



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent dodatkowy
do patentu nr ———

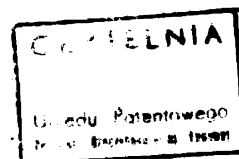
Zgłoszono: 86 12 08 (P. 262861)

Int. Cl.⁴ C07D 498/04

Pierwszeństwo ———

Zgłoszenie ogłoszono: 88 10 27

Opis patentowy opublikowano: 90 04 30



Twórcy wynalazku: Edward Żukowski, Kazimiera Skrzypkowska, Wiesław Drzewiński,
Stefan Ledwoch, Ryszard Andruszaniec, Krystyna Nowakowska,
Mirosław Dąbrowski, Krzysztof Bujnowski, Jerzy Szymański,
Witold Szmigielski, Witold Napiórkowski, Jan Dominiak

Uprawniony z patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „POLFA”,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania ryfamycyn

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania ryfamycyn, zwłaszcza ryfamycyn O i ryfamycyn S. Związki te otrzymuje się w skali przemysłowej głównie na drodze chemicznego przekształcania ryfamycyny B, antybiotyku wytwarzanego w procesie biosyntezy. Znany jest również sposób biologicznej transformacji ryfamycyny B do ryfamycyny O i ryfamycyny S przy użyciu odpowiednich enzymów.

Ryfamycyny O i S stanowią półprodukty do wytwarzania aktywnych biologicznie antybiotyków stosowanych w lecznictwie, takich jak ryfamycyna SV i ryfampicina.

Z doniesień literaturowych i opisów patentowych znane są metody otrzymywania ryfamycyn, zwłaszcza ryfamycyn O i S, polegające na chemicznym utlenianiu ryfamycyny B, wyłącznie w przesączu z brzezki po fermentacji, a nie bezpośrednio w brzezce, do ryfamycyny O, a następnie na przekształceniu ryfamycyny O w ryfamycynę S lub ryfamycynę SV.

Próby wyodrębniania ryfamycyny B z brzezki po fermentacji dla jej przekształcenia w ryfamycynę O i następnie w ryfamycynę S, wiązały się z użyciem dużej ilości rozpuszczalników, które wymagały stosowania aparatury o zwiększonej objętości oraz prowadzenie wielokrotnej ekstrakcji. Ponadto równocześnie z produktem właściwym ekstrahuje się produkty uboczne, co powoduje konieczność dodatkowego oczyszczania i pociąga za sobą obniżenie wydajności procesu.

Jeden ze sposobów otrzymywania ryfamycyny B po procesie fermentacji, przed jej utlenieniem do ryfamycyny O, jest podany w opisie patentowym USA nr 2 988 490. Z brzezki uzyskuje się przesącz pofermentacyjny (bulion), zawierający ryfamycynę B, który poddaje się ekstrakcji, a następnie reekstrakcji ryfamycyny B. Do ekstrakcji w kwaśnym zakresie pH stosowane są rozpuszczalniki organiczne, takie jak chloroform, octan etylu lub butylu oraz wodny roztwór buforowy dla przeprowadzenia ryfamycyny B, przed jej utlenieniem, z rozpuszczalnika organicznego do warstwy buforowej. Uzyskaną wodną warstwę buforową, zawierającą ryfamycynę B, zadawano środkiem utleniającym i po reakcji z roztworu wodnego wytrącano ryfamycynę O.

Opisany sposób ma wiele niedogodności, takich jak wielokrotność ekstrakcji, stosowanie rozpuszczalników o dużej objętości, niska wydajność i bardzo duża zawartość substancji balastowych.

Według innej metody, opisanej w patencie belgijskim nr 796 018, proces utleniania ryfamycyny B do ryfamycyny O prowadzi się w klarownym przesączu, uzyskanym z brzezki pofermentacyjnej, za pomocą znanych czynników utleniających, takich jak nadsiarcezan sodu, azotyn sodu lub nadtlenek wodoru, przy wartości pH 4,0–7,5, w temperaturze 15–25°C, w układzie jednofazowym bez stosowania rozpuszczalników organicznych. Proces utleniania przebiega w jednofazowym roztworze wodnym, powstałym z brzezki pofermentacyjnej po oddzieleniu grzybni. Uzyskana w tych warunkach ryfamycyna O, jako nierozpuszczalny produkt w przesączu wodnym, oddzielana jest przez sączenie. Metoda ta nie zapewnia selektywności, a produkt wykazuje tylko 60–70% czystości. Jednocześnie uzyskuje się niską wydajność ryfamycyny O rzędu 85% w przeliczeniu na aktywność produktu.

Znany jest również sposób otrzymywania ryfamycyn B, O i S metodą adsorpcji na zasadowej żywicy makrousięciowanej, a następnie na desorpcji w odpowiednim układzie rozpuszczalników organicznych, jak podano w opisie patentowym USA nr 4 402 877. W tej metodzie także należy stosować znaczne ilości rozpuszczalników, przy czym selektywność produktów jest mała, a wydajność procesu uzyskiwanej ryfamycyny O w stosunku do utlenianej ryfamycyny B nie przekracza również 85%.

W opisie patentowym USA nr 4 431 735 podano sposób przekształcania ryfamycyny B do ryfamycyny O, a następnie do ryfamycyn S lub SV metodą biologiczną, która polega na poddaniu ryfamycyny B działaniu enzymatycznego utleniania przy zastosowaniu drobnoustrojów z gatunku *Humicola* lub *Monocillium*. Sposób ten daje dobre wyniki ale tylko w przypadku używania czystych roztworów ryfamycyny B, natomiast jeśli jej transformacja jest przeprowadzana bezpośrednio z bulionu pofermentacyjnego lub z brzezki, metoda ta nie zapewnia uzyskania wysokiej czystości produktu. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że odtzymuje się wówczas ryfamycynę O o czystości 70–75%, wymagającą dodatkowego oczyszczania przez co obniża się wydajność procesu. Bardzo powoli przebiega proces transformacji, bo około 10 godzin i wymaga stosowania aparatury o dużej pojemności z uwagi na potrzebę wprowadzania nadmiaru rozpuszczalników, przy czym procesu nie można prowadzić w sposób ciągły.

Według wynalazku, sposób wytwarzania ryfamycyn O i S z ryfamycyny B, zawartej w brzezce pofermentacyjnej lub w jej wodnym przesączu polega na prowadzeniu procesu utleniania ryfamycyny B do ryfamycyny O w układzie dwufazowym wodnoorganicznym z zastosowaniem nie mieszającego się z wodą rozpuszczalnika organicznego lub mieszaniny rozpuszczalników nie mieszających się z wodą w ilości 10–30% objętościowych w stosunku do fazy wodnej w znanym zakresie pH środowiska reakcji oraz znanymi środkami utleniającymi.

Jako rozpuszczalniki organiczne nie mieszające się z wodą stosuje się zgodnie z wynalazkiem węglowodory aromatyczne, takie jak toluen lub benzen, bądź chlorowcoalkany, takie jak 1,2-dichloroetan lub chloroform.

Przez wprowadzenie rozpuszczalnika organicznego nie mieszającego się z wodą lub mieszaniny tych rozpuszczalników bezpośrednio do wodnego przesączu pofermentacyjnego lub brzezki z zawartością ryfamycyny B, oraz przez dodanie do mieszaniny znanego czynnika utleniającego, następuje transformacja ryfamycyny B do ryfamycyny O, która przechodzi z fazy wodnej do fazy organicznej. Po procesie utleniania oddziela się od fazy wodnej fazę organiczną, zawierającą ryfamycynę O w postaci ekstraktu, który ewentualnie przemywa się wodnym roztworem buforu fosforanowego lub roztworem mocznika o tej samej wartości pH w przypadku stosowania chlorowcoalkanu jako rozpuszczalnika organicznego nie mieszającego się z wodą.

Sposób prowadzenia procesu utleniania ryfamycyny B zarówno w brzezce, który dotychczas nie był stosowany, jak i w przesączu pofermentacyjnym z udziałem rozpuszczalników organicznych nie mieszających się z wodą, w układzie dwufazowym wodnoorganicznym, jest nie znany w technice i stanowi istotę wynalazku.

Ryfamycynę O wydziela się z ekstraktu przez krystalizację. Jeśli jako rozpuszczalnik organiczny nie mieszający się z wodą stosowany jest toluen lub benzen, to ekstrakt z zawartością ryfamycyny O zagęszcza się prawie do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a do pozostałości

dodaje się niższy alkohol alifatyczny, np. metanol, odpędza resztki toluenu lub benzenu, dodaje wodę, obniżając temperaturę krystalizacji do 4°C i otrzymuje się krystaliczną ryfamycynę O z wydajnością 95% o czystości 98%.

Przy zastosowaniu toluenu lub benzenu jako rozpuszczalnika organicznego nie mieszającego się z wodą można bez dodatkowej obróbki zagęścić ekstrakt do stężenia około 120 000 µg ryfamycyny O w 1 cm³ i przeprowadzić transformację ryfamycyny O bez jej wydzielania do ryfamycyny S przy użyciu kwasu siarkowego i alkoholu alifatycznego o 1–4 atomach węgla, korzystnie metanolu. Po transformacji wydziela się ryfamycynę S przez krystalizację z wydajnością 80% i o czystości 98%. Oznaczenie czystości dokonywano metodą spektrofotometryczną i chromatograficzną.

Roztwór toluenowy zawierający ryfamycynę S, po uprzedniej transformacji ryfamycyny B do ryfamycyny O i drugiej transformacji ryfamycyny O do S, jest przydatny do dalszego przerobu dla otrzymania 3-formyloryfamycyny SV według znanych metod bez konieczności dodatkowego oczyszczania i wyodrębniania krystalicznej ryfamycyny S.

Znamienną cechą prowadzonego według wynalazku procesu utleniania ryfamycyny B jest fakt, że powstająca w czasie procesu ryfamycyna O jest natychmiast ekstrahowana do rozpuszczalnika organicznego nie mieszającego się z wodą, jako nierozpuszczalna w fazie wodnej, a rozpuszczalna w fazie organicznej, w której nie ulega rozkładowi, co zapewnia znaczne zwiększenie wydajności utleniania i zabezpiecza czystość produktu. W ten sposób unika się również mechanicznego osadzania ryfamycyny O na smolistych pozostałościach związków zanieczyszczających wyjściowy roztwór.

Procesy utleniania, ekstrakcji i rozdziału faz przebiegają szybko w ciągu zaledwie 1–2 godzin.

Wybór szczególnie toluenu do procesu utleniania wiąże się z istnieniem takiego fazowego napięcia powierzchniowego, które zabezpiecza ryfamycynę O przed działaniem reagentów w fazie wodnej oraz szybko i skutecznie odprowadza ryfamycynę O ze środowiska wodnego po jej utworzeniu. Ponadto charakter fizykochemiczny toluenu sprzyja selektywności w minimalizowaniu rodzaju zanieczyszczeń i ich ilości, które przechodzą do fazy organicznej, nie zaburzając kontaktu ryfamycyny B z czynnikiem utleniającym.

Selektywność utleniania ryfamycyny B do ryfamycyny O w brzeczce lub w przesączu pofermentacyjnym i ekstrakcji według wynalazku przedstawione są na załączonym do opisu chromatogramie /TLC/ wykonanym na folii firmy Merck-DC-Alufolien Kieselgel 60F 254, w układzie benzen — metanol /5 : 1/, w którym kolejne pozycje oznaczają: 1. ryfamycyna O — standard, 2. ryfamycyna O — produkt wyodrębniony sposobem według wynalazku, 3. ryfamycyny O — ekstrakt toluenowy otrzymany sposobem według wynalazku, 4 i 5. ryfamycyna O — ekstrakty organiczne otrzymane sposobem według innych wynalazków.

Przykład I. Do 2 dm³ brzeczki pofermentacyjnej, zawierającej 400 µg/cm³ ryfamycyny B, dodano przy ciągłym mieszaniu 350 cm³ benzenu i 9 g nadsiarczanu sodu, po czym mieszano przez 1 godzinę. Stały osad grzybni oddzielono na wirówce, a warstwę ciekłą pozostawiono do rozdziału dwóch faz: wodnej i organicznej. Fazę wodną odrzucono pozostawiając fazę benzenową do dalszego postępowania. Odwirowany osad grzybni wymieszano z 1 dm³ wody i powtórnie ekstrahowano go 200 cm³ benzenu. Odwirowany osad odrzucowano, a warstwę ciekłą rozdzielono na wodną i organiczną, benzenową, wykorzystując tylko fazę organiczną. Połączone wyciągi benzenowe zawierające ryfamycynę O odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Do suchej pozostałości dodano 150 cm³ metanolu, ogrzano do temperatury 35–40°C i roztwór odsączono do stałych zanieczyszczeń. Do metanolowego roztworu ryfamycyny O dodano podczas mieszania 40 cm³ wody i po 4 godzinach krystalizacji w temperaturze 4°C oddzielono wytrącone kryształy ryfamycyny O, przemyto je 50 dm³ mieszaniny wodno-metanolowej /1 : 1/ i wysuszono w temperaturze 45–55°C pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano 7,6 g ryfamycyny O z wydajnością 95% i o czystości 98%.

Przykład II. Do 5 dm³ brzeczki pofermentacyjnej o zawartości 5200 µg ryfamycyny B w 1 cm³ dodano podczas mieszania 1 dm³ toluenu i 28,5 g nadsiarczanu amonu, po czym całość mieszano przez 1,5 godziny. Osad grzybni oddzielono przez odwirowanie a ciecz pozostawiono do rozdziału faz, jak w przykładzie I. Po odrzuceniu grzybni i warstwy wodnej uwolniono warstwę toluenową jako fazę organiczną od stałych zanieczyszczeń przez filtrację. Odparowano do sucha fazę toluenową, zawierającą ryfamycynę O pod zmniejszonym ciśnieniem i po krystalizacji z

uwodnionego metanolu /1 : 1/ oraz wysuszeniu otrzymano 25 g ryfamycyny O, co stanowi 96% wydajności produktu o czystości 98,5%.

Przykład III. Do 200 dm³ przesączu pofermentacyjnego /bulionu/, zawierającego 5000 µg ryfamycyny B i 1 cm³, przy wartości pH 7,2 dodano podczas mieszania 40 dm³ toluenu i 1,1 kg nadsiarczany sodu. Całość mieszano 0,5 godziny i pozostawiono do rozdziału dwóch faz. Wodną fazę odrzucono a organiczną fazę toluenową, zawierającą ryfamycynę O zagęszczono do objętości 10 dm³. Następnie do zagęszczonego roztworu dodano 10 dm³ metanolu i 0,64 dm³ oraz 33% roztworu kwasu siarkowego. Całość mieszano w temperaturze 20°C przez 8 godzin. Ekstrakt organiczny, zawierający ryfamycynę S, po odmyciu z niego metanolu i kwasu siarkowego wodą, zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 2 dm³, dodano 20 dm³ metanolu i odparowano do objętości 3 dm³. Wykryształizowany osad ryfamycyny S mieszano w temperaturze -5°C przez 3 godziny, odsączono go, przemyto ochłodzonym metanolem i wysuszono. Otrzymano 0,8 kg ryfamycyny S o aktywności 940 µg/mg, co stanowi 81% wydajności. Czystość 98,5%.

Przykład IV. Do 2,5 dm³ przesączu pofermentacyjnego /bulionu/ o zawartości 4000 µg ryfamycyny B w 1 cm³ dodano podczas mieszania 350 cm³ chloroformu i 8 g nadsiarczany sodu, po czym całość mieszano przez 6 godzin. Po reakcji utlenienia ryfamycyny B do ryfamycyny O dodano stężony 0,5% roztwór buforu fosforanowego do wartości pH 7,2. Całość mieszano przez godzinę, a następnie ogrzano do temperatury 35–40°C i dodano roztwór wodny NaCl w ilości 4% wagowo/objętościowo. Po 15 minutach przerwano mieszanie i roztwór schłodzono powoli do temperatury 18–20°C. Po 6 godzinach oddzielono fazę chloroformową a fazę wodną ekstrahowano ponownie 170 cm³ chloroformu. Po rozwarstwieniu faz wodną fazę oddzielono i odrzucono, a zebrane ekstrakty chloroformowe, zawierające ryfamycynę O, odsączono do zanieczyszczeń stałych i zagęszczono do stężenia ryfamycyny O około 150 000 — 180 000 µg/cm³. Następnie dodano metanol w ilości równej objętości zagęszczonego ekstraktu chloroformowego i 6,4 cm³ 33% kwasu siarkowego, prowadząc hydrolizę ryfamycyny O do ryfamycyny S, jak w przykładzie III. Otrzymano 7,7 g ryfamycyny S o aktywności 950 µg/mg i czystości 98%. Wydajność procesu 77%.

Przykład V. Do 150 dm³ bulionu o zawartości ryfamycyny B 4500 µg w 1 cm³ dodano podczas mieszania rozpuszczalniki nie mieszające się z wodą w mieszaninie składającej się z 20 dm³ toluenu i 5 dm³ 1,2-dichloroetanu oraz 0,8 kg nadsiarczany amonu. Całość mieszano 0,5 godziny i pozostawiono ją do rozdziału faz, po czym fazę wodną odrzucono a fazę organiczną zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 4,5 dm³. Następnie do zagęszczonego roztworu, zawierającego ryfamycynę O, dodano 4,5 dm³ metanolu i 0,4 dm³ 33% kwasu siarkowego, przeprowadzając hydrolizę ryfamycyny O do ryfamycyny S, jak w przykładzie III. Otrzymano 0,54 kg ryfamycyny S o aktywności 960 µg/mg, co stanowi 83% wydajności. Czystość produktu — 98,5%.

Przykład VI. Do 200 cm³ ekstraktu toluenowego, otrzymanego sposobem jak w przykładzie III, zawierającego 15 g ryfamycyny S dodano 15 g bezwodnego siarczany sodu i całość mieszano przez 30 minut. Po odwodnieniu ekstraktu odsączono osad siarczany sodu i dodano do ekstraktu 7,5 g dwutlenku manganu, 10 cm³ N-metylo-tertbutyloaminy i 4,3 cm³ tertbutyloaminy. Całość ogrzewano w temperaturze 50°C przez 12 godzin przy ciągłym mieszaniu. Następnie odsączono dwutlenek manganu z jego zredukowanymi pochodnymi i ekstrakt przemyto niewielką ilością toluenu. Roztwór toluenowy zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem aż do sucha, rozpuszczono suchą pozostałość w 75 cm³ czterowodorofuranu i dodano podczas mieszania roztwór, zawierający 80 cm³ 15% kwasu siarkowego i 5 g kwasu askorbinowego. Całość mieszano w ciągu 3 godzin w temperaturze 45°C do czasu całkowitej hydrolizy i redukcji do 3-formyloryfamycyny SV.

Następnie po redukcji roztwór ochłodzono do temperatury 15°C w celu krystalizacji, mieszając przez 2 godziny. Wytrącony osad odsączono i przemyto 50% roztworem wodnym czterowodorofuranu. Po wysuszeniu osadu otrzymano 13,5 g 3-formyloryfamycyny SV o aktywności 900 µg/mg, co stanowi 90% wydajności, obliczonej w stosunku do ryfamycyny S w ekstrakcie toluenowym. Czystość produktu — 98,5%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania ryfamycyny O i S z ryfamycyny B, zawartej w przesączu brzeczki pofermentacyjnej, przez jej utlenienie do ryfamycyny O znanymi środkami utleniającymi i następnie przez dalsze przekształcenie w ryfamycynę S oraz w 3-formyloryfamycynę SV, **znamienny tym**, że proces utleniania ryfamycyny B do ryfamycyny O prowadzi się w brzeczce pofermentacyjnej lub w jej wodnym przesączu w układzie dwufazowym wodnoorganicznym z zastosowaniem nie mieszającego się z wodą rozpuszczalnika organicznego lub mieszaniny rozpuszczalników organicznych nie mieszających się z wodą, w ilości 10–30% objętościowych w stosunku do fazy wodnej, następnie oddziela się od fazy wodnej fazę organiczną, zawierającą ryfamycynę O w postaci ekstraktu, który ewentualnie przemywa się roztworem wodnym buforu fosforanowego lub wodnym roztworem mocznika i zagęszcza, po czym albo wydziela się ryfamycynę O przez krystalizację i poddaje hydrolizie do ryfamycyny S, albo bez jej wydzielania przeprowadza się transformację ryfamycyny O do ryfamycyny S lub do 3-formyloryfamycyny SV bezpośrednio w ekstrakcie.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalniki organiczne nie mieszające się z wodą stosuje się węglowodory aromatyczne, takie jak toluen lub benzen, bądź chlorowcoalkany, takie jak 1,2-dichloroetan lub chloroform.

