



Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 12 p, 3

Zgłoszono: 03.XI.1967 (P 123 387)

Pierwszeństwo: 03.XI.1966 Wielka
Brytania

MKP C 07 d, 99/02

Opublikowano: 20.VIII.1971

UKD

Współwłaściciele patentu: Lepetit S.p.A., Mediolan (Włochy)
CIBA Société Anonyme, Bazylea (Szwajcaria)

Sposób hydrolizowania pochodnych ryfamycyny

1

Wynalazek dotyczy hydrolizowania pochodnych ryfamycyny.

Przedmiotem wynalazku jest sposób hydrolizowania pochodnych ryfamycyny do odpowiednich 25-desacetyloryfamycyn o ogólnym wzorze 1, w którym pierścień oznaczony symbolem A przedstawia ewentualnie podstawiony pierścień 1,4-chinonu lub ewentualnie podstawiony pierścień 1,4-hydrochinonu, zwłaszcza pierścień o wzorze 2 stanowiący układ ryfamycyny B, lub o wzorze 3 stanowiący układ ryfamycyny O, albo o wzorze 4 stanowiący układ ryfamycyny o wzorze 5 stanowiący układ ryfamycyny SV.

Z opisu patentowego Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3150046 znany jest sposób wytwarzania antybiotyku ryfamycyny, przez fermentację szczepu Str. mediterranei ATCC 13585. Otrzymany antybiotyk przedstawia mieszaninę biologicznie aktywnych substancji spośród których jedna stanowi ryfamycynę B o sumarycznym wzorze $C_{39}H_{49}NO_{14}$. Charakterystyczną cechą tego związku jest wzrost jego aktywności występujący ze wzrostem rozpuszczalności w wodzie, tj. zdolność do przekształcania się w inną pochodną o wyższej aktywności antybakteryjnej, zwaną ryfamycyną S o wzorze sumarycznym $C_{37}H_{45}NO_{12}$.

Ryfamycynę S można przekształcić za pomocą łagodnej redukcji w nowy antybiotyk zwany ryfamycyną SV.

Budowę wymienionych ryfamycyn i sposób ich

2

wytwarzania przedstawia załączony schemat, uwzględniający tylko pierścień naftalenowy wchodzący w skład cząsteczki tych związków, gdyż pozostały układ pierścieni jest identyczny dla wszystkich tych ryfamycyn i nie ulega zmianom przy prowadzeniu wymienionych reakcji, przy czym układ wszystkich pierścieni ryfamycyn przedstawiony wzorem 6, w którym pierścień oznaczony symbolem A ma wyżej podane znaczenie, charakteryzuje się tym, że zawiera grupę CH_3COO- przy atomie węgla umiejscowionym w pozycji 25. Istotne jest, że przemiana ryfamycyny B w ryfamycynę S przebiega poprzez wytworzenie ryfamycyny O.

Budowa tych związków została wyjaśniona przez Preloga i współpracowników i opublikowana w Experientia 20,336 (1964).

Zasadniczą wadą tych antybiotyków jest ich stosunkowo słaba rozpuszczalność w wodzie i płynach fizjologicznych uniemożliwiająca uzyskanie wysokiego stężenia antybiotyku we krwi lub surowicy.

Celem wynalazku było wytworzenie pochodnych ryfamycyny łatwo rozpuszczalnych w wodzie i płynach fizjologicznych.

Cel ten osiągnięto przez hydrolizę grupy CH_3COO- związanej z atomem węgla umiejscowionym w pozycji 25 i uzyskanie nowej wolnej grupy hydroksylowej w cząsteczce ryfamycyny.

Sposób według wynalazku polega na tym, że

wybraną pochodną ryfamycyny o ogólnym wzorze 6, w którym pierścień oznaczony symbolem A ma wyżej podane znaczenie, rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku i poddaje alkalicznej hydrolizie czynnikami jak dwuwęglan sodu, cyjanki, wodorotlenki, zasady organiczne itp. do wytworzenia związku o wzorze 1, w którym pierścień oznaczony symbolem A ma wyżej podane znaczenie.

Budowę tych związków nowych, zwanych pochodnymi 25-desacetylorifamycyny potwierdzono badaniami analitycznymi. Widmo w podczerwieni wykazuje brak pasma przy wartości $V = 1710 - 1715 \text{ cm}^{-1}$, charakterystycznego dla grupy acetylowej, podobnie jak i widmo NMR, brak charakterystycznego pasma rodnika metylowego w grupie acetylowej przy $T = 7,03 - 8,02$. Analiza grup funkcyjnych również potwierdza brak grupy acetylowej.

Jak wynika z podanych niżej przykładów sposobem według wynalazku można przekształcać grupę ryfamycyn do odpowiednich 25-desacetylo pochodnych.

Jako pochodne ryfamycyny o wzorze 6 stosuje się 3-dwuetylo-aminoryfamycynę SV, 4-guanozylo-4-desoksyryfamycynę SV, ryfamycynę S, 3-pirolidynometyloryfamycynę SV, 3-formyloryfamycynę SV, 3-(4-metylopiperazylo) -iminoetylorifamycynę SV, 3-fenylloiminometyloryfamycynę SV, 3-metoksyiminometyloryfamycynę SV, ryfamycynę SV, 3-metyloaminoryfamycynę S, 3-metyloaminoryfamycynę SV, 3-morfolinoryfamycynę SV, 3-morfolinoryfamycynę S, 3-dwumetylohydrazono-metylorifamycynę SV oraz 3-piperidynoryfamycynę SV.

Stwierdzono np., że sposób wg wynalazku stosuje się z doskonałym rezultatem do ryfamycyny S i SV. Innymi ryfamycynami łatwo ulegającymi dezacetylacji są ryfamycyny podstawione w położeniu 3, jak 3-formyloryfamycyna SV i jej funkcyjne pochodne tj. w których grupa 3-formylowa jest związana ze związkami zawierającymi pierwszorzędową grupę aminową tworzącymi ugrupowania: $-\text{CH}=\text{N}-$, takie jak 3-(4-metylopiperazyloiminometylo)-ryfamycyna SV, 3-metoksyiminometyloryfamycyna SV, 3-fenylloiminometyloryfamycyna SV, metylo-, etylo-, propylo-, dwumetylo-, dwuetylo-, dwupropylohydrazony, ogólnie mono i dwualkilohydrazony 3-formyloryfamycyny SV, oksymy, hydrozany, arylohydrazony 3-formyloryfamycyny SV i wiele innych. Stwierdzono, że inną przydatną 3-podstawioną ryfamycyną są pochodne aminometylowe (tak zwane zasady Mannicha), na przykład 3-amino-, 3-alkiloamino, 3-dwualkiloaminometyloryfamycyny S i SV i analogi, w których zasadowym składnikiem podstawnika w położeniu 3 jest rodnik pirolidyny, piperidyny, morfoliny, piperazyny, również rodnik podstawiony w heterocyklicznym pierścieniu.

Innymi przydatnymi ryfamycynami są ryfamycyny zawierające w położeniu 3 grupy zasadowe z atomem azotu, jak 3-amino-, 3-pirolidyno-, 3-morfolino-, 3-piperidyno-, 3-piperazynoryfamycyna, lub odpowiednio amidy lub hydrazydy ryfamycyny B i ryfamycyny, jak i ryfamycyny zawierające dokondensowany pierścień w położe-

niach 3, 4, jak produkty kondensacji ryfamycyny O i S z o-fenilenodwuaminą, 2,3-dwuaminopirydyną, 4,5-dwuamino-2-tiourecylem, 2-amino-fenolem 4-chloro- i 4-nitro-2-aminofenolem, kwasem 3-hydroksyantranilowym, 1-amino-2-naftolem, 3,4-dwuaminotoluenem itd.

Reakcje te można przeprowadzić znanymi sposobami. Przykładowo dwie pierwsze operacje można przeprowadzić przy stosowaniu odpowiednio kwasu askorbinowego i żelazocyjanku potasu, podczas gdy dwutlenek platyny może być stosowany jako katalizator w ostatnim procesie.

Wyraźny wzrost rozpuszczalności wpływa bardzo dobrze na właściwości antybakteryjne i antybiotyczne tych związków i umożliwia ich stosowanie w postaci do zastrzyków.

W poniższej tabeli zebrano dane dotyczące tej istotnej właściwości fizycznej w odniesieniu do niektórych związków według wynalazku i odpowiednich ich 25-desacetylowych pochodnych. Rozpuszczalność jest podana w g ryfamycyny % ml buforowego roztworu ($\text{pH} = 7,5$ i temperatura $= 22^\circ\text{C}$), DA oznacza desacetylo.

Jak wynika z tabeli 25-desacetylo-ryfamycyny są o wiele bardziej rozpuszczalne, odpowiednio od 2 do 50 razy lepiej niż odpowiednie 25-acetylowe związki.

Tabela 1

Związek	Rozpuszczalność g. % ml/pH = 7,5 : 22°C
3-dwuacetyloaminometyloryfamycyna SV	0,042
25-DA-3-dwuetyloaminometylo-ryfamycyna SV	0,126
3-pirolidynometyloryfamycyna SV	0,006
25-DA-3-pirolidynometyloryfamycyna SV	0,280
3-formyloryfamycyna SV	0,640
25-DA-3-formyloryfamycyna SV	3,43
3-metoksyiminometyloryfamycyna SV	0,015
25-DA-3-metoksyiminometyloryfamycyna SV	0,034
3-(4-metylo-piperazyloiminometylo)-ryfamycyna SV	0,285
25-DA-3-(4-metylopiperazylo)-ryfamycyna SV	0,760

Inną zaletą ryfamycyny według wynalazku jest nadzwyczaj mała toksyczność w porównaniu z toksycznością odpowiednich pochodnych 25-acetylowych.

Wynika to z tabeli 2, w której podano wartości LD_{50} wyrażonej w mg/kg dla myszy.

Poniższe przykłady objaśniają sposób według wynalazku, lecz nie ograniczają jego zakresu.

Przykład I. Sposób wytwarzania 25-desacetylo-3-dwuetyloamino-metylorifamycyny SV. Do roztworu 7,8 g (0,01 mola) dwumetyloaminometyloryfamycyny SV w 160 ml etanolu dodano 50 ml (0,03 mola) 5% roztworu wodnego dwuwęglanu sodu. Otrzymaną mieszaninę ogrzewano pod chłod-

nią zwrotną w ciągu 8 godzin, po czym ochłodzo-
no i zatężono pod obniżonym ciśnieniem, dodano
70 ml wody i ekstrahowano mieszaninę 200 ml
octanu etylu po doprowadzeniu pH do wartości
4–4,5. Warstwę organiczną wysuszono i zatężono
pod obniżonym ciśnieniem. Pochodną desacetylo-
wą po krystalizacji oddzielono przez odsączenie,
a następnie oczyszczono żelą krzemionkowym
(275 g), przy zastosowaniu mieszaniny aceton-
chloroform (1:3) jako rozpuszczalnika aluującego.
Produkt otrzymany po zatężeniu elustu waży
5 g. Stanowi on 25-desacetylo-3-dwuetyloamino-
metylo-ryfamycynę SV. Wydajność 68%. Tempe-
ratura rozkładu 152–158°C.

Tabela 2

Związek	LD ₅₀ mg/kg
dwuetyloamid ryfamycyny B	340 dożylnie
dwuetyloamid 25-DA-ryfamy- cyny B	600 dożylnie
3-formyloryfamycyna SV	300 dootrzew- nowo
25-DA-3-formyloryfamycy- na SV	350 „
3-(4-metylopiperazylo- imi- nometylo)-ryfamycyna SV	460 „
25-DA-3-(4-metylopiperazy- nyloiminometylo)-ryfamy- cyna SV	850 „
3-metoksyiminometyloryfa- mycyna SV	nieabsorbo- wana
25-DA-3-metoksyiminometylo- ryfamycyna SV	560 dootrzew- nowo

Przykład II. Sposób wytwarzania 25-des-
acetylo-4-guanylo-4-desoksyryfamycyny SV. 4-
guanyloazo-4-desoksyryfamycynę SV (produkt
kondensacji ryfamycyny SV z aminoguanidyną w
ilości 5 g (0,0066 mola) rozpuszczoną w 90 ml
etanolu i 34 ml 5% wodnego roztworu dwuwęglanu
(0,02 mola). Otrzymany roztwór ogrzewano
pod chłodnicą zwrotną w ciągu 6 godzin, nastę-
pnie ochłodzono i dodano 250 ml wody, po czym
mieszaninę reakcyjną doprowadzono do wartości
pH=2 za pomocą 10% kwasu solnego i następnie
ekstrahowano 300 ml octanu etylu. Warstwę orga-
niczną odrzucono, ponieważ zawiera wszystkie za-
nieczyszczenia razem z bardzo małą ilością pro-
duktu końcowego.

Warstwę organiczną ekstrahowano ponownie
trzykrotnie octanem etylu stosując łącznie 900 ml
roztworu rozpuszczalnika organicznego. Warstwy organicz-
ne połączono, przemyto kilkakrotnie roztworem
fosforanowym zbuforowanym do wartości pH=7,5
do całkowitego usunięcia kwasu octowego zawar-
tego w roztworze. Następnie roztwór wysuszono
i zatężono pod próżnią do małej objętości. Wy-
krystalizowany produkt oddzielono przez odsącze-
nie, przemyto octanem etylu i wysuszono przy
temperaturze 40°C. Produkt jest analitycznie czy-
sty. Otrzymano 25-desacetylo-4-guanyloazo-4- des-
oksyryfamycynę-SV (wydajność 2,8 g 60%). Tem-
peratura rozkładu 228°C.

Przykład III. Sposób wytwarzania 25-des-
acetylo-ryfamycyny S. 4,4 g (0,063 mola) ryfamy-
cyny S rozpuszczono przy temperaturze 15–20°C
w 315 ml 0,5% etanolowego roztworu wodorotlen-
ku sodu w etanolu. Roztwór o mocnym zabarwie-
niu czerwono-fioletowym mieszano przy tempera-
turze pokojowej w ciągu 3 godzin, a następnie
wprowadzono do 1000 ml lodowatej wody i do-
dano 10% kwas solny do uzyskania kwaśnego od-
czynu. Wykrystalizowany surowy produkt ekstra-
howano octanem etylu. Warstwę organiczną prze-
mytą wodą i wysuszoną zatężono pod zmniejszo-
nym ciśnieniem do 100 ml, dodano 60 ml ligo-
liny, po czym roztwór zatężono do małej objętości.
Otrzymano bezpostaciowy żółty osad, który prze-
krystalizowano kilkakrotnie z etanolu. Czysty
produkt ma zabarwienie oranżowo-żółte. Otrzyma-
no 25-desacetylo-ryfamycynę S w ilości kg (54%).
Temperatura rozkładu 144–147°C.

Przykład IV–VIII. Otrzymano związki o
wzorze 1, odpowiadające wzorowi 7, w którym
znaczenie symbolu R podano poniżej:

Przy- kład	R	wzór suma- ryczny	Temperatu- ra rozkładu	Rf (+)
IV wzór 8		$C_{40}H_{54}N_2O_{11}$	178°C	0.19 (a)
V -CHO		$C_{38}H_{45}NO_{12}$	161–163°C	0.07 (b)
VI wzór 9		$C_{41}H_{56}N_4O_{11}$	165°C	0.15 (c)
VII -CH=N-C ₆ H ₅		$C_{42}H_{50}N_2O_{11}$	172°C	0.08 (b)
VIII -CH=NOCH ₃		$C_{37}H_{48}N_2O_{12}$	170–230°C	0.12 (b)

Wartość + Rf jest różnicą między wartością Rf
związku wyjściowego i wartością Rf odpowiedniej
pochodnej desacetylowej. $Rf_{ac} - Rf_{desac}$. Cienko-
warstwowa chromatografia na żelu krzemionko-
wym G (Merck), przy rozwinięciu 10 cm. Miesza-
niny rozpuszczalników

(a) aceton-chloroform	1:1
(b) aceton-chloroform	2:1
(c) etanol-chloroform	1:2

Przykład IX. Sposób wytwarzania 25-des-
acetylo-3-metyloaminoryfamycyny S. Zawieszinę 2 g
3-metyloryfamycyny S w 60 ml metanolu po-
traktowano 50 ml 10% roztworu wodorotlenku
sodu i mieszano w ciągu 10 minut przy tempera-
turze pokojowej. Następnie roztwór zakwaszono
kwasem cytrynowym, rozcieńczono wodą i ekstra-
howano kilka razy chloroformem. Wyciągi chlo-
roformowe połączono, wysuszono i odparowano.
Pozostałość wykrystalizowano z metanolu + eter.
Otrzymano 1,8 g 25-desacetylo-3-metyloryfamy-
cyny S w postaci słupków zabarwionych w kolorze
czerwonego wina, o temperaturze topnienia 288°C.

Przykład X. Sposób wytwarzania 25-des-
acetylo-3-morfolino-ryfamycyny SV. 5,0 g 3-mor-
folinoryfamycyny SV rozpuszczono w dużym nad-
miarze 2 roztworu wodorotlenku sodu i roztwór
pozostawiono w ciągu 45 minut przy temperatu-
rze pokojowej. Następnie roztwór zobojętniono,
zakwaszono kwasem cytrynowym i ekstrahowano
kilką razy chloroformem. Wyciągi chloroformowe
połączono, wysuszono i odparowano. Pozostałość
przekrystalizowano dwukrotnie z eteru uzyskując

4,2 g 25-desacetylo-3-morfolinoryfamycyny SV w postaci długich żółtych słupków o temperaturze topnienia 24°C (z rozkładem).

Przykład XI. Sposób wytwarzania 25-desacetylo-3-dwumetylohydrazonoryfamycyny SV. 5 g 3-dwumetylohydrazonometyloryfamycyny SV zawieszono w 100 ml metanolu, dodano 50 ml 10% roztworu wodorotlenku sodu, następnie 100 ml metanolu i całość pozostawiono w spokoju przy temperaturze pokojowej w ciągu 40 minut. Następnie całość zakwaszono kwasem cytrynowym, rozcieńczono wodą i ekstrahowano kilka razy chloroformem. Wyciągi chloroformowe połączono, wysuszono i odparowano. Pozostałość, którą stanowi 25-desacetylo-3-dwumetylohydrazono-metylo-ryfamycyna SV przekrystalizowano z metanolu. Wydajność: 4,0 g temperatura topnienia 179—181°C.

Przykład XII. Sposób wytwarzania 25-desacetylo-3-piperydynoryfamycyny SV. Metanolowy roztwór 2,0 g 3-piperydynoryfamycyny SV potraktowano 5 ml 20% roztworu wodorotlenku sodu i pozostawiono w spokoju w ciągu 45 minut. Następnie roztwór zakwaszono kwasem cytrynowym, rozcieńczono wodą i ekstrahowano chloroformem. Wyciąg chloroformowy wysuszono i odparowano. Pozostałość wykryształizowano z metanolu w postaci żółtych słupków. Otrzymano 1,5 g 25-desacetylo-3-piperydyno-ryfamycyny SV o temperaturze 242—245°C (rozkład).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób hydrolizowania pochodnych ryfamycyny do odpowiednich pochodnych 25-desacetylo-ryfamycyny o ogólnym wzorze 1, w którym pierścień oznaczony symbolem A przedstawia ewentualnie podstawiony pierścień 1,4-chinonu lub ewentualnie podstawiony pierścień 1,4-hydrochinonu, zwłaszcza pierścień o wzorze 2 stanowiący układ ryfamycyny B, lub o wzorze 3 stanowiący układ ryfamycyny O, albo o wzorze 4 stanowiący układ ryfamycyny S, względnie o wzorze 5 stanowiący układ ryfamycyny SV, **znamienny tym**, że pochodną ryfamycyny o ogólnym wzorze 6, w którym pierścień oznaczony symbolem A ma wyżej podane znaczenie rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku i poddaje alkalicznej hydrolizie do wytworzenia związku o wzorze 1, w którym

pierścień oznaczony symbolem A ma wyżej podane znaczenie.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pochodną ryfamycyny o wzorze 6 stosuje się 3-dwuetyloaminometyloryfamycynę SV.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pochodną ryfamycyny o ogólnym wzorze 6 stosuje się 4-guanozylo-4-desoksyryfamycynę SV.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pochodną ryfamycyny o wzorze 6 stosuje się ryfamycynę S.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pochodną ryfamycyny stosuje się 3-pirolidynometyloryfamycynę SV.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pochodną ryfamycyny o wzorze 6 stosuje się 3-formyloryfamycynę SV.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pochodną ryfamycyny o wzorze 6, stosuje się 3-(4-metylopiperazylo)-iminometyloryfamycynę SV.

8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pochodną ryfamycyny o wzorze 6 stosuje się 3-fenyliminometyloryfamycynę SV.

9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako ryfamycynę o wzorze 6 stosuje się 3-metoksyiminometyloryfamycynę SV.

10. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako ryfamycynę o wzorze 6 stosuje się ryfamycynę SV.

11. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako ryfamycynę o wzorze 6 stosuje się 3-metyloaminoryfamycynę S.

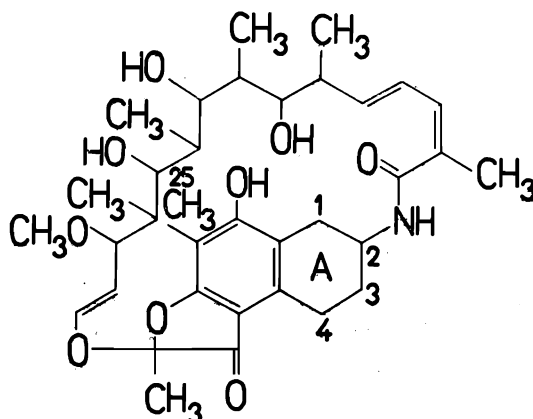
12. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako ryfamycynę o wzorze 6 stosuje się 3-metyloaminoryfamycynę SV.

13. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako ryfamycynę o wzorze 6 stosuje się 3-morfolinoryfamycynę SV.

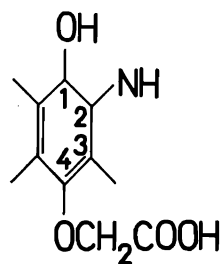
14. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako ryfamycynę o wzorze 6 stosuje się 3-morfolinoryfamycynę S.

15. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako ryfamycynę o wzorze 6 stosuje się 3-dwumetylohydrazonometyloryfamycynę SV.

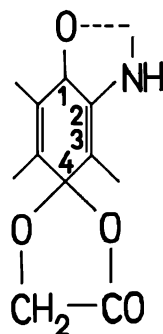
16. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako ryfamycynę o wzorze 6 stosuje się 3-piperydynoryfamycynę SV.



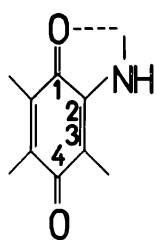
Wzór 1



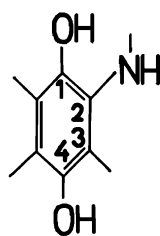
Wzór 2



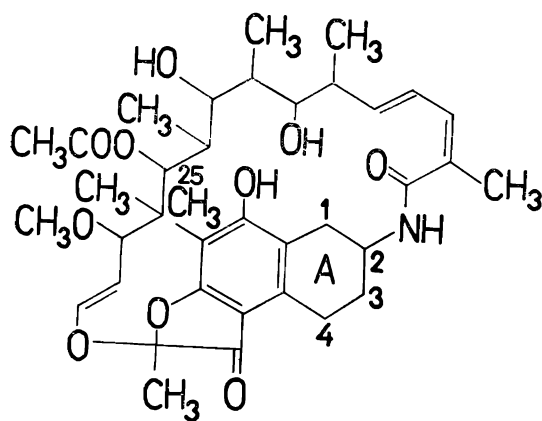
Wzór 3



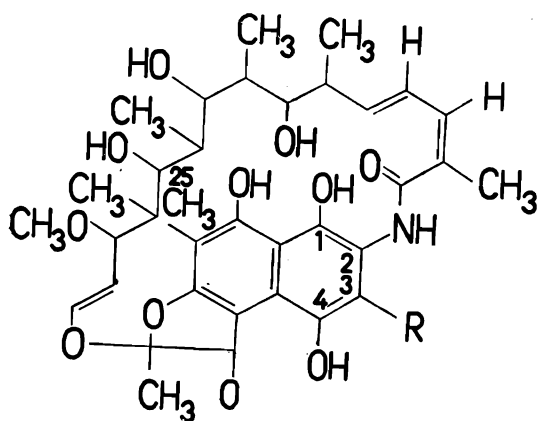
Wzór 4



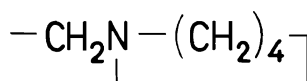
Wzór 5



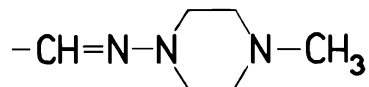
Wzór 6



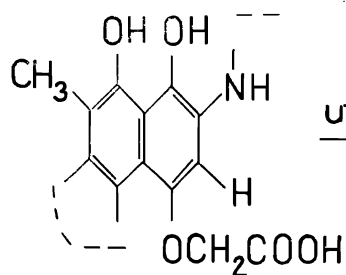
Wzór 7



Wzór 8

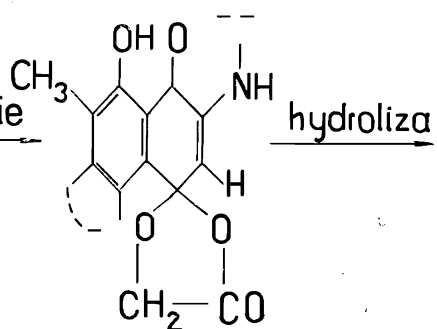


Wzór 9'



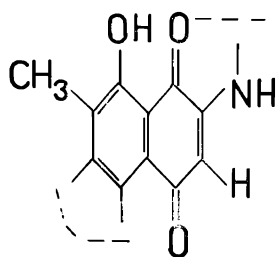
ryfamycyna B

utlenianie



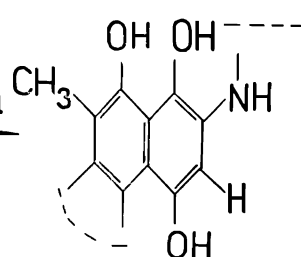
ryfamycyna O

hydroliza



ryfamycyna S

redukcja



ryfamycyna SV

Schemat