

10



PATENTE DE INVENCION

Ref: Case 5371/1-3.

30 4831

Memoria Descriptiva
sobre

"Procedimiento para la fabricación de composiciones de acción antibiótica".

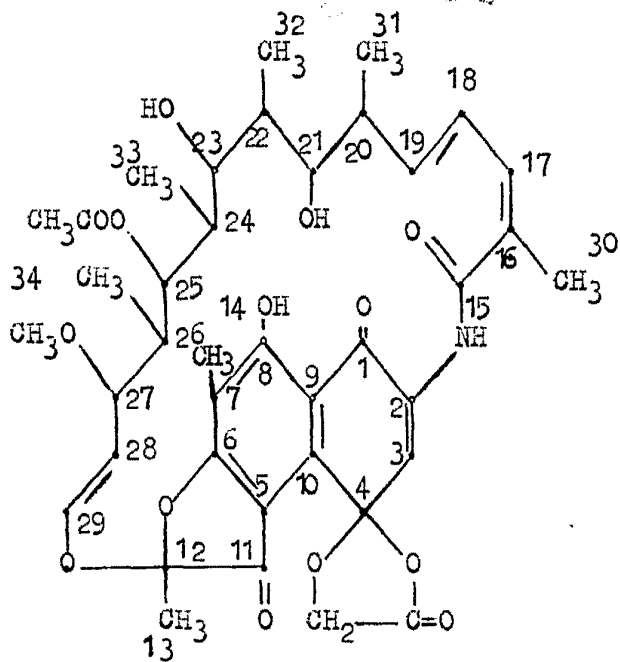
=====

Solicitante: CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza, residente en Basilea, Suiza, y LEPETIT S.p.A., entidad italiana, residente en Via Roberto Lepetit, 8, MILAN, Italia.

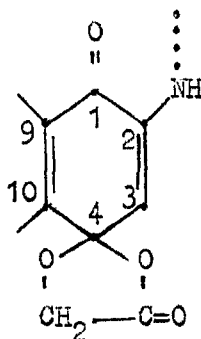
=====

Objeto de la invención es la fabricación de nuevas composiciones de acción antibiótica, que se distinguen de la rifamicina O, que según las publicaciones en *Experientia* 20 (1964), 336, 339 tiene la siguiente fórmula

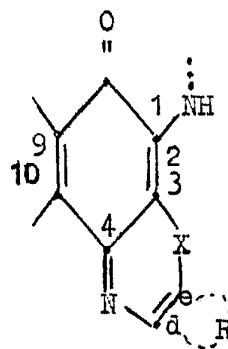
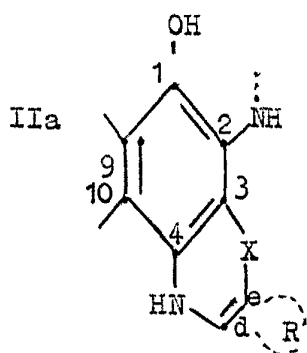
5.



porque en lugar de su fórmula parcial



tienen una de las fórmulas parciales IIa o IIb

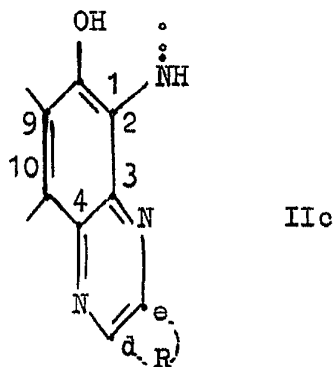


IIb

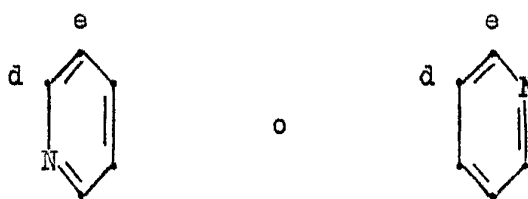
35³ 4831



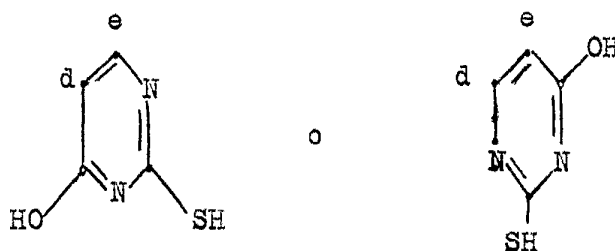
5. donde X es NH, S u O y donde R junto con los átomos de carbono d y e representa el resto de una composición aromática o de una composición heterocíclica de carácter aromático, así como de sus 16, 17, 18, 19-tetrahidro-derivados. Por la arriba citada fórmula IIb se abarcan también para el caso X=NH las formas tautómeras de la estructura



- 10 R) representa junto con los átomos de carbono d y e ante todo un resto arílico como fenílico o naftílico, o un resto piridílico o pirimidílico, que también pueden estar mono- o polisustituidos. Sustituyentes son, por ejemplo, los grupos hidroxilo, merkaptó, alquílico inferior, alcoxi inferior, tioalquílico inferior, nitro, amino, carboxil, sulfo, ciano o átomos de halógeno.
- 15 En especial hay que mencionar las siguientes composiciones de la arriba citada fórmula IIb, donde
1. X=NH, edR = fenileno
 2. X=NH, edR = fenileno sustituido por cloro en posición p con respecto a e o d
 20. 3. X=NH, edR = piridileno de fórmula



4. X=NH, edR = pirimidileno de fórmula



5. X=NH, edR = fenileno sustituido por metilo en posición p con respecto a e o d

6. X=NH, edR = fenileno sustituido por metilo en posición o con respecto a e o d

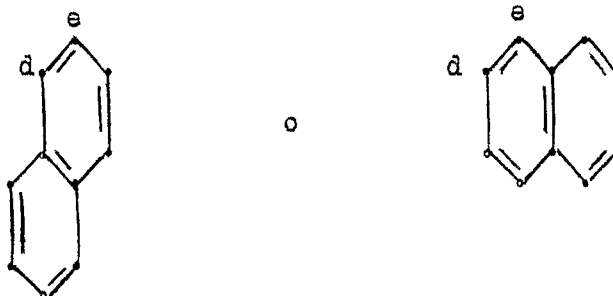
5.

7. X=NH, edR = fenileno sustituido por etilo en posición o con respecto a e o d

8. X=NH, edR = fenileno sustituido por un metilo en cada caso en posición p con respecto a e y d

10.

9. X=NH, edR = naftileno de fórmula





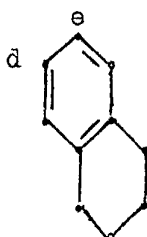
1831

- 10. $X=O$, edR = fenileno
- 11. $X=O$, edR = fenileno sustituido por cloro en posición p con respecto a e
- 12. $X=O$, edR = fenileno sustituido por un grupo nitro en posición p con respecto a e
- 5. 13. $X=O$, edR = fenileno sustituido por cloro en posición o con respecto a e y por un grupo nitro en posición p con respecto a d
- 10. 14. $X=O$, edR = fenileno sustituido por un grupo carbóxico en posición o con respecto a d
- 15. 15. $X=O$, edR = naftileno de fórmula



- 16. $X=O$, edR = fenileno sustituido por metilo en posición o con respecto a e
- 15. 17. $X=O$, edR = fenileno sustituido por metilo en posición p con respecto a d
- 18. $X=O$, edR = fenileno sustituido por metilo en posición p con respecto a e
- 19. $X=NH$, edR = tetrahidronaftileno de fórmula

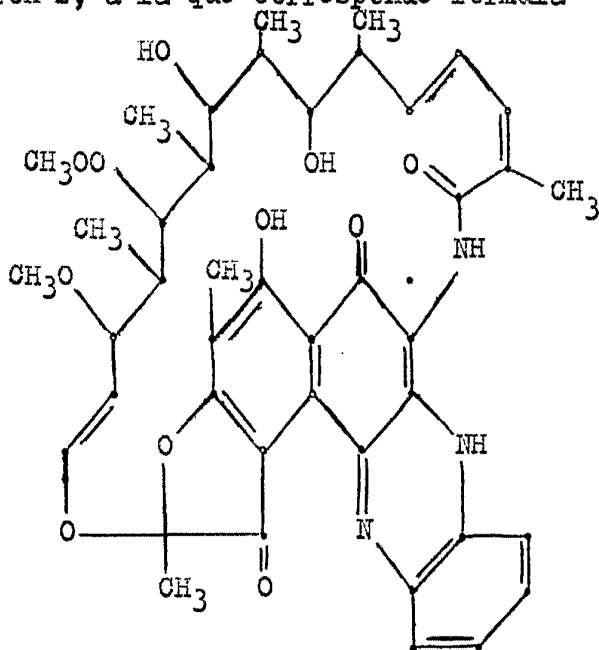
20.



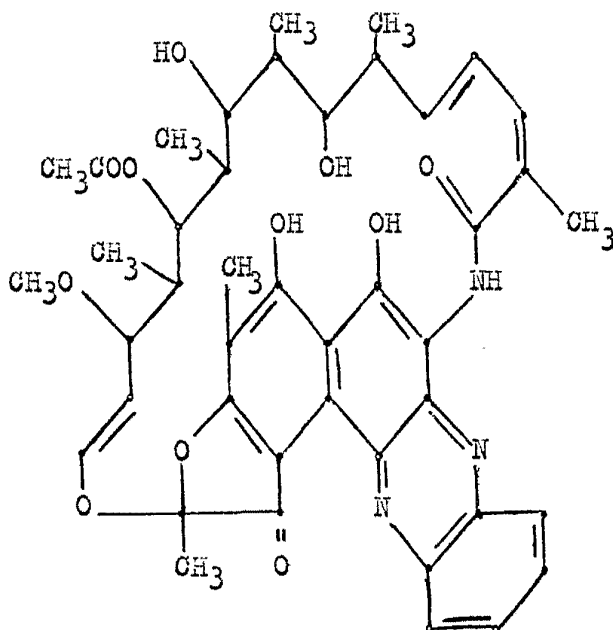


20. El 16, 17, 18, 19-tetrahidro-derivado de la arriba citada fórmula I, así como los correspondientes derivados de hidroquinona de la fórmula IIa, que se designarán con los números 1' - 20'.

5. Especial importancia tiene la arriba citada composición I, a la que corresponde fórmula



o, en su forma teutómera



- 7 - 4831



y que se designa como rifamicina PH.

Las nuevas composiciones son sustancias profundamente coloreadas. Las quinonas (IIb) y las hidroquinonas (IIa) pueden transformarse fácilmente entre si.

5. De ambas pueden producirse sales solubles en agua, mediante reducción con álcalis, y esto ventajosamente de la forma quinoídal b si en la fórmula II es $X=NH$, y ventajosamente de la forma hidroquinoídal a si en fórmula II es $X=O$. Si las composiciones de las formas a o
10. b llevan sustituyentes básicos, también pueden formar sales de adición de ácido, empleándose ante todo ácidos adecuados para formar sales de utilización terapéutica. Por ejemplo, pueden nombrarse como tales: hidrácidos halógenos, ácidos sulfúricos, ácidos fosfóricos, ácido nítrico, ácido perclórico; ácidos carbónicos o sulfónicos alipáticos, alicíclicos, aromáticos o heterocíclicos, como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascorbínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico o ácido piroparatartárico; ácido fenil-acético, ácido benzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido antranílico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido salicílico o ácido p-aminosalicílico, ácido embónico, ácido metano-sulfónico, ácido etano-sulfónico, ácido hidroxietano-sulfónico, ácido etileno-sulfónico; ácido halógeno-benzol-sulfónico, ácido tolueno-sulfónico, ácido naftalina-sulfónico o ácido sulfanílico; metionina, triptofano, lisina o arginina.

- 25.
30. Estos y otras sales de las nuevas composiciones, como por ejemplo los picratos, pueden servir también

304831



para la purificación de las bases obtenidas, transformando las bases en sales, separando éstas y liberando otra vez las bases de las sales. Debido a la estrecha relación entre las bases en forma libre y en forma de sus sales, en lo que antecede y en lo que sigue se entenderá eventualmente, según sentido y finalidad, por bases libres también las sales correspondientes.

5.

Las composiciones de las fórmulas IIa o IIb, sus 16,17,18,19-tetrahidroderivados, mezclas de ellos y sus sales, se caracterizan por una eficacia antibiótica elevada. Así demuestran una alta eficacia antibacterial contra bacterias grampositivas y contra bacilos de la tuberculosis y una buena eficacia contra bacterias gramnegativas. Un efecto particularmente manifiesto lo presenta la rifamicina PH arriba descrita, que

10.

tanto in vitro como también en vivo es superior a otros antibióticos comparables conocidos, como p.e. rifamicina SV, según se aprecia en los cuadros siguientes.

15.

Actividad in vitro de rifamicina PH en comparación con rifamicina SV. Concentración de contención mínima en μ /ml.

20.

T A B L A 1



Organismo		Rifamicina	
		PH	SV
S. aureus	16	0,06	0,01
"	14	<0,008	0,06-0,008
"	3	<0,008	0,008
"	2977	0,4	0,025
"	19 (PV 43)	<0,008	0,025
"	2999	<0,008	0,06-0,01
Str. faecalis	51	1,5	30
E. coli	203	30	125-250
"	205	30	125-250
"	209	15	125-250

T A B L A 2

Organismos		Rifamicina	
		PH	SV
Salmonella	271	15	125-250
"	273	25	125
"	277	15	250
Klebsiella	327	30	125
Ps. aer.	313	30	125
"	314	30	125
Proteus	248	3	60
"	253	12,5	125-250
Tbc (Ravenel)		0,03	0,03

T A B L A 4

Tiempo	Suero sanguíneo (γ/ml)		Hígado (γ/g)		10
	10 mg/kg	20 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	
1 ^h	3,75	10,22	30,45	43,20	
2 ^h	12,18	12,02	27,60	39,65	
5 ^h	<0,2	0,31	2,95	15,50	
8 ^h	<0,2	~0,19	<0,05	9,40	



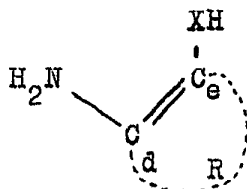
11/174 304831

Riñón (r/g)		Pulmón (r/g)		Bazo (r/g)	
mg/kg	20 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
0,65	1,15	0,45	1,0	0	0,9
1,40	1,55	1,55	1,65	1,1	1,3
<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05



Los productos según el procedimiento pueden utilizarse, aparte de su empleo como antibióticos, como aditivos para forrajes y para la conservación de alimentos.

- 5. Las nuevas composiciones se obtienen al transformar rifamicina O o rifamicina S o sus 16,17,18,19-tetrahidro-derivados con una composición de fórmula III



- 10. donde R y X tienen el significado indicado, y si, caso de desearlo, se oxidan hidroquinonas formadas en sucesión discrecional a quinonas y/o si se reducen quinonas obtenidas a hidroquinonas y/o si se hidrogenan composiciones obtenidas con hidrógeno estimulado catalíticamente a sus 16,17,18,19-tetrahidro-derivados y si eventualmente se transforman las composiciones obtenidas en sus sales correspondientes.
- 15. Según las condiciones de reacción y aislamiento, el producto de reacción deseado se obtiene en forma de quinona (IIb) o hidroquinona (IIa). Ambas formas pueden transformarse fácilmente de una en otra mediante oxidación o reducción y pueden distinguirse así entre ellas. Para la oxidación es suficiente el oxígeno del aire. Para la reducción puede utilizarse, por ejemplo, ácido ascórbico o ditionita.
- 20.

La condensación, partiendo de rifamicina O, se



- efectúa en presencia de un disolvente, preferentemente un disolvente o mezcla de disolvente polar, por ejemplo en cloroformo-metanol-agua, en n-butanol saturado de agua, en dioxano, tetrahidrofurano o sus mezclas con metanol y/o en agua.
5. Se opera a temperatura ambiente o, de ser necesario, a temperatura aumentada (baño de vapor). El punto final de la reacción, es decir el momento del rendimiento máximo, puede comprobarse cromatográficamente con capa delgada. Aparte del producto de condensación deseado, la solución puede contener material de partida reducido, rifamicina B. El producto de condensación puede purificarse por extracción fraccionada, por cromatografía de absorción y/o por cristalización o precipitación de metanol-agua.
10. Para la condensación partiendo de rifamicina S, se disuelven cantidades equivalentes de rifamicina S y de la segunda componente de condensación en disolventes apolares (benzol, tolueno, éter etc.) y se dejan hasta que toda la rifamicina S empleada haya reaccionado, lo cual ocurre normalmente dentro de unos días. El tiempo de reacción puede abreviarse mediante calentamiento. Las soluciones contienen ahora, además del producto de condensación deseado, también aun rifamicina SV y medio de reacción oxidado. Para obtener el producto de condensación deseado puro es conveniente efectuar una purificación previa.
15. A) En los productos de condensación del tipo fenoxazínico ($X = O$ en la fórmula II) se disuelve en metanol o acetona el residuo que se obtiene después de
- 20.
- 25.
- 30.



5. disolver la solución de reacción y después mediante cuidadosa adición de solución de sosa concentrada se precipita el producto de condensación, mientras que la rifamicina SV, y en parte también otras impurezas se mantienen en solución.
10. B) En los productos de condensación del tipo fenacínico (X = NH en la fórmula II) se ha de efectuar - debido a la mayor actividad de estos compuestos - la disolución y precipitación arriba descrita de metanol o acetona con agua. Cuando los productos de condensación enriquecidos por la solución y precipitación no se pueden cristalizar directamente, se puede efectuar a continuación una cromatografía de absorción. Esto será necesario en los casos en los que, debido a asimetría del medio reactor condensado, se forma una mezcla de productos de condensación isómeros y se quiere una separación de los componentes. Como absorbente se puede emplear gel de sílice que se trató previamente con una solución al 1 - 2% de ácido acético en cloroformo. Como eluidor sirve en los cuerpos fenacínicos cloroformo con 1 % de ácido acético glacial, en los cuerpos fenoxacínicos cloroformo con 5 % de acetona. Por regla general es suficiente 1 kg de gel de sílice para la cromatografía de unos 20 g de producto de condensación en bruto.
15. En la mayoría de los casos es ventajoso efectuar, antes de la purificación propiamente dicha, una filtración a través de columnas de gel de sílice. Las mezclas de isómeros de cuerpos fenacínicos, que se forman por la condensación de medios de reacción asi-
- 20.
- 25.
- 30.



métricos del tipo III ($X = NH$) solo se pueden separar mediante repetida cromatografía bajo las condiciones indicadas.

5. Para la purificación de los productos de condensación, partiendo tanto de la rifamicina O, como también partiendo de la rifamicina S, se puede utilizar la cromatografía en columnas de poliamida o la elución de absorción fraccionada en polvo de poliamida según "el procedimiento de Bateh". Las mezclas de la reacción
10. por ejemplo la mezcla de rifamicina FH y rifamicina B, que se forma en la condensación de rifamicina O con diamina fenilénica, se absorben de solución metanólica a la poliamida, y por elución con mezclas de ácido acético glacial-metanol de composición variada se eluyen en forma fraccionada.
- 15.

- Si en la condensación se parte de rifamicina O, puede resultar ventajoso efectuar el enriquecimiento del producto de condensación por un procedimiento extractivo fraccionado, aprovechando la acidez diferente de los productos de reacción. Así, por ejemplo, puede extraerse de una solución de éter acético de la mezcla de reacción producida en la condensación de rifamicina O con o-fenileno-diamina, la o-fenileno-diamina sobrante a p_H 3 - 3,5 y la rifamicina B a p_H 7,3. La fase
20. de éter acético residual contiene entonces rifamicina FH aproximadamente pura. En este procedimiento de enriquecimiento puede ser provechoso reducir a rifamicina B antes de la separación el material de partida, rifamicina O, que pudiera encontrarse todavía en la mezcla
- 25.
30. de reacción, ya que rifamicina B se puede separar mas

30 4831

10



fácilmente del producto de condensación deseado que la rifamicina O. La rifamicina B separada puede recuperarse como material de partida, rifamicina O, mediante oxidación en una fase de reacción aparte.

5. A la inversa, el material de partida reducido -rifamicina B si se parte de rifamicina O, o rifamicina SV si se parte de rifamicina S - existente junto al producto de condensación deseado después de terminada la reacción, puede transformarse por oxidación de nuevo en material de partida - rifamicina O o rifamicina S - en la propia mezcla de reacción, sin separación ni aislamiento. Después de una nueva adición de reactivo, p.e. o-fenileno-diamina, puede seguir su curso la reacción.
10. Para estas transformaciones se emplean convenientemente medios de oxidación, como p.e. persulfato de amonio o ferricianuro potásico, o medios de reducción como p.e. ácido ascórbico. Los procesos de reoxidación pueden realizarse en mezcla heterogénea o en fase homogénea.
15. Por ejemplo, la rifamicina SV, presente junto a la rifamicina PH después de la condensación de rifamicina S con o-fenileno-diamina en solución de benzol, puede transformarse por reoxidación de nuevo en rifamicina S por agitación con una solución acuosa de ferricianuro potásico.
20. La purificación cromatográfica de los productos de condensación puede ser seguida por una cristalización. Como disolventes para la cristalización de los productos de condensación se han acreditado metanol,
- 25.
- 30.



4831

acetona, ácido acético glacial, mezclas acetona-éter, benzol-éter, metanol-agua así como ácido acético al 30 %. Mezclas de cuerpos fenacínicos isómeros forman frecuentemente cristales mixtos.

5. Los productos de condensación de las fórmulas IIIa o IIIb obtenidos de rifamicina O o S según el procedimiento arriba citado, pueden ser reducidos a tetrahidro-derivados, donde las dos combinaciones dobles están saturadas en posición 16,17 y 18,19. Esta reducción puede realizarse mediante hidrógeno estimulado catalíticamente, p.e. por hidrógeno en presencia de un catalizador de paladio, en particular carbón de paladio, o raney-níquel.

15. Las nuevas composiciones pueden tener aplicación, p.e. en forma de preparados farmacéuticos. Estos contienen las composiciones en mezcla con un vehículo farmacéutico orgánico o inorgánico, sólido o líquido, apropiado para aplicación enteral, topical o parenteral. Para la formación de este vehículo entran en consideración substancias que no reaccionan con las nuevas composiciones, como p.e. agua, gelatina, lactosa, almidón, alcohol estearílico, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, goma, glicol propilénico, glicoles polialquilénicos,
20. vaselina, colestearina u otros vehículos medicinales conocidos. Los preparados farmacéuticos pueden presentarse, p.e. como tabletas, grágeas, pomadas, cremas, cápsulas o en estado líquido como soluciones, suspensiones o emulsiones.

30. Eventualmente están esterilizados y/o contienen



substancias auxiliares, como medios de conservación, estabilización, humectación o emulsión, mediadores de solución o sales para cambiar la presión osmótica o amortiguadores. También pueden contener otras sustancias de valor terapéutico. Los preparados se obtienen según métodos usuales.

5. Las nuevas combinaciones pueden utilizarse también en la veterinaria, p.e. en una de las formas arriba indicadas.

10. La invención se describe en los ejemplos siguientes. Las temperaturas se indican en grados centígrados.

Los cromatogramas de capa delgada mencionados en los ejemplos 1 - 9 se han realizado con sílice gelatinosa en el sistema cloroformo-acetona (15:1). Antes del revelado, las placas se exponen durante 15 segundos a vapores de ácido acético.

15. Los cromatogramas de capa delgada mencionados en los ejemplos 10 - 27 y 30 - 33 se han realizado con sílice gelatinosa en los sistemas A o B.

20. Sistema A: Cloroformo-metanol 100:3, placa impregnada con ácido cítrico (52 ml de solución acuosa de ácido cítrico al 5% por 25 g de sílice gelatinosa).

Sistema B: cloroformo-acetona 5:1.

Los valores R_f se refieren al valor R_f de Rifamicina $O = 1$, designándose como $R_{f_{RO}}$.

25. La constitución de las composiciones contenidas en los ejemplos se refleja en cada ejemplo mediante la indicación de la fórmula que puede verse en el resumen de las páginas 4 y 5.

30.

EJEMPLO 1



- Se mezcla una solución de 1,52 g rifamicina O en 150 ml de cloroformo con una solución de 0,22 g de fenileno-diamina en 200 ml de metanol, con lo cual la mezcla adquiere rápidamente una coloración verde oscuro. Se deja durante 30 minutos a temperatura ambiente y se evapora a continuación en vacío a 20°. El residuo se disuelve en cloroformo y la solución se filtra por una corta columna de sílice gelatinosa. Después de evaporar el cloroformo, se obtiene un polvo verde, que se purifica por precipitación repetida de metanol-agua (0,84 g). El polvo obtenido se hierve durante 30 minutos en solución de metanol.
- 5.
- 10.

- Después se evapora en vacío y se cromatografía el residuo en sílice gelatinosa con el medio cloroformo-acetona (10:1), conteniendo 5% de ácido acético glacial. Se recogen las partes del producto eluido, cuyo color verde se transforma en rojo claro con lejía. Después de la evaporación, queda un producto de condensación cromatográficamente puro de rifamicina O y o-fenileno-diamina, rifamicina PH. Rendimiento 0,68 g $R_{FRO} = 0,28$. Fórmula 1.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 2

- 1,52 g de rifamicina O y 0,29 g de 4-cloro-o-fenileno-diamina se disuelven en 400 ml cloroformo - metanol (1:1). Se hierve brevemente en baño de agua y se evapora en vacío la solución de un color verde oscuro profundo hasta obtener un producto seco. El residuo se purifica en sílice gelatinosa y por precipitación de metanol-agua, como descrito en el ejemplo 1. El producto de condensación obtenido de rifa-
- 25.
- 30.

4831



micina O y 4-cloro-o-fenileno-diamina es un polvo amorfo verde, que es uniforme en el aspecto cromatográfico de capa delgada. $Rf_{RO} = 1,1$. Fórmula 2.

EJEMPLO 3

5. Se disuelven 3,0 g de rifamicina O en 500 ml de metanol, se añaden 0,5 g de 2,3-diaminopiridina y se deja durante 36 horas a temperatura ambiente. Después se evapora en vacío la mezcla de coloración oscura y el residuo se purifica mediante cromatografía repetida con sílice gelatinosa. Con el medio cloroformo-acetona (10:1) se obtienen por de pronto eluados de color verde-marrón, después eluados de color azul puro. Después del tratamiento de todos los eluados azules, quedan 1,50 g de un producto de condensación de rifamicina O y 2,3-diaminopiridina, que se cristaliza de metanol acuoso al 80%, Cristales de color negro-violeta, que se disuelven con color azul en disolventes orgánicos; rendimiento ~50%. Con álcali, la sustancia se tiñe de rojo. F. 175° (descomposición) $Rf_{RO} = 0,30$. Fórmula 3.
- 10.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 4

- 0,76 g de rifamicina O y 0,15 g de 4,5-diamino-2-tiouracila se disuelven en 100 ml de cloroformo, se mezclan con 300 ml de metanol y se dejan durante 3 días a temperatura ambiente. Después se evapora la solución en vacío y se cromatografía el residuo en sílice gelatinosa. Con cloroformo-acetona (10:1) se eluye material amarillo y rojizo-marrón. A continuación se puede eluir con cloroformo-acetona (5:1) un producto de condensación verdoso-azul puro de rifamicina O y 4,5-diamino-2-
- 25.
- 30.



tiouracila. Rendimiento 390 mg (50%), $Rf_{RO} = 0,17$.

Fórmula 4.

EJEMPLO 5

5. Una solución de 5,4 g de rifamicina O en 150 ml de cloroformo se mezcla con una solución de 0,8 g de o-aminofenol en 200 ml de metanol acuoso al 75 % y se hierve bajo reflujo en el baño de agua, adquiriendo la mezcla de reacción rápidamente un color violeta. Después de 15 minutos de ebullición se evapora en vacío la solución que entretanto ha adquirido un color del vino. Se disuelve el residuo en éter se filtra y agita la solución etérea repetidamente con solución acuosa de sosa y finalmente con solución de cloruro sódico. Después de secar encima de sulfato de sodio y evaporar en solución etérea queda un residuo de 3,1 g. que aparte de impurezas contiene dos productos principales. A efectos de separación la mezcla se cromatografía en sílice gelatinosa con cloroformo. Después de fracciones previas de colorido amarillo se eluye un producto violeta. Se recogen todas, las fracciones de colorido violeta y a continuación se cromatografía aún repetidamente, el objeto de separar todas las trazas de sustancias amarillas y rojas que se mantienen. Finalmente se precipita dos veces de metanol-agua y se obtiene con ello un polvo violeta uniforme cromatográficamente en capa delgada. $Rf_{RO} = 1,1$. En solución acuosa de metanol, y después de algún reposo y más rápidamente con una breve ebullición la sustancia se transforma en el segundo producto principal de colorido rojo de la mezcla arriba des-

10.

15.

20.

25.

30.



4831

crita.

5. El segundo producto principal también se obtiene si el arriba citado residuo (3,1 g) se disuelve en metanol acuoso al 50% y se deja reposar la solución durante 12 horas a temperatura ambiente. Se diluye fuertemente con solución de cloruro sódico y se extrae agotando, con éter.

10. Una cromatografía duplicada del extracto en 100 g de sílice gelatinosa en cada caso (Merck, medio cloroformo-acetona (5%)) conduce a un producto rojo. Se disuelve éste en 30 ml de metanol (solución roja) y se introduce en la solución ácido ascórbico sobrante (cambio de color hacia marrón). Añadiendo lentamente a gotas mas de 50 ml de agua, se separa la forma hidroquinoidal del producto de condensación en cristales de negro brillante. Todas las impurezas se encuentran en la lejía madre de color marrón rojizo. Los cristales son puros en el aspecto cromatográfico de capa delgada $R_{fRO} = 0,61$. Rendimiento: 2,4 g (45%). Punto de fusión bajo descomposición (hinchado): 180°. La composición tiene la fórmula 10'.

25. Para la producción de la sal de sodio se decantan los cristales con el menor agua posible y se mezclan bajo fuerte agitación gota a gota con una cantidad equivalente de 1-n. lejía de sosa cáustica. Mediante un control pH potenciométrico se determina la velocidad de goteo de tal forma, que se evita una reacción fuertemente alcalina de la mezcla.

30. Terminada la adición de lejía, todos los cristales están disueltos. Se filtra la solución color

3. 4831



vino y se aísla la sal de sodio disuelta mediante secado por congelación.

EJEMPLO 6

5. 3,04 g de rifamicina O y 0,58 g de 4-cloro-2-amino-fenol se disuelven en 400 ml de cloroformo-metanol (1:1) y se hierve la solución durante 15 minutos en baño de agua. La solución, en un principio violeta, mas tarde de color rojo vino, se evapora, el residuo se disuelve en éter y la solución etérea se
10. agita repetidamente con solución de sosa y finalmente con solución de cloruro sódico. Después de secar sobre sulfato de sodio y evaporar la solución etérea, se cromatografía el residuo repetidamente en sílice gelatinosa (medio cloroformo-acetona (15:1)), con lo
15. cual se consigue una sustancia violeta y otra roja libre de cualquier impureza. En el caso de que impurezas de colorido amarillo resulten difíciles de separar, también se llega a productos puros mediante precipitación de sustancias fuertemente enriquecidas de metanol agua. El producto violeta se produce con mal rendimiento. Tiene el valor $Rf_{RO} = 1,1$. El
20. producto de condensación de color rojo se produce con un rendimiento del 55 - 60 %. Tiene el valor $Rf_{RO} = 0,64$. Al hervirse en metanol acuoso, el producto violeta se transforma casi cuantitativamente en el
25. producto rojo. Este corresponde a la fórmula 11.

EJEMPLO 7

30. 1,52 g de rifamicina O con 0,31 g de 4-nitro-2-aminofenol se disuelven en cloroformo, se mezclan con 300 ml de metanol y se hierven durante 30 minutos



en baño de vapor. A continuación se evapora y se cromatografía el residuo con cloroformo-acetona (10:1) en sílice gelatinosa.

5. Después de separar partes de color marrón y amarillo, se obtiene un material de color marrón rojizo, que ya está fuertemente enriquecido.

10. Al precipitarlo de metanol-agua se eliminan las últimas impurezas y se obtiene un polvo de color rojo de óxido uniforme en el aspecto cromatográfico de capa delgada (sílice gelatinosa, cloroformo-acetona (15:1)) $Rf_{RO} = 1,0$. Rendimiento: 50 - 60%. El producto corresponde a la fórmula 12.

EJEMPLO 8

15. 1,52 g de rifamicina O y 0,38 g de 2-amino-6-cloro-5-nitrofenol se disuelven en 50 ml de cloroformo se añaden 300 ml de metanol y se hierve brevemente la solución en baño de agua. La solución, que se tinte inmediatamente de un marrón-rojo oscuro, se evapora y se cromatografía el residuo rápidamente en sílice gelatinosa con cloroformo-acetona (10:1). Debido a que con esta cromatografía se descompone parcialmente el producto de reacción, se limita uno a un enriquecimiento fuerte del producto de reacción de color rojo de óxido. Mediante una precipitación triple de metanol-agua, este producto se obtiene finalmente como polvo rojo en forma cromatográficamente pura. $Rf_{RO} = 1,0$. Rendimiento 60%. Este producto corresponde a la fórmula 13.
- 20.
- 25.

EJEMPLO 9

30. Una solución de 1,52 g de rifamicina O y 0,31 g



5. de ácido 3-hidroxi-antranílico se hierve durante una hora en 300 ml de cloroformo-metanol (1:1). Después se evapora y se cromatografía el residuo repetidamente en sílice gelatinosa con cloroformo-acetona-ácido acético glacial (20:1:1). Se aislan 0,780 g de producto de condensación como sustancia polar de color marrón ($\sim 50\%$ rendimiento). $Rf_{RO} = 0,42$. El producto corresponde a la fórmula 14.

EJEMPLO 10

10. Se disuelven 7,54 g de rifamicina O juntamente con 1,59 g de 1-amino-2-naftol en 70 ml de cloroformo se añaden 400 ml de metanol y se deja reposar la solución, que rápidamente adquiere un color oscuro, a temperatura ambiente hasta que toda la rifamicina O
15. empleada haya reaccionado (cromatograma de capa delgada) Después se restringe fuertemente en vacío y se deja reposar. Después de algún tiempo se cristalizan de la solución cristales de negro azulado brillantes del producto de condensación, que después de una recristalización de metanol a $210 - 212^{\circ}$ se funden. Rendimiento: 3,7 g. $Rf_{RO} = 0,91$ (sistema B). El producto corresponde a la fórmula 15.
- 20.

EJEMPLO 11

25. Se disuelven 7,54 g de rifamicina O y 1,11 g de 3-amino-2-hidroxitolueno con 70 ml de cloroformo, se añaden 400 ml de metanol y se deja reposar la mezcla a temperatura ambiente hasta que toda la rifamicina O haya reaccionado (cromatograma de capa delgada). Después se evapora, se disuelve el residuo en metanol
- 30, y se deja reposar otra vez, hasta que el producto de



- condensación de color violeta que se produce en primer lugar se haya transformado totalmente en un producto rojo. Ahora se precipita el producto de condensación con solución concentrada de carbonato sódico, se filtra la precipitación, se lava con agua y se cristaliza finalmente de metanol. Después de una re-cristalización repetida de metanol se obtiene 3,5 g de producto condensado en cristales oscuros de marrón rojizo, que se funden a 172 - 174°. $Rf_{RO} = 0,89$ (sistema B). Fórmula 16.
- 5.
- 10.

- Mediante reducción con ácido ascórbico (véase ejemplo 5) puede transformarse la composición en solución alcohólica en su hidroquinona, (fórmula 16') que se obtiene de metanol en cristales de color negro violeta de F. 183 - 184°.
- 15.

EJEMPLO 12

- Se disuelven 7,54 g de rifamicina O y 1,11 g de 4-amino-3-hidroxitolueno en 70 ml de cloroformo. La solución se mezcla con 400 ml de metanol y la mezcla se deja reposar a temperatura ambiente hasta que toda la rifamicina O se haya transformado. Después se evapora, se disuelve el residuo en metanol y se deja reposar otra vez, hasta que el producto producido en primer lugar se haya transformado completamente en un producto de condensación de color rojo. Después se precipita el producto rojo con solución de sosa concentrada y se cromatografía la precipitación para su purificación en 500 g de sílice gelatinosa con el medio cloroformo-metanol (20:1). El producto de condensación de color rojo cristaliza de metanol acuoso en
- 20.
- 25.
- 30.



placas romboidales de rojo oscuro de F. 185 - 187.
 $Rf_{RO} = 0,98$ (sistema B). Rendimiento 3,0 g. Fórmula
17.

5. La sustancia puede transformarse con ácido ascorbínico, en la forma descrita en el ejemplo 5, en su hidroquinona (fórmula 17').

EJEMPLO 13

10. De 7,54 g de rifamicina O y 1,11 g de 3-amino-4-hidroxitolueno se obtienen según el procedimiento descrito en el ejemplo 12 2,80 g de producto de condensación como sustancia roja amorfa. $Rf_{RO} = 0,98$ (sistema B). Fórmula 18.

15. La sustancia puede transformarse con ácido ascorbínico, en la forma descrita en el ejemplo 5, en su hidroquinona (fórmula 18').

EJEMPLO 14

20. 7,54 g de rifamicina O y 1,10 g de 3,4-diaminotolueno se disuelven juntamente en 70 ml de cloroformo. Se mezcla la solución con 400 ml de metanol y se deja reposar la mezcla a temperatura ambiente hasta que, toda la rifamicina O se haya transformado. Después se evapora en vacío, se disuelve el residuo en metanol y se deja reposar otra vez, hasta que el material de color verde sucio producido en primer lugar se haya transformado en la medida posible en un producto de condensación de color alcali rojo. Este producto de condensación se precipita repetidamente de solución de metanol con solución de cloruro sódico, y
25. el material de tal forma enriquecido se purifica mediante cromatografía repetida en sílice gelatinosa
- 30.



tratada previamente con 1% de ácido acético con el medio cloroformo (conteniendo 1% de ácido acético), al cual se le puede añadir en el transcurso de la cromatografía paulatinamente algo de acetona o metanol. Se obtienen dos productos de condensación isómeros, de color verde oscuro, a los que corresponde la fórmula 5.

5.

La cantidad principal con el valor $Rf_{RO} = 0,42$ (sistema A) cristaliza de ácido acético al 80% en láminas cristalinas brillantes de color verde oscuro, que se funden a 199 - 201^o, Rendimiento 1,40 g.

10.

El segundo isómero del valor $Rf_{RO} = 0,51$ (sistema A) también se obtiene en forma pura con este procedimiento, F. 192 - 193^o.

EJEMPLO 15

15.

7,54 g de rifamicina O y 1,10 g de 2,3-diaminotolueno se disuelven juntamente en 70 ml de cloroformo. Se añade a la solución 400 ml de metanol y se deja reposar la mezcla a temperatura ambiente hasta que toda la rifamicina O empleada se haya transformado. Después se da

20.

un tratamiento como descrito en el ejemplo 14. Después de una cromatografía cuidadosa se obtiene un producto de condensación, que se recrystaliza de metanol, metanol-agua y acetona. Cristales verde oscuro de F. 190 - 191^o. Rendimiento 2,7 g. $Rf_{RO} = 0,51$ (sistema A). Fórmula 6.

25.

El segundo isómero, que también se obtiene en forma pura en la cromatografía y que está contenido en las lejías madres después de la cristalización de la substancia con F. 190 - 191^o, ostenta el $Rf_{RO} = 0,64$ (sistema A).

30.



EJEMPLO 16

De 7,54 g de rifamicina O y 1,24 g de 2,3-diaminoetilbenceno se obtiene según el procedimiento descrito en el ejemplo 14 una mezcla de productos de condensación isómeros, la cual, como descrito en el ejemplo 14, puede dividirse por cromatografía en sus componentes. El isómero del $Rf_{RO} = 0,53$ (sistema A) que se produce como producto principal, cristaliza de metanol y acetona. Se obtienen 2,5 g de cristales ver
5. de oscuro, que funden a 180 - 181°. Fórmula 7.
10.

En la lejía madre, después de la cristalización del isómero de F. 180 - 181°, está contenido el segundo producto de condensación. El producto que ha de producirse en forma pura por cromatografía en la manera descrita ostenta el $Rf_{RO} = 0,73$ (sistema A).
15.

EJEMPLO 17

De 7,54 g de rifamicina O y 1,36 g de 4,5-diamino-1,2-dimetilobenceno se obtiene según el procedimiento descrito en ejemplo 14 un producto de condensación verde oscuro, que se purifica por precipitación y cromatografía. Rendimiento 2,8 g. $Rf_{RO} = 0,43$ (sistema A) Fórmula 8.
20.

EJEMPLO 18

34,8 g de rifamicina S juntamente con 5,4 g de o-fenilenodiamina se disuelven en 750 ml de benceno. La solución se deja reposar hasta que ya no se pueda demostrar la presencia de rifamicina S en la mezcla de reacción por medio de cromatografía de capa delgada. Esto ocurre después de algunos días. Después se evapora la solución de reacción de benceno y el resi-
25.
30.

304831 10



- duo recibe una purificación previa mediante precipitación repetida de metanol con agua. Después de una cromatografía doble en 300 y 1000 g de sílice gelatinosa resp., (tratada previamente con una solución de cloroformo del 1% de ácido acético) con el medio cloroformo (conteniendo 1% de ácido acético glacial) se obtienen
5. 15 g de producto de condensación, el cual cristaliza lentamente de ácido acético al 80%. El producto puro cromatográficamente forma cristales pequeños de color verde oscuro, que funden a 181 - 183°. $Rf_{RO} = 0,53$ (sistema A). Fórmula 1.
- 10.

EJEMPLO 19

- 34,8 g de rifamicina S juntamente con 6,1 g de 3,4-diaminotolueno se disuelven en 750 ml de benceno.
15. La solución se deja reposar a temperatura ambiente hasta que toda la rifamicina S haya reaccionado (cromatograma de capa delgada). Después se evapora la solución de reacción y el residuo recibe una purificación previa basta mediante precipitación repetida de metanol con agua. Cromatografía repetida en sílice gelatinosa, tratada previamente con una solución de cloroformo del 1% de ácido acético, con el medio cloroformo (conteniendo 1% de ácido acético glacial) suministra 9 g de un producto de condensación puro del valor $Rf_{RO} = 0,42$ (sistema A), el cual cristaliza de ácido acético al 80% en láminas brillantes de color verde oscuro y funde a 199 - 201°. Fórmula 5.
- 20.
- 25.

- En las partes que se desplazan más rápidamente en el cromatograma están contenidos 4,5 g del producto de condensación isómero del valor $Rf_{RO} = 0,51$ (sistema A) en forma pura. Fórmula 5.
- 30.

30 4831



EJEMPLO 20

5. Una solución de 34,8 g de rifamicina S y 6,1 g de 2,3-diaminotolueno en 750 ml de benceno se deja reposar hasta la reacción completa a temperatura ambiente. Después se evapora la solución, se precipita el residuo repetidamente de metanol-agua y se cromatografía el producto de reacción previamente purificado de tal manera en la forma descrita en ejemplo 18. Ya una sola cromatografía en 1000 g de sílice gelatinosa suministra un producto cristalizado, del cual se puede obtener por cristalización repetida (alternativamente) de metanol, metanol diluido y acetona el isómero cristalizado puro con $Rf_{RO} = 0,51$ en el sistema A. Placas romboides verde oscuro, que funden a 190 - 191°. Fórmula 6.

10. Las lejías madres dan después de la evaporación una mezcla de los dos productos de condensación isómeros, en la cual el segundo isómero del $Rf_{RO} = 0,64$ (sistema A) está fuertemente enriquecido. Este segundo isómero puede obtenerse en forma isómera pura por una cromatografía cuidadosa, como arriba descrita. Fórmula 6.

EJEMPLO 21

15. De la reacción de 34,8 g de rifamicina S y 6,8 g de 2,3-diaminoetilbenceno se puede obtener en un procedimiento similar al descrito en los ejemplos 18 a 20 un producto de condensación, del cual se puede obtener por cristalización repetida (alternativamente) de metanol, metanol diluido y acetona el isómero cristalizado puro del $Rf_{RO} = 0,53$ (sistema A). Cristales verde oscuro de F. 190 - 191°. Rendimiento 6 g. Fórmula 6.



30 4831

la 7.

5. La lejía madre, después de la cristalización del isómero arriba citado, deja después de la evaporación 6,5 g de material cristalino, que se compone aproximadamente a partes iguales de los dos productos de condensación isómeros. Por cromatografía en la forma descrita se puede aislar el isómero producido en menor cantidad del $Rf_{RO} = 0,73$ (sistema A). Fórmula 7.

EJEMPLO 22

10. Una solución de 3,48 g de rifamicina S y 0,79 g de 1,2-diaminonaftalina en 100 ml de benceno se deja reposar a temperatura ambiente hasta la reacción completa de la rifamicina S empleada. Después de evaporar la solución, se precipita repetidamente el residuo de metanol-agua y se cromatografía el producto de reacción previamente purificado de tal manera, en la forma descrita en los ejemplos 18 - 21 (sílice gelatinosa, cloroformo con 1% de ácido acético). Con cromatografía repetida y cuidadosa se puede obtener en forma cromatográficamente pura el isómero ($Rf_{RO} = 0,39$ en sistema A) que se produce en cantidad mayor y se puede cristalizar de metanol y metanol diluido. Cristales tetraédricos verde oscuro de F. 205 - 210°. Rendimiento 0,35 g.

25.

EJEMPLO 23

30. Una solución de 3,48 g de rifamicina S y 0,68 g de 4,5-diamino-1,2-dimetilobenceno en 100 ml de benceno se deja reposar a temperatura ambiente hasta la reacción completa de la rifamicina S empleada. Después se evapora la solución, se precipita repetidamente el



3 1000

- residuo de metanol-agua y se cromatografía el producto de reacción previamente purificado de tal manera, en la forma descrita (sílice gelatinosa, cloroformo con 1% de ácido acético). Se obtiene el producto de condensación verde oscuro del $Rf_{RO} = 0,43$ (sistema A) Fórmula 8.
- 5.

EJEMPLO 24

- 34,8 g de rifamicina S y 5,45 g de o-aminofenol se disuelven juntamente en 750 ml de benceno. Se deja reposar la solución a temperatura ambiente hasta que haya reaccionado toda la rifamicina S empleada. Después se evapora hasta secar, se disuelve el residuo en metanol y se deja reposar otra vez, hasta que el producto de condensación violeta producido en primer lugar se ha transformado plenamente en un producto rojo. Después se precipita el producto de condensación rojo mediante adición de solución de sosa a la solución de metanol de la mezcla de reacción, se lava la precipitación con agua y se desecha el filtrado, en el cual se encuentra la mayor parte de las impurezas. Se purifica el producto de condensación rojo por cromatografía en 1000 g de sílice gelatinosa con el medio cloroformo-acetona 20:1 aumentando la cantidad de acetona paulatinamente hasta una relación de 5:1.
- 10.
- 15.
- 20.

- De esta forma se obtienen 16 g del producto de condensación rojo amorfo ($Rf_{RO} = 0,98$, sistema B), fórmula 10. Este se transforma en la forma ya descrita (ejemplo 5) por reducción con ácido ascórbico en la hidroquinona cristalizada. La hidroquinona cristaliza de metanol en cristales brillantes de color marrón ne-
- 25.
- 30.

3 483 1,000



gro de F. 180°. Fórmula 10'.

5. 0,211 g del producto de condensación rojo del $Rf_{RO} = 0,98$ se hidrogenan en 40 ml de alcohol con 0,6 g de catalizador de paladio de carbón del 10%. Se interrumpe la hidrogenización después de la absorción de 17,9 ml de hidrógeno, se separa filtrando del catalizador y se diluye el filtrado un poco con agua. Ahora se hace pasar aire por la solución hasta que toda la hidroquinona haya oxidado a quinona. La quinona
10. se precipita con agua y se cristaliza repetidamente de acetona. La composición pura representa el 16,17, 18,19-tetrahidro-derivado de la quinona arriba citada del $Rf_{RO} = 0,98$. Cristaliza en prismas de rojo ladrillo de F. 260°. Rendimiento 0,150 g $Rf_{RO} = 0,73$ (sistema B).
- 15.

EJEMPLO 25

20. Una solución de 34,8 g de rifamicina S y 6,15 g de 3-amino-2-hidroxitolueno en 750 ml de benceno se deja reposar a temperatura ambiente hasta que haya reaccionado toda la rifamicina S empleada. Después se evapora, se disuelve el residuo en metanol y se precipitan con solución de sosa los dos productos de condensación producidos en la reacción. El material precipitado se filtra, se lava con agua y se disuelve de nuevo en metanol. Durante el reposo de la solución de
25. metanol, el producto de condensación violeta producido en primer lugar se va transformando en el producto de condensación rojo de mayor estabilidad, el que se separa lentamente de metanol en forma de cristales
30. grandes, bastos y de color marrón rojizo. Para una



purificación completa se cristaliza todavía por cuatro veces de metanol. Se obtienen 19 g de cristales de F 172 - 174°. $Rf_{RO} = 0,89$ (sistema B).

La composición puede transformarse en su hidroquinona de la siguiente manera:

5.

El producto de condensación cristalino se disuelve a 60° en una cantidad mínima necesaria de etanol, se deja enfriar algo y se añade luego gota a gota una solución acuoso-alcohólica de ácido ascórbínico (exceso). Después de poco tiempo se separan cristales de la hidroquinona, que pueden recrystalizarse de metanol. La hidroquinona funde a 183-184°.

10.

EJEMPLO 26

Una solución de 11,60 g de rifamicina S y 2,05 g de 4-amino-3-hidroxitolueno en 200 ml de benceno se deja reposar a temperatura ambiente hasta que toda la rifamicina S empleada haya reaccionado. Después se evapora la solución, se disuelve el residuo en metanol y se deja reposar otra vez hasta que el producto de condensación violeta producido en primer lugar se haya transformado totalmente en el producto de condensación rojo mas estable. El producto rojo se precipita en solución de sosa de su solución de metanol, se filtra, se lava con agua y para una purificación completa se cromatografía en 400 g de sílice gelatinosa (medio cloroformo-acetona 20:1). Se obtienen 4 g de un producto de condensación rojo, $Rf_{RO} = 0,98$ (sistema B). (Fórmula 17). El producto de condensación rojo puede transformarse en su hidroquinona mediante reducción con ácido ascórbínico en la forma descrita en ejemplo 5

15.

20.

25.

30.

(Fórmula 17').

30 4831



EJEMPLO 27

5. Con procedimiento análogo al descrito en ejemplo 26, se obtienen de 11,60 g de rifamicina S y 2,05 g de 3-amino-4-hidroxitolueno 4,5 g de un producto de condensación rojo del $Rf_{RO} = 0,98$ (sistema B). (Fórmula 18). Con ácido ascórbico se forma del mismo la hidroquinona correspondiente (Fórmula 18').

EJEMPLO 28

10. 40 g de rifamicina S (título espectrofotométrico 92%) y 6,2 g de o-fenilendiamina recristalizado de alcohol absoluto se disuelven en 4 lt. de éter secado sobre sulfato sódico y se conserva la solución durante 64 horas a temperatura ambiente. La masa cristalina (29,7 g) formada después de este tiempo se filtra por succión. En el filtrado, y mediante el espectro ultravioleta y de absorción, solamente pueden comprobarse cantidades reducidas del producto de condensación rifamicina PH al lado de la rifamicina SV. El
15. filtrado se desecha y el residuo de la succión, que según análisis polarográfico tiene un contenido de 58 % de rifamicina PH, se disuelve en 6,6 lt. de éter acético y se extrae en el embudo de agitación por 18 veces con 4 lt. de amortiguador de fosfato pH 6,24. Du-
20. rante estas extracciones aún se añaden en total 2,4 lt. de éter acético. Antes de las dos últimas extracciones aún se añade 1,5 lt. de hexano, para separar completamente la rifamicina SV de la fase orgánica. Los extractos se controlan analíticamente tanto por espec-
25. trofotometría como por cromatograma de capa delgada.
30.

30 4831



Terminada la extracción, se obtiene un volumen de 8,2 lt. de solución de éter acético conteniendo según análisis espectrofotométrico 15,3 g de rifamicina PH (fórmula 1). Ahora se mezcla esta solución con 8 ml de metilato sódico con un contenido de 8,9% de sodio y 2,5 lt de ligroina, La solución se concentra en vacío a aprox. 1 lt y se obtiene así un primer producto cristalizado de la sal sódica de la rifamicina PH (13 g). De las lejías madres se obtienen todavía dos productos cristalizados mas. El análisis de las distintas fracciones dió el siguiente título en rifamicina PH libre:

5. Primer producto cristalizado; 13 g; título polarográfico 84,4%, título espectrofotométrico 91,3%.

10. Segundo producto cristalizado; 1,4 g; título polarográfico 86,4%.

15. Tercer producto cristalizado; 1,4 g; título polarográfico 44,4%.

20. Los datos espectrofotométricos y polarográficos para rifamicina PH y rifamicina SV son los siguientes:

	espectro ultravioleta en amortiguador de fosfato ph		Polarografía en MeOH al 50% + amortiguador de acetato al 50% ph
	7.38	1%	5,4
	mμ	E	
		1 cm.	
Rifamicina SV	314	308	potencial anódico de semi-onda
	445	204	E 1/2 = + 0,03 V
Rifamicina PH	343	331	potencial catódico de semi-onda
	515-520	90	E 1/2 = - 0,33 V

30 4831
EJEMPLO 29



5. En una retorta de 4 golletes provista de un agitador de vidrio, un refrigerador de reflujo, un termómetro y un tubo de entrada de gas se introducen 3,5 lt de metanol analíticamente puro, en los que se suspenden 100 g de rifamicina O recristalizada de metanol (título espectrofotométrico por lo menos 95% y contenido de rifamicina O 3% como máximo). Agitando, la suspensión se enfría desde fuera con hielo hasta que la temperatura interior alcance 0 - 2°.

10. Al mismo tiempo, y con el fin de una extracción de aire completa del medio de solución, se deja pasar durante 40 - 45 minutos una corriente de nitrógeno de fuerza moderada. Agitando constantemente y refrigerando se añaden paulatinamente 42 ml de una solución metanólica de metilato sódico con 7,3% de sodio (la cantidad calculada al 100 por 100 para rifamicina O). Se deja pasar nitrógeno durante otros 15 minutos mas. Después se recubre la retorta con papel negro y se mezcla como abajo indicado con 15 g de o-fenilenodiamina recristalizada (5% de exceso sobre la cantidad calculada teóricamente). La mezcla se sigue agitando durante otros 50 minutos, haciendo pasar constantemente nitrógeno y refrigerando. Después se comprueba cromatográficamente si la reacción ha terminado, para lo cual se utilizan placas hechas con sílice gelatinosa G, según el método de Stahl, y se emplea como medio disolvente acetona (rifamicina O produce una mancha gris amarillenta y tienen un valor RF de 0,55; rifamicina PH tiene un valor RF de 0,65 y produce una mancha violeta alargada;



rifamicina B, finalmente, tiene un valor RF entre 0 y 0,4 y produce una mancha amarilla intensiva alargada).

5. Si la rifamicina O no se ha transformado totalmente, entonces hay que prolongar el tiempo de reacción. Después de terminada la reacción, y para reducir a rifamicina B las trazas de rifamicina O que pudiera haber, se vierte la solución sobre 15 lt de agua conteniendo 50 g de sodio.
10. Después de breve agitación (3-5 minutos) se acidula con ácido clorhídrico al 10% hasta $pH_3 - 3,5$ y se extrae con una sola porción de 12 lt éter acético purificado sobre pentóxido fosfórico (calentado durante 2 horas sobre 2% de pentóxido fosfórico en el reflujo). Se agita durante aprox. 20 - 25 minutos y se desecha entonces la fase acuosa ligeramente coloreada.
15. La fase orgánica se lava por 2 veces seguidas con 2 y 0,5 lt de agua acidulada ($pH_{2,5-3}$) para eliminar la o-fenilendiamina eventualmente aún existente.
20. A continuación se trata la fase orgánica una vez con 5 y otra con 2,5 lt de amortiguador de fosfato $pH_{7,3}$ (1/15 molar). Si un examen cromatográfico de la capa orgánica como arriba descrita demuestra la presencia de rifamicina B, se efectúa todavía una tercera extracción con un litro del amortiguador mencionado.
25. De los extractos acuosos reunidos puede recuperarse la rifamicina B.
30. La fase orgánica se seca ^{sobre} ahora/sulfato sódico, se filtra y se concentra en vacío a 30 - 35° hasta un volumen de 300 - 400 ml. El residuo se deja reposar 24

3. 4831



horas a 5 - 10^o, con lo cual se separa una masa cristalina. Esta se filtra por succión, se lava dos veces con poco de éter acético purificado según se describe mas arriba y se seca a 40^o en vacío.

5. Se obtienen así 35,5 g de rifamicina PH cristalizada de verde oscuro con un título espectrofotométrico entre 90 y 95% (rendimiento 32-36%).

Producción de la sal sódica

10. 35,5 g de rifamicina PH del título 92,5% (equivalente a 32,8 g de rifamicina PH 100%) se disuelven en 160 ml de metanol. A una temperatura no superior a 20^o se mezcla esta solución con 15,3 ml de una solución metanólica de metilato sódico con un título de sodio de 6,5% (equivalente a un exceso del 3% sobre la
15. cantidad calculada). La solución de la sal sódica así obtenida se diluye con 1,3 lt de éter acético y la mezcla se concentra a aprox. 200 - 250 ml; el residuo entonces se mezcla con 0,5 lt de éter acético y 0,4 lt de ciclohexano y luego se evapora a aprox. 200 ml. Ya
20. durante la evaporación se precipita la sal sódica. Para la separación completa se deja reposar 12 horas a 4 -5^o Se succiona la sal de color violeta y se lava exhaustivamente con n-hexano. Entonces el producto se seca durante 48 horas a 35-40^o en vacío.

25. Rendimiento: 31,4 g; título espectrofotométrico (referido al ácido): aprox. 90%. Rendimiento referido al ácido: aprox. 85%.

La sal se disuelve en agua hasta una concentración de 15-20%; la solución tiene color rojo intenso.

30. La o-fenilendiamina empleada se produce como

3 4831



- sigue: 33 g de o-fenilenodiamina técnica se disuelven en 115 - 120 ml de agua en ebullición, que contiene 1 g de hidrosulfito sódico. Se mezcla con carbón animal en proporción de un 10% de la o-fenilenodiamina empleada, se filtra, se enfría con hielo en la oscuridad y se succiona el producto cristalino blanco después de 2 - 3 horas. Se lava con un poco de agua fría y se seca durante 24 horas en vacío y en la oscuridad a 40°. Se obtienen 28 g del producto puro, que funde a 100 - 101°. Esta purificación no deberá efectuarse anteriormente a las 20 - 30 horas antes del empleo del producto.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 30

- Se mezcla una solución de 44,0 g de rifamicina O en 150 ml de cloroformo y 1000 ml de metanol con una solución de 6,25 g de o-fenilenodiamina en 1000 ml de metanol. Esta mezcla se deja reposar cinco días. Después de este tiempo ya no contiene rifamicina O, pero sí rifamicina PH y rifamicina B. Se concentra la mezcla en vacío a aprox. 200 ml y se cromatografía en 1 kg de un polvo poliamida que se obtiene en el comercio bajo la denominación Ultramid BM 228. La rifamicina B se retiene como zona amarilla y la rifamicina PH como zona roja. Se lava con metanol, hasta que el producto eluido quede casi sin color. Con metanol, conteniendo 3% de ácido acético, se eluye ahora primeramente rifamicina PH. A continuación se puede recuperar mediante elusión con metanol que contiene 30% de ácido acético, la rifamicina B que ha quedado en forma de banda amarilla en la columna. El producto eluido con contenido
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



- de rifamicina PH de color verde, se evapora en vacío hasta secarlo. Para cristalizar, se disuelve el residuo amorfo verde en 100 ml de ácido acético glacial. Después de algunas horas cristalizan 19 g de rifamicina PH pura. Se cristaliza la substancia varias veces de éter de benceno o éter de acetona y se obtienen cristales de F. 183 - 184^o (bloque Kofler). Rifamicina PH forma cristales negros brillantes en forma de prismas o láminas alargadas, que al pulverizarse adquieren un color sucio verde amarillento. Es fácilmente soluble en metanol, cloroformo y acetonitrila, menos en acetona, ácido acético glacial, benceno, cloruro de metileno, dioxano, y difícilmente soluble en éter, ciclohexano, hexano y agua. Soluciones de rifamicina PH en ácido acético tienen color verde, mientras que soluciones de dioxano muestran color azul. Rifamicina PH forma con álcalis sales de color rojo, cuyas soluciones acuosas tienen reacción neutra.

EJEMPLO 31

- Una solución de 3,48 g de rifamicina S y 0,81 g de 6,7-diamino-1,2,3,4-tetrahidronaftalina en 100 ml de benceno se deja reposar a temperatura ambiente hasta la reacción completa de la rifamicina S empleada. La mezcla de reacción se evapora, el residuo se disuelve en metanol y la solución metanólica se filtra por una columna con 100 g de polvo poliamida mencionado en el ejemplo 30. Se lava con metanol, hasta que el producto filtrado sale casi incoloro. Mediante lavado del poliamida con metanol, que contiene 3% de ácido acético, se obtiene un eluado de color verde,



que después de la evaporación deja 1,57 g de producto de condensación puro. $Rf_{RO} = 0,53$ (sistema A). Fórmula 19:

EJEMPLO 32

5. Una solución de 3,04 g de 16,17,18,19-tetrahidro-rifamida S de F. 226-228^o y 0,45 g de o-fenilendiamina en 100 ml de benceno se deja reposar a temperatura ambiente hasta la reacción completa de la tetrahidro-rifamicina empleada. La mezcla de reacción se
10. evapora, el residuo se disuelve en metanol y la solución metanólica se filtra por una columna con 100 g del polvo poliamida según ejemplo 30. Se lava con metanol, hasta que el producto filtrado sale casi incoloro. Mediante lavado de la columna con metanol, que con
15. tiene 3% de ácido acético, se obtiene un eluado de color verde azulado, que después de la evaporación deja 1,2 g de producto de condensación puro. La sustancia se recristaliza repetidamente de metanol y acetona: 950 mg de cristales de negro brillante de F. 138-
20. 139^o. Peso molecular determinado por espectrometría de masa: 788 (calculado: 788). $Rf_{RO} = 0,70$ (sistema A).

La 16,17,18,19-tetrahidro-rifamicina PH obtenida en la hidratación de rifamicina PH (véase ejemplo 33) es idéntica con el producto de condensación de 16,

25. 17,18,19-tetrahidro-rifamicina S y o-fenilendiamina (punto de fusión y punto de fusión mixta, cromatografía de capa delgada). Fórmula 20.

El material de partida 16,17,18,19-tetrahidro-rifamicina S se produce de la siguiente manera:

30. 5,0 g de rifamicina SV se hidrogenan en 150 ml

10 OCT 1953



- de alcohol a temperatura ambiente y presión atmosférica con 0,5 g 10% Pd/C. Después de absorber 311 ml de hidrógeno se interrumpe la hidratación, se separa por filtración del catalizador y se diluye la solución metanólica con amortiguador de fosfato del pH 7. Ahora se añade solución excedente de persulfato de amonio y se deja reposar algún tiempo. Después se succiona el material separado y se cristaliza repetidamente de metanol. Se obtienen 2 g de 16,17,18,19-tetrahidro-rifamida S en prismas amarillas alargadas de F. 226 - 228^o.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 33

- 0,784 g de rifamicina PH se hidrogenan en 250 ml de etanol a temperatura ambiente y presión atmosférica con 200 mg 10% Pd/C. Habiendo absorbido 67,5 ml de hidrógeno (equivalente a 3 mol) se separa filtrando del catalizador, se hace pasar durante 20 minutos una fuerte corriente de aire por la solución y a continuación se evapora. Según el cromatograma de capa delgada se compone el residuo de aproximadamente cinco componentes con color azul a gris azulado. Para separar la componente correspondiente al 16,17,18,19-tetrahidro-rifamicina PH del ejemplo 32, se cromatografía la mezcla repetidamente en sílice gelatinosa lavada con ácido con cloroformo como medio. Se obtienen 0,19 g de sustancia pura del $R_{FO} = 0,70$ (sistema A), que se recristaliza de acetona y metanol. Según punto de fusión, punto de fusión mixta y valor R_{FO} , esta sustancia es idéntica con la 16,17,18,19-tetrahidro-rifamicina PH obtenida de 16,17,18,19-tetrahidro-rifa-
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



20 1031
micina S por condensación con o-fenilendiamina. Fórmula 20.

EJEMPLO 34

5. 2,8 g de rifamicina S con 0,50 g de o-fenilendiamina en 200 ml de tolueno se calientan bajo nitrógeno en baño de agua en abullición. Después de una hora se añade a la solución 0,15 g de o-fenilendiamina y se sigue calentando hasta que desaparezca la rifamicina S. Después de enfriado, se separa la solución toluénica
10. con una solución acuosa de ferricianuro potásico excedente. Después de haber filtrado por celita para la separación de material amorfo y para facilitar la separación de fases, se lava la solución toluénica con solución de cloruro sódico, se le añade 0,25 g de o-fenilendiamina y se calienta de nuevo bajo nitrógeno en baño de agua. Después de una hora se añade 0,04 g de o-fenilendiamina y se sigue calentando hasta que desaparezca la rifamicina S. Después se repite todo el proceso de oxidación, se vuelve a añadir a la solución 0,12 g
15. de o-fenilendiamina y se vuelve a calentar durante unas dos horas. Ahora se separa la solución toluénica con 2-N-ácido clorhídrico y solución de cloruro sódico y se evapora en vacío hasta secar. El residuo se disuelve en metanol y se aísla la rifamicina PH en la forma
20. descrita en ejemplo 30. Se obtienen 1,85 g de rifamicina PH. Esto equivale a un rendimiento de aprox. 66%.

EJEMPLO 35

Preparados farmacéuticos conteniendo rifamicina PH como antibiótico para aplicación parenteral:

30. 25 mg de rifamicina PH-sal sódica se disuelven

3 483



10 OCT. 1964

5. en 1 ml de agua destilada. Esta solución se liofiliti-
sa a -30°. El producto seco así obtenido se utiliza
para la preparación de soluciones inyectables mediante
dilución, p.e. con 50 ml de agua destilada a 100 ml de
solución fisiológica de cloruro sódico.

EJEMPLO 36

Preparados farmacéuticos conteniendo rifamicina
PH como antibiótico en forma de comprimidos.

Composición

10.	Rifamicina PH	500 mg
	Almidón de trigo	35 mg
	Acido silícico-aerogel compositum	30 mg
	Gelatina	6 mg
	Almidón maranta	30 mg
15.	Talco	18mg
	Estearato de magnesio	<u>6 mg</u>
		625 mg

Producción:

20. I) La gelatina se disuelve en un baño de agua en
una cantidad de agua 10 veces mayor.
25. II) En un mezclador adecuado se mezclan rifamicina
PH y almidón de trigo y se humedecen con la so-
lución de gelatina I y tanta agua hasta obtener
una masa plástica bien humedecida. A continua-
ción se añade en porciones pequeñas el ácido
silícico-aerogel compositum, se hace pasar la
masa por un tamiz con 3-5 mm de malla y se seca
a una temperatura no superior a 40°.
30. III) Al granulado II secado y pasado por un tamiz de
0,8 - 1 mm de malla se añaden últimamente almidón

3 4831



de maranta, talco y estearato de magnesio como última fase.

- IV) El granulado III, listo para ser transformado en comprimidos, se comprime de forma usual a comprimidos con 11,5 mm de diámetro.

EJEMPLO 37

Preparados farmacéuticos conteniendo rifamicina FH como antibiótico en forma de cápsulas.

Composición

10.	Rifamicina FH	250 mg
	Celulosa etílica	5 mg
	Acido estárico	<u>5 mg</u>
		260 mg

Producción:

- I) Celulosa etílica y ácido estárico se disuelven en una cantidad 20 veces mayor de cloruro de metileno.
- II) En un mezclador apropiado se mezcla de forma homogénea la rifamicina FH con la solución I, a continuación se pasa por un tamiz de 3-5 mm de malla y se seca a una temperatura no superior a 40°.
- III) El granulado II seco se pasa por un tamiz de 0,5 mm de malla y se llena como de costumbre en cápsulas de gelatina del tamaño 1 (= 0,5 cm²).

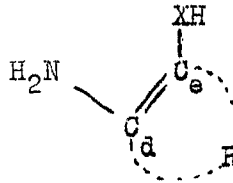
NOTA

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de de-



- talle en cuanto no alteren su principio fundamental.
- También se hace constar que el invento se refiere a unas Solicitudes de Patentes presentadas en Suiza, con fechas 11 de octubre de 1963, nº 12540/63; 31 de julio de 1964, nº 10045/64 y 10 de septiembre de 1964 nº 11797/64; acciéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre:
5. "PROCEDIMIENTO PARA LA FABRICACION DE COMPOSICIONES DE ACCION ANTIBIOTICA"; caracterizándose por lo siguiente:
- 10.

15. 1ª.- "Procedimiento para la fabricación de composiciones de acción antibiótica", caracterizado porque se transforma rifamicina O o rifamicina S o sus 16,17,18, 19-tetrahidro-derivados con una composición de fórmula



- donde X es NH, S u O y donde R junto con los átomos de carbono d y e representan el resto de una composición aromática o una composición heterocíclica de carácter aromático, y porque, caso de deseárselo, se oxidan hidroquinonas formadas en sucesión discrecional a quinonas y/o se reducen las quinonas obtenidas a hidroquinonas y/o se hidrogenan composiciones obtenidas con hidrógeno estimulado catalíticamente a sus 16,17,18,19-tetrahidro
- 20.



derivados.

5. 2ª.- Procedimiento según reivindicación 1, caracterizado porque la transformación, empleando rifamicina O, se efectúa en presencia de un disolvente o mezcla de disolventes polar.
- 3ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la transformación se efectúa en presencia de metanol o metanol acuoso.
10. 4ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 3, caracterizado porque la transformación se efectúa a temperaturas de 20 a 100°.
15. 5ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 4, caracterizado porque se aísla el producto de reacción de la mezcla de reacción por extracción fraccionada, cromatografía de absorción y/o cristalización o por precipitación de metanol-agua.
20. 6ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 5, caracterizado porque se reduce a rifamicina B antes del aislamiento del producto de reacción la rifamicina O contenida en la mezcla de reacción al lado del producto de reacción deseado.
- 7ª.- Procedimiento según reivindicación 6, caracterizado porque la reducción se efectúa mediante ácido ascorbínico.
25. 8ª.- Procedimiento según reivindicación 1, caracterizado porque la transformación con empleo de rifamicina S se efectúa en un disolvente apolar.
30. 9ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 y 8, caracterizado porque se deja reposar cantidades equivalentes de rifamicina S y la segunda componente de con-

8310



densación en un disolvente apolar hasta que toda la rifamicina S empleada se haya transformado.

5. 10a.- Procedimiento según reivindicación 9, caracterizado porque se emplea como disolvente benceno, tolueno o éter.

10. 11a.- Procedimiento según reivindicaciones 1, 9 y 10, caracterizado porque después de evaporar el disolvente se disuelve el residuo de la mezcla de reacción en metanol o acetona y se precipita el producto de reacción deseado con solución de sosa concentrada o agua.

15. 12a.- Procedimiento según reivindicación 11, caracterizado porque se purifica por cristalización o cromatografía en sílice gelatinosa el producto de reacción aislado.

20. 13a.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 4 y 9 - 11, caracterizado porque se purifica el producto de reacción mediante cromatografía en columnas poliamidas de absorción o por elusión/fraccionada en polvo, poliamida según el "procedimiento batch", eventualmente después de una reducción anterior de sustancia de partida existente a rifamicina B o SV.

25. 14a.- Procedimiento según reivindicación 1, caracterizado porque, una vez terminada la reacción, y al objeto de reoxidar el producto de reducción existente de rifamicina O u S, se transforma la mezcla de reacción con persulfato de amonio o ferricianuro potásico, dejando que la reacción siga su curso mediante adición de la segunda componente de reacción.

30. 15a.- Procedimiento según reivindicaciones 1 -14,



30 4831

caracterizado porque una quinona obtenida como producto de reacción se reduce mediante ácido ascórbico a la hidroquinona correspondiente.

5. 16a.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 14, caracterizado porque una hidroquinona obtenida como producto de reacción se oxida con aire a la quinona correspondiente.

10. 17a.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 16, caracterizado porque un producto de condensación obtenido de rifamicina O u S se hidrogena catalíticamente con carbón de paladio o níquel raney.

15. 18a.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 17, caracterizado porque rifamicina O o rifamicina S se transforman con una composición de la fórmula indicada, donde X está por NH y R junto con los átomos de carbono d y e significa un resto sustituido o no de fenileno, naftileno, piridileno o pirimidileno.

20. 19a.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 17, caracterizado porque se transforma rifamicina O o rifamicina S con una composición de la fórmula indicada, donde X está por O y R junto con los átomos de carbono d y e significa un resto sustituido o no de fenileno, naftileno, piridileno o pirimidileno.

25. 20a.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 17 y 19, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con o-aminofenol.

21a.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 17 y 19, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con o-amino-p-clorofenol.

30. 22a.- Procedimiento según reivindicaciones 1 -



17 y 19, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con o-amino-p-nitrofenol.

5. 23ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 18, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con o-fenilenediamina.

24ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 17 y 19, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con 1-amino-2-naftol.

10. 25ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 17 y 19, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con 3-amino-2-hidroxitolueno.

26ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 17 y 19, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con 4-amino-3-hidroxitolueno.

15. 27ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 17 y 19, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con 3-amino-4-hidroxitolueno.

20. 28ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 18, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con 3,4-diaminotolueno.

29ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 18, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con 2,3-diaminotolueno.

25. 30ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 18, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con 2,3-diamino-etilbenceno.

31ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 18, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con 4,5-diamino-1,2-dimetilbenceno.

30. 32ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 -

3 4831 10 00



18, caracterizado porque se transforma rifamicina O u S con 1,2-diamino-naftalina.

5. 33ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 18, caracterizado porque se emplean como sustancias de partida 16,17,18,19-tetrahidro-rifamicina O o 16, 17,18,19-tetrahidrorifamicina S y o-fenilendiamina.

10. 34ª.- Procedimiento según reivindicaciones 1 - 17 y 19, caracterizado porque se emplean como sustancias de partida rifamicina O u S y 6,7-diamino-1,2,3, 4-tetrahidronaftalina.

35ª.-"Procedimiento para la fabricación de composiciones de acción antibiótica", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

15. Esta memoria consta de 53 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid 10 OCT. 1964

CIBA SOCIETE ANONIME

J. GOMEZ ACEBO Y MODET