



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 19.01.73 (P. 160331)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 15.09.73

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1977

MKP C07d 99/02
C07d 87/54

Int. Cl.²
C07D 413/14

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Gruppo Lepetit S. p. A., Mediolan (Włochy)

Sposób wytwarzania podstawionych w pozycji 3 ryfamycyn

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania podstawionych w pozycji 3 ryfamycyn o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza atom wodoru, rodnik alkilofenyłowy lub fenyloalkilowy, a R¹ i R² stanowią łącznie łańcuch karbocykliczny, który łącznie z podwójnym wiązaniem przylegającego pierścienia imidazolowego tworzy pierścień benzeny, niepodstawiony lub podstawiony jedno- lub wielokrotnie atomem chlorowca, rodnikiem alkilowym, grupą alkoksylową, karboksylową, karboalkoksylową, sulfonową, sulfamylową, nitrową, trójfluorometylową, karbamylową, jedno- lub dwualkilokarbamylową lub podstawiony lub niepodstawiony aromatyczny rodnik składający się z 2—3 skondensowanych pierścieni, w skład których wchodzi po 5—6 atomów węgla oraz odpowiednich pochodnych 25-desacetylo i 16, 17, 18, 19, 28, 29 — sześciowodoro.

Rodniki alkilowe i alkoksylowe posiadają proste lub rozgałęziony łańcuch zbudowany zwykle z 1—6 atomów węgla, a składający się z 2—3 skondensowanych pierścieni aromatyczny rodnik skondensowany z pierścieniem imidazolowym w pozycji 3 związków o wzorze 1 to rodnik naftalenu, antracenu, fluorenu, acenaftenu lub fenantrenu. Rodniki te mogą być podstawione grupami keto, wodorotlenowymi lub sulfonowymi.

Związki o wzorze 1 otrzymuje się działając na 3-formyloryfamycynę lub jej pochodną 25-dezacetylo lub sześciowodoro aromatyczną aminą o

2

ogólnym wzorze 2, w którym R, R¹ i R² mają wyżej podane znaczenie. Otrzymaną zasadę Schiffa lub jej izomeryczną postać imidazolinową utlenia się do pochodnej imidazolowej, według schematu 1. Schemat 1 ilustruje przypadek, gdy substratem reakcji jest 3-formyloryfamycyna SV. Jeżeli w trakcie utleniania fragment ryfamycynowy ulega przemianie w chinon, przemianamiem roztworem kwasu askorbinowego lub równoważnego odczynnika redukuje się go do odpowiedniego hydrochinonu. Jako środki utleniające stosuje się powietrze, sole miedziowe, sole rtęciowe, dwutlenek manganu, azotyn izoamylowy, żelazicyjanek potasu lub czteroocian ołowiu.

W pewnych przypadkach w obecności powietrza lub innego akceptora wodoru następuje utlenienie powstającej zasady Schiffa lub izomerycznej imidazoliny do imidazolu. W takich przypadkach wyodrębnianie produktu przejściowego nie jest konieczne.

W korzystnym wariantcie sposobu według wynalazku stechiometryczną ilość wybranej ortodwuaminy o ogólnym wzorze 2 dodaje się do utrzymywanego w temperaturze pokojowej roztworu 3-formyloryfamycyny SV lub jej pochodnej 25-dezacetylo lub sześciowodoro. Mieszaninę utrzymuje się w temperaturze od pokojowej do temperatury wrzenia rozpuszczalnika, aż do zakończenia reakcji, to jest w ciągu 20 minut do 3 go-

dzin. Pożądaný produkt wyodrębnia się przez odparowanie rozpuszczalnika.

Korzystnym rozpuszczalnikiem jest czterowodorofuran, można jednak stosować również inne rozpuszczalniki, takie jak dioksan lub niższe alkohole. Surowy produkt można oczyścić w drodze krystalizacji lub chromatografii. Jeżeli produkt reakcji nie jest imidazolem, to można go utleniać bez oczyszczania.

Utlennianie korzystnie przeprowadza się w mieszaninie kwasu octowego z chlorowanym niższym węglowodorem, za pomocą czteroocianu ołowiu, w temperaturze -5 do 10°C . Końcowy produkt wyodrębnia się po upływie 1–3 godzin z warstwy organicznej, odparowując ją po uprzednim przemyciu 10% roztworem wodnym kwasu askorbino-

wego, dla przeprowadzenia chinonowej postaci ryfamycyny w postać hydrochinową. Jeżeli kondensację aromatycznej dwuaminy z 3-formyloryfacyną lub przerób produktów reakcji przeprowadza się przy dostępie powietrza, w temperaturze pokojowej, nie jest konieczne poddanie produktu utleniającej cyklizacji i przemycania kwasem askorbinowym, ponieważ w takim przypadku uzyskuje się bezpośrednio w powyższej reakcji imidazol o ogólnym wzorze 1.

Związki otrzymane sposobem według wynalazku mają postać barwnych ciał stałych, krystalizujących z metanolu, acetonu, octanu etylu, czterowodorofuranu, dioksanu lub z mieszanin powyższych rozpuszczalników.

Zależnie od rodzaju podstawników R^1 i R^2 , powyższe związki rozpuszczające się lepiej lub gorzej w większości rozpuszczalników organicznych. Na przykład R^1 i R^2 stanowią pierścień benzenowy, związki otrzymywane sposobem według wynalazku bardzo dobrze rozpuszczają się w octanie etylu, gdy natomiast R^1 i R^2 stanowią większy układ aromatyczny, konieczne jest stosowanie silniejszych rozpuszczalników, takich jak chloroform lub dwumetyloformamid.

Związki otrzymywane sposobem według wynalazku wykazują silną czynność w stosunku do Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii, a szczególnie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus hemolyticus*, *Diplococcus pneumoniae* i *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Najniższe stężenie hamujące wynosi $0,001-0,05 \mu\text{g/ml}$. Czynność przejawiana jest również w obecności płynów biologicznych, takich jak surowica krowia. Związki otrzymywane sposobem według wynalazku wykazują również czynność w stosunku do opornych na ryfampicynę szczepów *Staphylococcus aureus*. W reprezentatywnych badaniach *in vitro* związki opisane w przykładach IV, V, VI i VIII w stężeniu $1-5 \mu\text{g/ml}$ hamowały wzrost *Staphylococcus aureus* Tour. Omawiane związki wykazują bardzo niską toksyczność.

Inną bardzo cenną właściwością związków wytwarzanych sposobem według wynalazku jest hamujące działanie przejawiane w stosunku do polimeraz DNS, charakterystycznych dla limfoblastów z krwi ludzi chorych na białaczkę i w stosunku do transferaz nukleotylowych (polimeraz) wirusów, które nie biorą udziału w metabolizmie komórek

normalnych. Z badań nad reprezentatywnymi przedstawicielami grup wirusów wiadomo, że w znacznej części cyklu reprodukcji w komórkach żywiciela są one nosicielami lub wytwarzają polimerazy.

Tak więc na przykład wirusy Picorna, czy Polio wytwarzają zależną od RNS polimerazę RNS, podczas gdy wirusy innych grup, na przykład wirusy białaczki są nosicielami zależnej od RNS polimerazy DNS. Obecność i niezwykle ważna rola jaką spełnia zależna od RNS polimeraza DNS (przeciwtranskryptaza) w przypadku rakotwórczych wirusów RNS zostały odkryte przez B. Baltimore'a, *Nature* 226, 1209 (1970) i przez H.M. Temina i współpracowników, *Nature* 226, 1211 (1970). Występowanie zależnej od RNS polimerazy DNS w zwierzęcych rakotwórczych wirusach RNS zostało stwierdzone również przez innych badaczy.

Zagadnienia te są omówione w następujących publikacjach: Green i współpracownicy, „Mechanism of carcinogenesis by RNS tumor viruses. I. An RNA-dependent DNA-polymerase in murine sarcoma viruses”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 67, 385–393, 1970, Spiegelman i współpracownicy, „Characterization of the products of RNA directed DNA-polymerase in oncogenic RNA viruses”, *Nature*, London, 227 536, 1970, Hanaka i współpracownicy, „DNA polymerase activity associated with RNA tumor viruses”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 143, 1970, Scolnick i współpracownicy, „DNA synthesis by RNA containing tumor viruses”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 1034, 1970.

Obecność wirusów RNS w pewnych nowotworach potwierdzają również dalsze fakty: w mleku kobiet, w rodzinach, w których występowały przypadki raka piersi i w małżeństwach osób spokrewnionych znaleziono przeciwtranskryptazę (Scholn i wspóln., *Nature* 231, 97, 1971), a Priori i współpracownicy, (*Nature New Biology*, 232, 16, 1971) z komórek płynu opłucnej dziecka z zapaleniem węzłów chłonnych wyodrębnili wirusa ESP-1, który zawiera przeciwtranskryptazę i który daje się rozmnażać w hodowli tkankowej.

Axel i współpracownicy, *Nature* 235, 32, 1972, w drodze hybrydyzacji molekularnej wykazali występowanie w przypadkach raka piersi kobiet wirusa RNS homologicznego z wirusem RNS nowotworu sutki myszy. Możliwość wirusowego pochodzenia raka piersi wykazują przeprowadzone techniką mikroskopii elektronowej badania mleka kobiecego (N.H. Sarkar i współpracownicy, *Nature*, 236, 104, 1972). Również z komórek ludzkiego mięsaka mięśni prądkowanych wyodrębniono czynną w stosunku do RNS polimerazę DNS i wirusopodobne cząstki. (Mc Allister i współpracownicy, *Nature New Biology*, 235, 3, 1972).

Dotychczas nie ma leków skutecznie zwalczających schorzenia wirusowe, ponieważ warunki przemiany materii wirusów i komórek są takie same. Najbardziej obiecującą drogą chemioterapii chorób wirusowych jest opracowanie odpowiednich związków wybiórczo łączących się z polimerazami wirusowymi, lub i polimerazami komórkowymi transformowanymi przez wirusy, a nie łączącymi się z polimerazami normalnych komórek żywiciela, co

dałoby możliwość kontroli informacji genetycznej wirusów. Wybiórcze inhibitory enzymów wirusa lub enzymów komórkowych transformowanych przez wirusa, a w szczególności inhibitory polimeraz rakotwórczych wirusów RNS odgrywają znaczną rolę w lekach do terapii białaczki i innych schorzeń nowotworowych.

Zbadano hamującą czynność związków wytwarzanych sposobem według wynalazku w stosunku do oczyszczonej, zależnej od RNS polimerazy DNS endogennego wirusa Muridae i w stosunku do oczyszczonej, zależnej od DNS polimerazy wirusa Poly d-(A-T) (jako „Template”). W badaniach posłużono się sposobami opisanymi przez C. Gargo i współpracowników (Nature, New Biology, 229, 111, 1971). Działanie leków w różnych stężeniach na czynność polimerazową określano następnie w stosunku do ^3H -dTTP (trytowany trójfosforan tyminodezoksyrybozy) połączonego z frakcją nierozpuszczalną.

Poniżej przedstawiono typowy przykład postępowania doświadczalnego.

Wyodrębnianie wirusa i oczyszczanie polimerazy wirusowej.

Sposobem opisanym przez Greena i współpracowników, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 385–393, 1970 i przez Rokutandę i współpracowników, Nature, 227, 1026–1028, 1970, wyodrębnia się wirusa Muridae z nowotworowych komórek szczura (szczep Moloney'a) oraz z nowotworowych komórek myszy (szczep Harvey'a), a następnie oczyszcza. Polimerazę wirusową otrzymuje się w wyniku inkubacji oczyszczonego wirusa 0,5% NP-40 (nonidet P-40) w 0,1 M NaCl, 0,01 M buforze Tris (pH 7,6) i 0,001 M EDTA, w ciągu 5 minut, w temperaturze pokojowej i 20–40-krotnie oczyszcza przez wirowanie strefowe w ciągu 24 godzin w roztworze sacharozy o stężeniu wzrastającym od 15 do 30%, 10 mM buforze Na-fosforanowym (pH 7,4), 2,5 mM MgCl_2 , 10 mM ditiotreicie i 5% glicerynie, z szybkością 38 000 obrotów na minutę, w ultrawirówce Spinco SW 41. Zebrano 22 frakcje, a wykazujące najwyższą czynność enzymatyczną frakcje 13–17 połączono i przechowywano w temperaturze -70° w 30% glicerynie.

Oznaczanie polimerazy DNS.

Inkubację enzymu prowadzi się w ciągu godziny w 37°C , w 100 μl mieszaniny składającej się z 40 mM buforu Tris (pH 8,0), 5 mM ditiotreicie, 30 mM NaCl, 2,5 mM MgCl_2 , 0,1 mM dATP, dGTP, dCTP i 10 μCi ^3H -dTTP (12–18 Ci/mmol), sposobem opisanym przez Greena i Mitaro, Proc. Nat. Sci. USA, 67, 385–393, 1970. Reakcję przerywa się dodając 150 μl 1 M kwasu nadchlorowego. W charakterze nośnika dodaje się DNS grasicy cielęcia (100 μg). Radioaktywny produkt DNS przerabia się w sposób opisany w obu powyżej cytowanych pozycjach literaturowych. Endogenną czynność zależną od RNS polimerazy DNS określa się po dodaniu 0,01% NP-40 do oczyszczonego wirusa w momencie przeprowadzania doświadczenia. Czynność polimerazową oczyszczonej polimerazy wirusowej oznacza się 2 μg Poly d (A-T) (jako Template) i bez NP-40.

Oznaczanie hamującego działania pochodnych ryfamycyny.

Sporządza się roztwór pochodnej ryfamycyny w dwumetylosulfotlenku (DMSO), o stężeniu 5 mg/mol i przechowuje go w temperaturze 4°C . Hamujący wpływ na czynność endogennej zależnej od RNS polimerazy DNS określa się w ten sposób, że 2 μl roztworu antybiotyku w DMSO lub 2 μl DMSO (kontrola) dodaje się do badanej próby, zawierającej 15–30 μg białka wirusowego, a następnie do próby wprowadza się osłabionego wirusa. Inkubację enzymu prowadzi się w ciągu 70 minut w 37°C . Następnie dodaje się 70 μl mieszaniny substratów i mieszaninę inkubuje i przerabia w wyżej opisany sposób.

W reprezentatywnych badaniach związki wytwarzane sposobem według wynalazku w stężeniu 2–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ograniczały przyłączanie ^3H -dTTP do poniżej 10% wartości oznaczonej w badaniach kontrolnych. W ten oczywisty sposób wykazano, że wpływają one hamująco na mechanizm nowotwórczy nowotworowych wirusów RNS, zgodnie z najnowszymi poglądami biochemicznymi.

Hamujące działanie w stosunku do przeciwtanskryptaz określa się również w badaniach na wirusach Muridae. Zależną od RNS polimerazę DNS wirusa Muridae otrzymuje się w sposób opisany przez Callo i współpracowników, Nature New Biology, 232, 141, 1971 z wirusa osłabionego Tritonem X 100. Wirusy szczepów Rauschera i Moloney'a oczyszcza się wiążąc je w zakresie 1,16 g/mol gradientu gęstości sacharozy, po wstępnym wirowaniu przy ograniczonej szybkości, w roztworze sacharozy o stężeniu malejącym od 60 do 20%, dla oddzielenia fragmentów komórek. Końcowe stężenie preparatu wirusowego wynosi 10^{11} cząstek w ml. Jako „Template” stosuje się 70 SR.N.S. Stwierdzono, że stężenie 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i niższe skutecznie hamuje czynności enzymatyczne. Podobne wyniki otrzymuje się stosując polimerazy z komórek nowotworowych pochodzenia ludzkiego. W tym przypadku dla scharakteryzowania selektywnego wpływu bada się działanie hamujące również w stosunku do polimeraz komórek normalnych. Badano czynność reprezentatywnych pochodnych ryfamycyny w wzorze ogólnym 1 w stosunku do 2 oczyszczonych polimeraz DNS, wyodrębnionych z normalnych ludzkich limfocytów krwi (stymulowanych PHA), z komórek limfoblastów krwi zdrowego dawcy i z limfoblastów krwi białaczkowej. Stosowano syntetyczne i/lub naturalne „Template”.

Poniżej opisano typowy przykład przeprowadzenia oznaczenia.

Limfoblasty krwi ludzkiej.

Białaczkowe limfoblasty wyodrębnia się z obwodowej krwi pacjentów z ostrą białaczką. Komórki przemywa się, a erytrocyty usuwa przez podciśnieniowe rozpuszczenie. Normalne limfocyty otrzymuje się z obwodowej krwi zdrowych dawców po oddzieleniu granulocytów w drodze chromatografii kolumnowej na tworzywie poliamidowym. Poddaje się je obróbce opisanej przez Gallo i współpracowników, Nature 228, 927, 1970 i Science 165, 400, 1968, działając w ciągu 72 godzin fitchem-glutyniną (PHA), w celu możliwie największego

wzmocnienia ich czynności DNS-polimerazowej. W niektórych orientacyjnych badaniach wstępnych stosowano słabiej oczyszczoną polimerazę DNS, otrzymaną z hodowli „normalnych” tkanek ludzkich (1788). Interesujące związki zbadano następnie na lepiej oczyszczonych enzymach z normalnych i białaczkowych limfocytów. Kultury tkanek otrzymano z Associated Biomedic Systems, Inc.

Preparaty polimerazy DNS.

Polimerazy DNS otrzymuje się z normalnych (stymulowanych PHA) i białaczkowych limfocytów oraz z komórek limfoidalnych 1788, w drodze homogenizowania w hipotonicznych roztworach buforowych i następnego traktowania Tritonem X 100 i/lub ekstrakcji roztworami soli zewnętrznych lizosomalnych błon komórkowych. Po różnicującym wirowaniu w roztworach soli ekstrakty komórkowe oczyszcza się dalej w drodze chromatografii kolumnowej na celulozie DEAE, fosfocełulozie i dekskanie Sephadex G 200.

Badanie polimerazy DNS.

Badanie polimerazy DNS przeprowadza się w końcowej objętości 100 μ l. Badana mieszanina zawiera 50 mM buforu Tris-HCl o pH 8,3, 6,0 mM octanu magnezu, 8,0 mM ditriotreitu i 60 mM NaCl. Wartość pH nastawia się po dodaniu rozpuszczonych w DMSO inhibitorów. Końcowe stężenie DMSO wynosi 0,5% i taką ilość zawierają wszystkie próby kontrolne. W badaniach stosuje się enzymy w stężeniu katalizującym przyłączanie około 1 pM w ciągu godziny. W większości przypadków enzym inkubuje się wstępnie inhibitorem w ciągu 5 minut. Następnie przeprowadza się podstawienie dodatkiem syntetycznego DNS (Poly d/AT/ Miles Lab.) i hybrydy DNS.RNS (Oligo dT, poly rA) w ilości 5 μ g/ml lub naturalnego, aktywowanego DNS nasienia łososia, w ilości 50 μ g/ml i RNS endogennego wirusa 70S, 10 μ Ci (3 H-metylo)-TTP (New England Nuclear, 18,6 mCi/ μ M, liofilizowany i ponownie rozpuszczony w 0,01 M HCl bezpośrednio przed użyciem) i ATP (8×10^{-5} M, z substancją syntetyczną) lub dodatkiem wszystkich trzech trójfosforanów dezoksynukleozydów (8×10^{-5} M z RNS lub DNS).

W pewnych przypadkach nie przeprowadza się wstępnej inkubacji enzymu inhibitorem, lecz przeprowadza się reakcję wprowadzając do gotowej mieszaniny enzym łącznie z inhibitorem. Na początku inkubacji i po 30 minutach pobiera się próby, przerywa w nich reakcję dodatkiem 2 ml 0,08 M pirofosforanu sodu i przeprowadza wytrącenie dodatkiem 12,5% zimnego kwasu tróchlorooctowego (TCS) z 400 μ g RNS drożdży jako nośnikiem. Produkty odsąca się na mikroporowatym filtrze, dokładnie przemywa 5% kwasem tróchlorooctowym i 1 ml mieszaniny DMSO-etanol-0,1 M NaCl (0,5:70:29:5), suszy, rozpuszcza w 2 ml BBS₃ (Beckman) i 10 ml liquifluoru (New England Nuclear) i liczy za pomocą cieczowego licznika scyntylacyjnego produkcji Packard.

Stwierdzono, że stężenie 5–20 μ g/ml powoduje przy syntetycznym „DNS-Template” 50% zahamowanie aktywności polimerazy białaczkowej. Przy syntetycznym „RNS-Template” (Poly rA: rU) reakcja była jeszcze czulsza.

Reprezentatywne badania, przeprowadzone z naturalnym „Template” na polimerazach komórek normalnych i nowotworowych wykazały, że enzymy nowotworowe są czulsze na działanie testowanych związków.

Spośród innych właściwości biologicznych nowych pochodnych ryfamycyn należy wymienić hamowanie powstawania ognisk nowotworowych w komórkach myszy, szczurów i ludzi zakażonych szczepem Moloney'a i Kirstena wirusa Muridae., selektywne hamowanie wytwarzania wirusów przez zmienione komórki mysie i ludzkie, odtwarzanie komórek normalnych przez zmienione przez wirusa Muridae komórki mysie i szczurze.

Ponadto, pochodne hydrazonowe są selektywnie toksyczne w stosunku do zmienionych przez wirusy komórek mysich, szczurzych i ludzkich, co wynika z badań ich zdolności do tworzenia kolonii. Badania czynności hamującej wywoływanie ognisk nowotworowych przez szczep Moloney'a w hodowli tkankowej przeprowadza się w następujący sposób.

Komórki BALB/3T3 hodzi się w 250 ml pojemnikach z tworzywa sztucznego na pożywcę Eagle'a zawierającej surowicę krowiego płodu. Liczenie komórek przeprowadza się za pomocą licznika Soulera po zawieszeniu ich w nośniku trypsynowym i rozcieńczeniu pożywką.

Jako homogenat nowotworowy stosuje się szczep Moloney'a. Poddaje się go czterokrotnemu pasażowaniu komórkowemu na wielokrotnie pasażowanym zarodku myszy rasy szwajcarskiej i bada właściwości tworzenia ognisk nowotworowych w komórkach BALB/3T3. Stosuje się zmodyfikowany sposób opracowany przez Hatley'a i Rowe'a, Proc. Nat. Acad. Sci., 55, 780, 1966. Zawartą w pojemnikach pożywkę szczepi się komórkami w ilości $1-2 \times 10^6$ na 25 ml i inkubuje w ciągu 24 godzin w 37°C. Po oddzieleniu płynu wprowadza się wirusa w określonej liczbie jednostek nowotworotwórczych.

Następnie w ciągu 30 minut, w 37°C przeprowadza się adsorpcję na pojedynczej warstwie komórek, po czym do 25 ml pożywki wprowadza się określoną ilość, zwykle 5–10 μ g/ml, alkenylowej pochodnej ryfamycyny, w postaci roztworu w dwumetylosulfotlenku o stężeniu 1 mg/ml i hodowlę ponownie umieszcza w inkubatorze. Kontrolę stanowi dodany do odrębnej hodowli dwumetylosulfotlenek w pożywcę. Po trzydniowej inkubacji obserwuje się zmiany w płynie hodowlanym, a nowotworowo zmienione komórki liczy się po 7 dniach prowadzenia hodowli.

W podobny sposób przeprowadza się badania wirusa pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej. Sposoby mnożenia i badania tego wirusa opisali Hackett i współpracownicy, Virology, 34, 114, 1967.

Powyższe właściwości wykazują, że związki otrzymywane sposobem według wynalazku działają hamująco na rozwój wirusowych nowotworów zwierząt.

Wynalazek ilustrują niżej podane przykłady.

Przykład I. 3-/2-benzimidazoilo/ryfamycyna SV.

Roztwór 2,7 g 3-formyloryfamycyna SV i 0,33 g

o-fenilenodwuaminy w 30 ml czterowodorofuranu miesza się w ciągu 30 minut w temperaturze 0–5°C. Produkt otrzymany po odparowaniu rozpuszczalnika przerabia się w dalszym etapie bez oczyszczania (próbna przekrystalizowana z metanolu topnieje w przedziale 252–255°C). Wydajność 80%.

1 g otrzymanej zasady Schiffa rozpuszcza się w mieszaninie 10 ml kwasu octowego i 20 ml czterochlorku węgla, a do chłodzonego wodą z lodem roztworu dodaje 0,5 g czteroctanu ołowiu. Roztwór utrzymuje się w ciągu 2 godzin w temperaturze 0–5°C, a następnie rozcieńcza czterochlorkiem węgla i przemywa 10% roztworem wodnym kwasu askorbinowego, po czym suszy i odparowuje rozpuszczalnik. Pozostałość przekrystalizowuje się z acetonu lub metanolu, otrzymując produkt o temperaturze topnienia 189–193°C (z rozkładem). Wydajność 40%. Widmo absorpcji w nadfiolecie przedstawia się następująco:

(nm)		
λ_{max}	325	460
E 1%		
1 cm	322,5	174,4

Przykład II. 25-desacetylo-3-/2-benzoimidazolo/ryfamycyna SV.

Roztwór 5 g 25-desacetylo-3-formyloryfamycyny SV i 7 g o-fenilenodwuaminy w 100 ml czterowodorofuranu miesza się w ciągu 2 godzin w otwartym naczyniu, w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymuje się surowy produkt, który po przekrystalizowaniu z metanolu topnieje w temperaturze 195–196°C. Wydajność 2,5 g. Widmo absorpcji w nadfiolecie przedstawia się następująco:

(nm)		
λ_{max}	326	462
E 1%		
1 cm	351	191

Przykłady III—VIII. Sposobem opisanym w poprzednim przykładzie otrzymuje się, stosując odpowiednie o-dwuaminy i 3-formyloryfamycyny SV następujące podstawione w pozycji 3 pochodne ryfamycyny SV.

Przykład IX. 3-/1H-9-keto-fluoreno (2,3-d) imidazol-2-ilo/ ryfamycyna SV.

Roztwór 4,2 g 2,3-dwuaminofluorenonu-9 i 14 g formyloryfamycyny w 200 ml czterowodorofuranu ogrzewa się w ciągu 3 godzin w temperaturze wrzenia. Po ochłodzeniu odsacza się produkt topniejący w temperaturze 230°C (rozkładem). Wydajność 12,5 g. Widmo absorpcji w nadfiolecie przedstawia się następująco:

(nm)		
λ_{max}	470	310
E 1%		
1 cm	139,2	357,1
		388,3

Przykład X. 3-/5-karboksy-2-benzoimidazolo/ryfamycyna SV.

Tytułowy związek otrzymuje się sposobem opisanym w przykładzie IX, z tym, że w miejsce 2,3-dwuaminofluorenonu-9 stosuje się kwas 3,4-dwuaminobenzoowy. Temperatura topnienia 215°C (z rozkładem). Widmo absorpcji w nadfiolecie przedstawia się następująco:

(nm)		
λ_{max}	462	328
E 1%		
1 cm	161	310,1

Wyniki mikroanalizy elementarnej związków opisanych w powyższych przykładach są zgodne z wartościami teoretycznymi.

Sposobami opisanymi w przykładach I—X otrzymuje się następujące przedstawione w pozycji 3 pochodne ryfamycyny, 25-desacetyloryfamycyny i sześciowodororyfamycyny.

Przykład	Amina	Podstawnik w pozycji 3 ryfamycyny SV	Temperatura topnienia °C	λ_{max} nm	E 1% 1 cm
III	3,4-toluilodwuamina	5-metylo-2-benzoimidazolil	136 — 7	464	165,5
IV	4,5-dwumetylo-o-fenilenodwuamina	5,6-dwumetylo-2-benzoimidazolil	180	328	316,4
V	4,5-acenaftenodwuamina	4,5-dwuwodoro 7H-acenafto (4,5-d) imidazol-8-il	220 z rozkładem	465	149
VI	4-chloro-o-fenilenodwuamina	5-chloro-2-benzoimidazolil	215 — 6 z rozkładem	332	296,5
VII	2,3-fluorenadwuamina	1,9-dwuwodorofluoreno (2,3-d) imidazol-2-il	200 z rozkładem	485	140,4
VIII	1,2-dwuaminoantrachinon	6,11-dwuketo-antra (1,2-d) imidazol-2-il	230 z rozkładem	360	246,1
				465	166,1
				328	326
				485	132,5
				358	348,1
				429	179

Wyjściowa amina	Podstawnik w pozycji 3 ryfamycyny SV
1	2
4-nitro-o-fenilenodwuamina	5-nitro-2-benzimidazolil
4-dwumetylokarbamyl-o-fenilenodwuamina	5-dumetylokarbamyl-o-2-benzoimidazolil
4-butylo-o-fenilenodwuamina	5-butylo-2-benzoimidazolil
4-pentylo-o-fenilenodwuamina	5-pentylo-2-benzoimidazolil
3-nitro-o-fenilenodwuamina	4-nitro-2-benzoimidazolil
4-bromo-o-fenilenodwuamina	5-bromo-2-benzoimidazolil
4-fluoro-o-fenilenodwuamina	5-fluoro-2-benzoimidazolil
4,5-dwuchloro-o-fenilenodwuamina	5,6-dwuchloro-2-benzoimidazolil
4,5-dwumetoksy-o-fenilenodwuamina	5,6-dwumetoksy-2-benzoimidazolil
4,5-dwuetoksy-o-fenilenodwuamina	5,6-dwuetoksy-2-benzoimidazolil
4,5-metylenodwuketo-o-fenilenodwuamina	5,6-metylenodwuketo-2-benzoimidazolil
4,5-dwunitro-o-fenilenodwuamina	5,6-dwunitro-2-benzoimidazolil
4-sulfamoilo-o-fenilenodwuamina	5-sulfamoilo-2-benzoimidazolil
N-etylo-o-fenilenodwuamina	1-etylo-2-benzoimidazolil
N ¹ -metylo-4-trójfluorometylo-o-fenilenodwuamina	1-metylo-5-trójfluorometylo-2-benzoimidazolil
N ¹ -metylo-4,5-dwumetoksy-o-fenilenodwuamina	1-metylo-5,6-dwumetoksy-2-benzoimidazolil
N-benzylo-o-fenilenodwuamina	1-benzylo-2-benzoimidazolil
N-fenilo-o-fenilenodwuamina	1-fenilo-2-benzoimidazolil
ester etylowy kwasu 3,4-dwuaminobenzenowego	5-karboetoksy-2-benzoimidazolil
kwas 2-chloro-4,5-dwuaminobenzenosulfonowy	6-chloro-5-sulfo-2-benzoimidazolil
9,10-fenantrenodwuamina	fenantreno[9,1(-d)]imidazol-2-il
1,2-naftalenodwuamina	nafto (1,2-d)imidazol-2-il
kwas 1,2-dwuaminonafthalenosulfonowy-4	5-sulfo-nafto [1,2-d]imidazol-2-il
kwas 1,2-dwuaminofenantrenosulfonowy-4	3-sulfo-fenantreno (1,2-d)imidazol-2-il

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania podstawionych w pozycji 3 ryfamycyn o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza atom wodoru, rodnik alkilofenyłowy lub fenyloalkilowy, a R¹ i R² razem, stanowią łańcuch karbocykliczny, który łącznie z podwójnym wią-

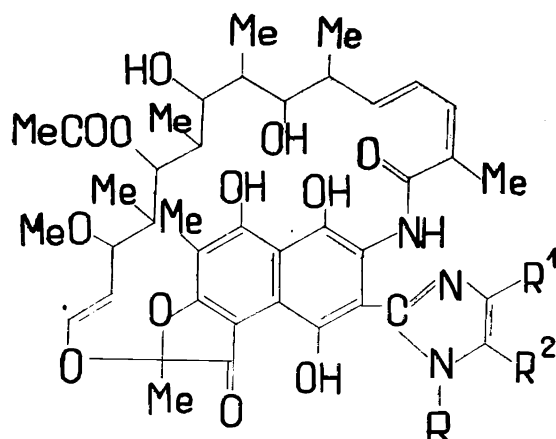
zaniem przylegającego pierścienia imidazolowego tworzy pierścień benzenu, niepodstawiony lub podstawiony jedno- lub wielokrotnie atomem chlorowca, rodnikiem alkilowym, grupą alkoksylową, karboksylową, karboalkoksylową, sulfonową, sulfamylową, nitrową, trójfluorometylową, karbamylową, jedno- lub dwualkilokarbamylową lub podstawiony lub niepodstawiony rodnik składający się z 2—3 skondensowanych pierścieni, w skład których wchodzi po 5—6 atomów węgla, **znamienny tym**, że 3-formyloryfamycynę, poddaje się reakcji z o-dwuaminą o ogólnym wzorze 2, w którym R, R¹ i R² mają wyżej podane znaczenie i otrzymany związek poddaje działaniu akceptora wodoru, takiego jak powietrze, sole miedziowe, sole rtęciowe, dwutlenek manganu, żelazicyjanek potasu lub czteroocian ołowiu, z tym, że w przypadku gdy otrzymany w tej reakcji związek ma postać chinonu, redukuje się go kwasem askorbinowym do odpowiedniego hydrochinonu.

2. Sposób wytwarzania podstawionych w pozycji 3 ryfamycyn o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza atom wodoru, rodnik alkilofenyłowy lub fenyloalkilowy, a R¹ i R² razem, stanowią łańcuch karbocykliczny, który łącznie z podwójnym wiązaniem przylegającego pierścienia imidazolowego tworzy pierścień benzenu niepodstawiony lub podstawiony jedno- lub wielokrotnie atomem chlorowca, rodnikiem alkilowym, grupą alkoksylową, karboksylową, karboalkoksylową, sulfonową, sulfamylową, nitrową, trójfluorometylową, karbamylową, jedno- lub dwualkilokarbamylową lub podstawiony albo niepodstawiony rodnik składający się z 2—3 skondensowanych pierścieni, w skład których wchodzi po 5—6 atomów węgla, **znamienny tym**, że 25-desacetylopochodną 3-formyloryfamycyny poddaje się reakcji z o-dwuaminą o ogólnym wzorze 2, w którym R, R¹ i R² mają wyżej podane znaczenie i otrzymany związek poddaje działaniu akceptora wodoru, takiego jak powietrze, sole miedziowe, sole rtęciowe, dwutlenek manganu, żelazicyjanek potasu lub czteroocian ołowiu, z tym, że w przypadku otrzymanego w tej reakcji związku ma postać chinonu, redukuje się go kwasem askorbinowym do odpowiedniego chydrochinonu.

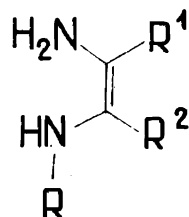
3. Sposób wytwarzania, podstawionych w pozycji 3 ryfamycyn o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza atom wodoru, rodnik alkilofenyłowy lub fenyloalkilowy, a R¹ i R² razem, stanowią łańcuch karbocykliczny, który łącznie z podwójnym wiązaniem przylegającego pierścienia imidazolowego tworzy pierścień benzenu, niepodstawiony lub podstawiony jedno- lub wielokrotnie atomem chlorowca, rodnikiem alkilowym, grupą alkoksylową, karboksylową, karboalkoksylową, sulfonową, sulfamylową, nitrową, trójfluorometylową, karbamylową, jedno- lub dwualkilokarbamylową lub podstawiony albo niepodstawiony rodnik składający się z 2-3 skondensowanych pierścieni, w skład których wchodzi po 5—6 atomów węgla, **znamienny tym**, że 16,17,18,19,28,29-sześciowodoropochodną podstawionej w pozycji 3 ryfamycyny poddaje się reakcji z o-dwuaminą o ogólnym wzorze 2, w któ-

rym R, R¹ i R² mają wyżej podane znaczenie i otrzymany związek poddaje działaniu akceptora wodoru, takiego jak powietrze, sole miedziowe, sole rtęciowe, dwutlenek manganu, żelazicyjanek

potasu lub czteroocian ołowiu, z tym, że w przypadku gdy otrzymany w tej reakcji związek ma postać chinonu, redukuje się go kwasem askorbinowym do odpowiedniego hydrochinonu.



Wzór 1



Wzór 2

