrerer derefter under vakuum hvorved der vindes 3,5 g
 15 af den i overskriften angivne forbindelse i form af et fast
 stof som sønderdeles ved opvarmning til 170°C.

Beregnet for C₄₂H₅₈N₃O₁₆^P: C 56,55 H 6,55 N 4,71 P 3,47

Fundet: C 55,30 H 6,55 N 5,07 P 3,90%.

UV-spektrum i pH 7,38 puffer:

	λ_{\max}	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$
20	338	272
	475	163

IR- og NMR-data er i overensstemmelse med den antagne struktur.

100 mg af produktet omdannes til det tilsvarende dina-
 25 triumsalt ved opløsning i 10 ml 50% metanol indeholdende to
 ækvivalentmængder natriummetoxyd og indampning af opløsningen
 til tørhed under vakuum. Saltet smeltede ikke ved 150°C og
 havde IR- og NMR-data i overensstemmelse med den antagne struk-
 tur.

30

35

Eksempel 3

 3-[[[2-(Fosfonoxy)-butyl]-metylhydrazono]-metyl]-rifamycin SV
 (formel I: $R = CH_3$, $X = -CH_2-CH(C_2H_5)-$, $A = B = H$)

5 Dette produkt vindes ud fra 7 g 3-formylrifamycin SV og 11 g 1-(1-metylhydrazino)-2-butanol ved den fremgangsmåde der er beskrevet i eksempel 2. Udbytte 2,8 g. Produktet sønderdeles ved 160°C.

10 Beregnet for $C_{43}H_{60}N_3O_{16}P$: C 57,01 H 6,67 N 4,64 P 3,42

Fundet: C 55,95 H 6,77 N 5,01 P 3,56%.

UV-spektrum i pH 7,38 puffer:

λ_{max}	$E_{1cm}^{1\%}$
232	277
339	251
475	148

IR- og NMR-data er i overensstemmelse med den antagne struktur.

Eksempel 4

 3-[[[2-(Fosfonoxy)-etyl]-metylhydrazono]-metyl]-rifamycin SV
 (formel I: $R = CH_3$, $X = -CH_2-CH_2-$, $A = B = H$)

20 Dette produkt vindes ud fra 14 g 3-formylrifamycin SV og 10 g 2-(1-metylhydrazino)-etanol ved den fremgangsmåde der er beskrevet i eksempel 1. Udbytte 8,5 g. Produktet sønderdeles ved 150°C.

25 Beregnet for $C_{40}H_{56}N_3O_{16}P$: C 56,48 H 6,52 N 4,85 P 3,57

Fundet: C 54,76 H 6,33 N 4,92 P 3,54%.

UV-spektrum i pH 7,38 puffer:

λ_{max}	$E_{1cm}^{1\%}$
235	341
336	268
470	154

IR- og NMR-data er i overensstemmelse med den antagne struktur.

4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved at hydrazinoalkylfosforsyrederivatet bruges i overskud ud over den støkiometrisk udkrævede mængde.
5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved at man fremstiller en forbindelse hvor R er hydrogen eller metyl, X er ætylen, metylætylen eller ætylætylen og A og B uafhængigt af hinanden betegner hydrogen eller natrium.