



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 133103

(51) Int. Cl.² C 07 D 498/08

(21) Patensøknad nr. 4813/71

(22) Inngitt 23.12.71

(23) Løpedag 23.12.71

(41) Alment tilgjengelig fra 19.07.72

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 01.12.75

(30) Prioritet begjært 18.01.71, Italia, nr. 19460 A/71

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte til fremstilling av terapeutisk virksomme derivater av rifamycin SV.

(71)(73) Søker/Patenthaver GRUPPO LEPETIT S.p.A.,
Via Roberto Lepetit 8,
Milano, Italia.

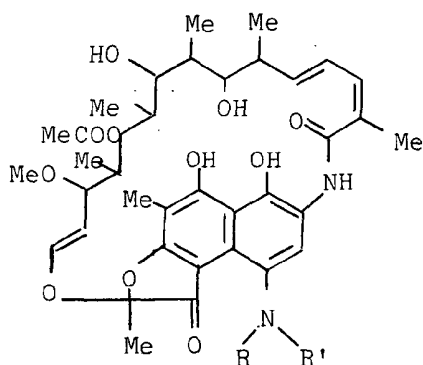
(72) Oppfinner CRICCHIO, Renato,
Varese, Italia.

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Dansk patent nr. 102573

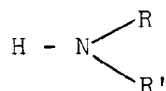
133103

Foreliggende oppfinnelse vedrører en analogifremgangsmåte til fremstilling av nye, antimikrobielt virksomme derivater av rifamycin SV med den generelle formel:



hvor R og R' uavhengig av hverandre betegner alkylgrupper med 1-8 karbonatomer, alkenylgrupper med 3-6 karbonatomer, arylgrupper eller aralkylgrupper med 1-5 karbonatomer i den alifatiske del, eller tilsammen og sammen med det mellomliggende nitrogenatom utgjør en monocyklisk, mettet 5-8-leddet heterocyklisk ring, hvilken ring eventuelt inneholder et oksygenatom eller en gruppe N-R'', hvor R'' er et hydrogenatom eller en alkyl- eller karbalkoksygruppe med 2-6 karbonatomer.

Ifølge oppfinnelsen omsettes rifamycin O med et amin med den generelle formel:

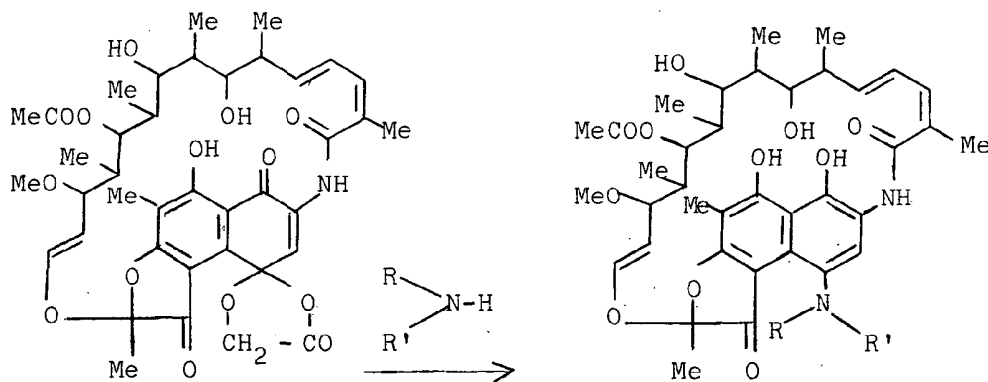


hvor R og R' har den ovenfor angitte betydning, i et organisk oppløsningsmiddel ved en temperatur mellom 15°C og 35°C.

133103

2

Denne reaksjon kan illustreres som følger:



Reaksjonen utføres ved at man behandler en molekvivalent rifamycin O med ca. 2 molekvivalenter av det valgte amin i et organisk oppløsningsmiddel ved en temperatur mellom 15 og 35°C. Etter en tidsperiode som varierer mellom 12 og 120 timer, alt etter reaksjonshastigheten, viser tynnsjikt-kromatografi på silisiumdioksydgel med anvendelse av en blanding av CHCl_3 og metanol 9 : 1 som elueringsmiddel, at rifamycin O er forsvunnet og at man har fått dannelse av et nytt produkt med en Rf-verdi lavere enn den for rifamycin O, sammen med en moderat mengde rifamycin B og spormengder av biprodukter.

Utvinning av sluttprodukter utføres ved avdampning av det organiske lag og krystallisering av råproduktet fra passende organisk oppløsningsmiddel, f.eks. etylacetat, eller utfelling av sluttproduktet fra etylacetat ved tilsetning av et annet inert oppløsningsmiddel.

De ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen fremstilte rifamyciner er gule stoffer, moderat oppløselige både i sure medier som f.eks. 0,1N HCl og i basiske medier som f.eks. mettede oppløsninger av NaHCO_3 . Forbindelsene er på den annen side meget oppløselige i forskjellige organiske oppløsningsmidler som aceton, etylacetat, metanol, bensen og klorerte hydrokarboner. Deres struktur er fastslått ved fysikalske data, d.v.s. protonmagnetisk resonans, masse, infrarødt, ultrafiolett og synlige spektra. Disse forbindelsers protonmagnetiske spektrum viser forsvinning av signalene for CH_2 -gruppen i den spirolaktone ring hos rifamycin O ved 4,7 enheter, og fremkomsten av nye signaler slik som f.eks. de som stammer fra dialkyl-amino-

133103

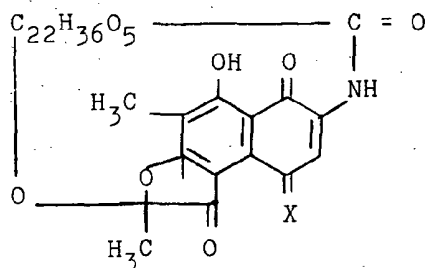
gruppen når denne gruppe er tilstede.

Massespekteret for N,N-dimetylderivatet utviser det molekylære ion ved m/e 724 i overensstemmelse med den beregnede molekylvekt. Det infrarøde spektrum viser forsvinning av absorpsjonsbåndet ved 1822 cm^{-1} , som er karakteristisk for spiro-laktonringen i rifamycin O.

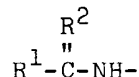
Den polarografiske analyse viser ikke reduksjonsbølgen ($E_{1/2} = +0,03$ volt) fra systemet 1,4-quinon $\rightleftharpoons$ hydroquinon, karakteristisk for rifamycin av typen SV.

Forbindelser fremstilt ifølge oppfinnelsen utviser høy grad av kjemoterapeutisk aktivitet. Særlig bemerkelsesverdig er deres aktivitet mot *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus haemolyticus*, *Diplococcus pneumoniae* og *Mycobacterium tuberculosis*. For eksempel har det ved representative forsøk vist seg at de in vitro inhiberer veksten av de nevnte mikroorganismer i konsentrasjoner fra omkring 0,005 til omkring 0,2 γ/ml .

Fra dansk patentskrift nr. 102.573 er det kjent beslektede forbindelser, nemlig kondensasjonsprodukter av rifamycin O og forbindelser som inneholder en primær aminogruppe såvel som salter derav; disse forbindelser har den generelle formel:



hvor X betegner $=N-R^O$, hvor R^O er en aryl-, guanidin- eller substituert guanidin-gruppe med formelen:



hvor R^1 betegner alkyl, aminoalkyl, pyridinalkyl, aryl, pyridyl eller 2-tiazolyl og R^2 oksygen eller $=NH$. Disse forbindelser har stort sett samme virkning in vitro som de ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilte forbindelser. Derimot har forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen høyere aktivitet in vivo enn de

133103

4

nevnte kjente forbindelser. Dette fremgår av sammenligningsforsøk over virkningen mot Stafylokok-infeksjon hos mus. Noen av de ifølge oppfinnelsen fremstilte forbindelser ble sammenlignet (verdier for ED₅₀) med to fra nevnte patentskrift kjente forbindelser, hvis virkning in vitro er høyest, nemlig forbindelsene fremstilt ifølge patentskriftets eksempler 12 og 13. Disse er kondensasjonsproduktet av rifamycin O og henholdsvis isonikotinsyreamidhydrason og aminoguanidin, i det følgende betegnet henholdsvis forbindelse A og forbindelse B. Verdiene for ED₅₀ in vivo etter peroral administrasjon, uttrykt i mg/kg, etter eksperimentelt fremkalt infeksjon hos mus med Staphylococcus aureus fremgår fra nedenstående tabell I, som viser at de ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilte forbindelser har betydelig høyere virkning in vivo enn de kjente.

Tabell I

<u>Forbindelser ifølge nedenstående eksempler</u>	<u>ED₅₀ mg/kg oralt</u>
1	12
2	15
3	15
11	19
13	16
14	20
15	20
Forbindelse A	>30
Forbindelse B	>30

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen skal i det følgende belyses nærmere ved noen utførelseseksempler.

Eksempel 1

4-dimetylamino-4-desoksy-rifamycin SV

Til en oppløsning av 3 g rifamycin O i 100 ml tetrahydrofuran tilsettes 3,5 ml av en etanolisk oppløsning av dimetylamin ved romtemperatur. Oppløsningen holdes ved samme temperatur natten over og undersøkes deretter ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi for å bekrefte en fullstendig reaksjon. Etter konsentrering til tørrhet oppløses resten i 100 ml etylacetat og vaskes to ganger med 20 ml fosfatbuffer med pH 7,38. Det organiske lag tørkes og konsentreres under redusert trykk til et

lite volum. Produktet utkrystalliseres og etter avkjøling blir det oppsamlet, vasket med etylacetat og tørket, hvilket gir 600 mg 4-dimetylamino-4-desoksy-rifamycin SV. Smeltepunkt 167 - 178°C. Spektrofotometriske data registrert i fosfatbuffer, pH 7,38: λ_{maks} (m μ) 302, ϵ 18.800; λ_{maks} (m μ) 418, ϵ 22.000.

Eksempel 2

4-(N-metyl-N-benzyl)-amino-4-desoksy-rifamycin SV

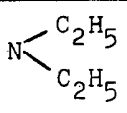
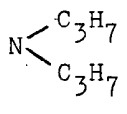
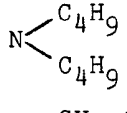
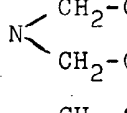
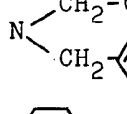
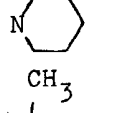
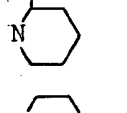
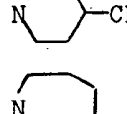
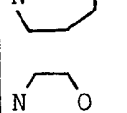
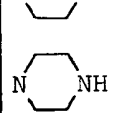
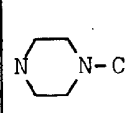
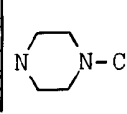
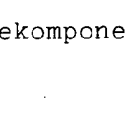
Til en oppløsning av 4 g rifamycin O i 150 ml tetrahydrofuran tilsettes 1.250 g N-metyl-benzylamin ved romtemperatur. Etter 40 timer er reaksjonen fullstendig og oppløsningen konsentreres til tørrhet. Resten oppløses i 10 ml kloroform og anbringes på en kolonne med 200 g silisiumdioksydgel som på forhånd er vasket med kloroform, hvorefter blandingen elueres med kloroform-metanol. Det første eluat kasseres og de videre eluatene oppsamles, konsentreres til tørrhet, oppløses i 20 ml etylacetat og helles under risting i et begerglass inneholdende 150 ml heksan. Det utfelte produkt oppsamles og tørkes, hvilket gir 1 g av den ønskede forbindelse. Smeltepunkt 139 - 155°C under dekomponering. Spektrofotometriske data registrert i fosfatbuffer, pH 7,38: λ_{maks} (m μ) 305, ϵ 16.600, λ_{maks} (m μ) 420, ϵ 18.400.

Eksempel 3 - 15

Samtlige forbindelser i nedenstående tabell II er fremstilt ved hjelp av samme fremgangsmåte som for N-metyl-N-benzylderivatet i eksempel 1.

133103

Tabell II

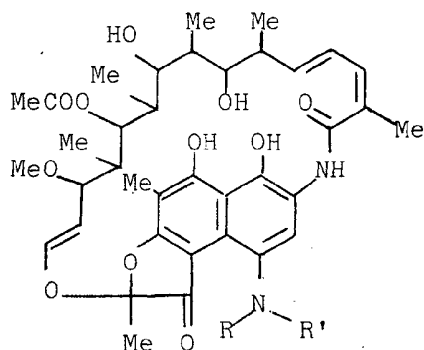
Eksempel nr.	R	Utbytte %	Smeltepunkt °C	Spektrofotometriske data (d)			
				λ_{maks} (m μ)	ϵ	λ_{maks} (m μ)	ϵ
3		20	176-78	305	14840	424	10950
4		13,5	150 (b)	303	16800	420	19800
5		20	133-36	302	17100	420	19800
6		8,4	145-50	303	16800	418	20000
7		25	155-80 (b)	300	17700	416	19800
8		15	165-75	302	18600	415	20500
9		13,5	173-80	303	18300	420	19400
10		13,5	178-200 (b)	304	23600	424	19500
11		13,5	165-74	302	20200	416	19700
12		20	170-76	303	17200	420	19400
13		13,5	185-90	303	17000	416	15400
14		10	162-64	303	17500	420	18600
15		30	167-71	302	17800	420	19000

(b) dekomponering, (d) registrert i fosfatbuffer med pH 7,38

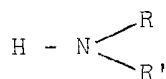
133103

P a t e n t k r a v

Analogifremgangsmåte til fremstilling av terapeutisk virksomme derivater av rifamycin SV med den generelle formel:



hvor R og R' uavhengig av hverandre betegner alkylgrupper med 1-8 karbonatomer, alkenylgrupper med 3-6 karbonatomer, arylgrupper eller aralkylgrupper med 1-5 karbonatomer i den alifatiske del, eller tilsammen og sammen med det mellomliggende nitrogenatom utgjør en monocyklisk, mettet 5-8-leddet heterocyklisk ring, hvilken ring eventuelt inneholder et oksygenatom eller en gruppe N-R'', hvor R'' er et hydrogenatom eller en alkyl- eller karbalkoksygruppe med 2-6 karbonatomer, k a r a k t e r i s e r t v e d at man omsetter rifamycin O med et amin med den generelle formel:



hvor R og R' har den ovenfor angitte betydning, i et organisk oppløsningsmiddel ved en temperatur mellom 15°C og 35°C.