

346731

PATENTE DE INVENCION

Your ref: Lp 321



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para preparar derivados 25-desacetilados de rifamicina".

Solicitante: LEPETIT S.p.A. - Gruppo per la Ricerca Scientifica e la Produzione Chimica Farmaceutica, entidad italiana, residente en Via Roberto Lepetit, Milán, - Italia, y CIBA Limited, entidad suiza, residente en 141 Klybeckstrasse, Basilea, Suiza.

Este invento se refiere a nuevas sustancias antibióticas, y al procedimiento de preparación de las mismas. En la Memoria de la Patente Norteamericana nº 3.150.046 se describe la preparación del antibiótico rifamicina, por fermentación -

- 2 -
346731

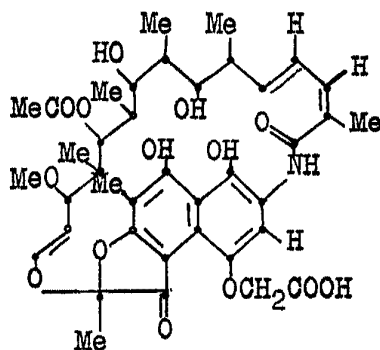


de una cepa de Str. mediterranei ATCC 13685. Como en aquella se indica, la rifamicina es una mezcla de sus tancias antibióticas.

- Una de estas sustancias, rifamicina B, tiene la fórmula empírica $C_{39}H_{49}NO_{14}$ y es un diácido, y uno de los grupos ácidos es el grupo carboxilo. Una de las propiedades especiales de este antibiótico, es el aumento de actividad al disolverse en agua, o sea, el transformarse en otra sustancia dotada de mayor actividad antibacteriana. El producto más activo, llamado rifamicina S, tiene la fórmula empírica $C_{37}H_{45}NO_{12}$ y, por reducción suave puede convertirse en otro antibiótico de la clase de la rifamicina, la rifamicina SV, de fórmula empírica $C_{37}H_{47}NO_{12}$. El procedimiento para preparar rifamicina SV comprende la oxidación de rifamicina B a rifamicina O; la hidrólisis de ésta última a rifamicina S con desprendimiento de ácido glicólico, y reducción de la rifamicina S a rifamicina SV. Las rifamicinas S y SV carecen ambas de grupo carboxilo que se libera en forma de ácido glicólico durante la etapa de activación.

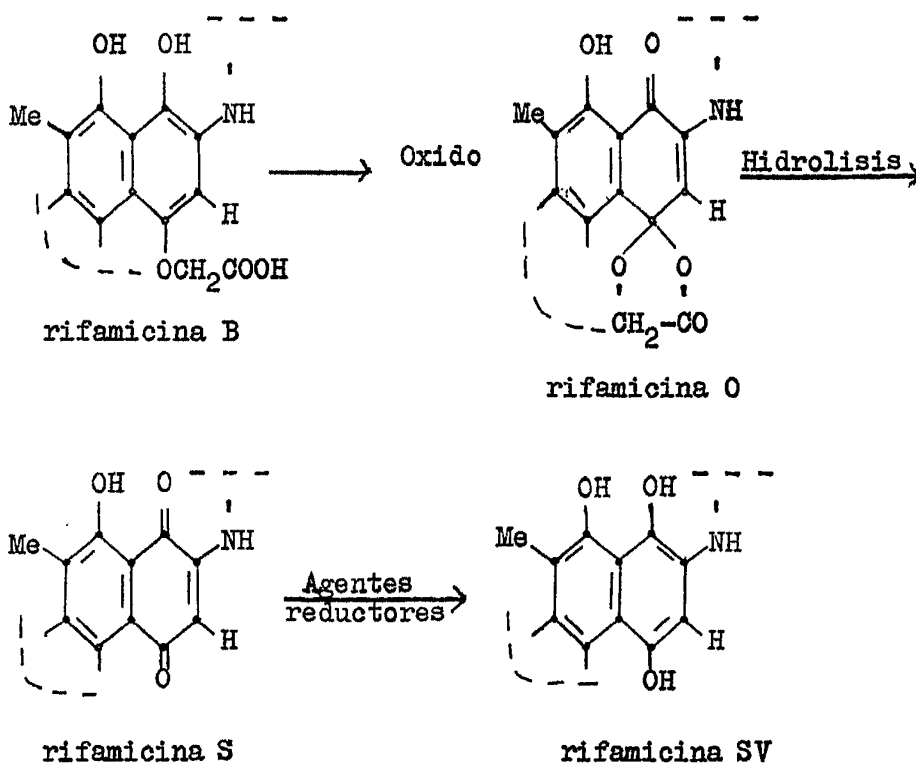
La estructura de las rifamicinas se ha elucidado por Prelog y colaboradores y se publicó en Experientia 20, 336, (1964). La rifamicina B tiene la estructura siguiente:

- 3 -
346731



La fórmula anterior explica, desde luego, de qué modo las rifamicinas O, S y SV se obtienen a partir de la rifamicina B.

5. La sucesión de estas modificaciones pueden aclararse considerando presente en la molécula, solamente el anillo naftalénico.





346731

Es bien sabido que muchos medica-

mentos, que poseen una actividad farmacológica en alto grado, a menudo tienen un uso médico limitado, debido al hecho de no poder alcanzar elevados niveles en sangre o suero a causa de la insolubilidad de aquellos en el agua y, por lo tanto, en líquidos fisiológicos.

El propósito de este invento es suministrar derivados más solubles de la clase de las rifamicinas. Esto se consigue hidrolizando el grupo CH_3COO enlazado a C_{25} , para que se libere un nuevo grupo hidroxilo en la molécula. El procedimiento consiste en tratar el derivado de rifamicina elegido, disuelto en un disolvente adecuado, con un reactivo alcalino, tal como bicarbonato sódico, cianuro potásico, hidróxido, bases orgánicas, etc.

El espectro infrarrojo de los compuestos obtenidos por el procedimiento, que pueden llamarse "rifamicinas 25-desacetiladas", es acusadamente distinto de los debidos a los compuestos precursores, dado que acusa una desaparición de la banda característica del grupo acetilo ($\nu = 1710-1715 \text{ cm}^{-1}$); el espectro NMR confirma la desaparición del grupo metilo del grupo acetilo (que proporciona un valor τ de 7,93 a 8,02). Además, el análisis funcional confirma la desaparición del grupo acetilo.

Toda la clase de rifamicinas puede convertirse en rifamicinas 25-desacetiladas, de acuerdo con el procedimiento aquí descrito, como se evidencia en los Ejemplos a continuación expuestos. Por

346731



13 NOV 1951

- ejemplo, el procedimiento reivindicado se ha comprobado que proporciona excelentes resultados con las rifamicinas S y SV. Otras rifamicinas que se desacetilan fácilmente son las que llevan un sustituyente en la posición 3, tal como 3-formilrifamicina SV, y sus derivados funcionales, o sea, aquellos en los que el grupo 3-formilo está ligado con sustancias que tienen un grupo, amino primario que forma una agrupación -CH:N-, tal como 3-(4-metil-piperazinil-iminometil)-rifamicina SV, 3-metoximinometil-rifamicina SV, 3-fenilamino-metil-rifamicina SV, la metil-, etil-, propil-, dimetil-, dietil-, dipropilhidrazona, y en general las mono- y di-alquilhidrazonas de 3-formilrifamicina SV, la oxima, la hidrazona, la arilhidrazona de 3-formilrifamicina y muchas otras. Otras rifamicinas 3-sustituídas se ha comprobado que eran eficaces, tales como los derivados aminometilicos (llamados bases Mannich) por ejemplo las 3-amino-, 3-alquilamino y 3-dialquilaminometilrifamicinas S y SV, las análogas en las que la mitad básica del 3-sustituyente es un radical piperidino, morfolino, piperazino, también sustituidos en el anillo heterocíclico. Otras rifamicinas son las que llevan un grupo básico que contenga nitrógeno, en la posición 3, tales como 3-amino-, 3-pirrolidino-, 3-morfolino-, 3-piperidino-, 3-piperazinorifamicinas; o como variante las amidas y las hidrazidas de rifamicina D y las rifamicinas que contengan un grupo heterocíclico condensado en las posiciones 3, 4, tales como los productos de condensación de rifamicina O y S con O-fenilendiamina,

346731



2-3-diaminopiridina, 4,5-diamino-2-tiouracilo, 2-aminofenol, 4-cloro- y 4-nitro-2-amino-fenol, ácido 3-hidroxiantranílico, 1-amino-2-naftol, 3,4-diaminotolueno etc.

5. Los derivados desacetilados obtenidos de la rifamicina S y SV pueden convertirse opcionalmente uno en otro, por medios, respectivamente, de un agente adecuado de reducción ú oxidación. Además, si se usa un agente de hidrogenación adecuado,
10. los hexahidro-derivados correspondientes en la cadena alifática de la molécula de rifamicina, son de obtención posible. Estas reacciones se consiguen de acuerdo con métodos bien conocidos. Como ejemplo - los dos primeros procedimientos pueden llevarse a ca
15. bo utilizando respectivamente ácido ascórbico y ferricianuro potásico, mientras que el dióxido de platino puede utilizarse como catalizador en los últimos procedimientos.

20. El aumento acusado en la solubilidad, comunica muy buenas propiedades antibacterianas y antibióticas a los compuestos y los hace especialmente adecuados para usarse como inyectables. La Tabla I siguiente resume, comparativamente, los valores de esta propiedad física esencial, en relación -
25. con algunos compuestos de este invento, y los derivados 25-acetilados correspondientes. Dichas solubilidades se dan en gramos de rifamicina por 100 cc. de solución tampón (pH = 7,5 y t = 22°C.). DÁ significa desacetilado. De la Tabla resulta evidente que -
30. las rifamicinas 25-desacetiladas son mucho más solu-

346731

bles y exactamente de 2 á 50 veces en comparación -
con los compuestos 25-acetilados correspondientes.

TABLA I



Compuesto	Solubilidad - g.% ml. (pH=7,5; 22°C)
3-dietilaminometil-rifamicina SV	0,042
25-DA-3-dietilaminometil-rifamicina SV	0,126
3-pirrolidino-metil-rifamicina SV	0,006
25-DA-3-pirrolidino-metil-rifamicina SV	0,280
3-formil-rifamicina SV	0,640
25-DA-3-formil-rifamicina SV	3,43
3-metoximinometil-rifamicina SV	0,015
25-DA-3-metoximinometil-rifamicina SV	0,034
3-(4-metil-piperacinil-iminometil)-rifamicina SV	0,285
25-DA-3-(4-metil-piperazinil-iminometil)-rifamicina SV	0,760

Otra ventaja de las rifamicinas -
que constituyen el objeto de esta solicitud, es su -
5. toxicidad sorprendentemente reducida en comparación
con la de los compuestos 25-acetilados correspondien-
tes. Esto resulta evidente de la Tabla 2 en la que
los valores de la toxicidad aguda (LD₅₀) en ratones,
se expresan en mg/kg.

346731 NOV. 1967

TABLA 2

Compuesto	!	LD ₅₀ mg/kg (ratón)
rifamicina B dietilamida	!	340 (intravenosa)
25-DA-rifamicina B dietilamida	!	600 (intravenosa)
3-formil-rifamicina SV	!	300 (intraparenteral)
25-DA-3-formil-rifamicina SV	!	550 (intraparenteral)
3-(4-metil-piperazimil-iminometil-rifamicina SV	!	460 (intraparenteral)
25-DA-3-(4-metil-piperazinil-iminometil)-rifamicina SV	!	850 (intraparenteral)
3-metoximinometil-rifamicina SV	!	no absorbida (intraparenteral)
25-DA-3-metoximinometil-rifamicina SV	!	560 (intraparenteral)

Los ejemplos no limitativos siguientes, aclaran este invento.

Ejemplo 1

Preparación de 3-dietilaminometil-rifamicina SV 25-desacetilada.

5. A una solución de 7,8 g. (0,01 moles) de dietilaminometil-rifamicina SV disuelta en 160 cc. de etanol, se añade una solución acuosa de bicarbonato sódico al 5%, (50 cc, 0,03 moles). La mezcla obtenida se somete a reflujo durante 8 horas, luego se enfría y se concentra en vacío; se añaden 70 cc de agua y la mezcla se extrae con 200 cc de acetato de etilo, después de ajustado el pH a 4-4,5 la capa orgánica se seca y se concentra en vacío; el derivado desacetilado, cristaliza y después de sepa-

- 9 -
346731



5. rarlo por filtración, se purifica nuevamente por cromatografía en una columna de gel de sílice (275 g), utilizando una mezcla de acetona-cloroformo (1:3) como disolvente de elución. El producto obtenido por concentración del eluado, pesa 5 g. (rendimiento 68%). Punto de descomposición 152-158°C.

Ejemplo 2

Preparación de 4-guanilazo-4-desoxi-rifamicina SV - 25-desacetilada

10. Se tratan 5 g (0,0066 moles) de 4-guanilazo-4-desoxi-rifamicina SV (producto de condensación de rifamicina SV con aminoguanidina) disueltos en 90 cc de etanol, con 34 cc. de bicarbonato sódico acuoso al 5% (0,02 moles). La solución resultante se somete a reflujo durante 6 horas, y luego se enfría, y se añaden 250 cc de agua. El pH se ajusta a 2 con ácido clorhídrico acuoso al 10%, luego se realiza una extracción con 300 cc de acetato de etilo; la capa orgánica se deshecha por contener algunas impurezas junto con una parte muy limitada del producto final.
- 15.
- 20.

25. La capa acuosa se extrae de nuevo con acetato de etilo, tres veces, utilizando en total 900 cc del disolvente orgánico. Las capas orgánicas se reúnen y se lavan repetidamente con una solución de fosfato tampón a un pH de 7,5 hasta que el ácido acético presenta en la solución se halla eliminado por completo; luego la solución se seca y se concentra en vacío, a un volumen reducido. El producto cristalizado se precipita por cristalización,
- 30.



346731

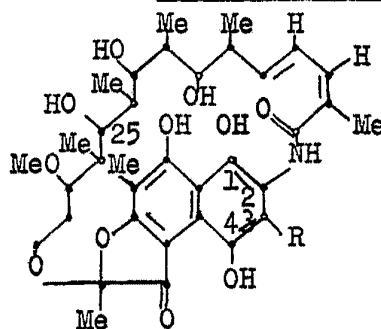
se recoge en un filtro, se lava con acetato de etilo y se seca a 40°C; es analíticamente puro (rendimiento 2,8 g., 60%). Punto de descomposición 228 g.

Ejemplo 3

5. Preparación de rifamicina S 25-desacetilada.

10. A 15-20°C se disuelven 4-4g (0,0063 moles) de rifamicina S, en 315 cc de hidróxido sódico etanólico al 0,5%. La solución rojo-violeta intenso, se agita a la temperatura ambiente durante 3 horas y luego se vierte en 1000cc. de agua helada, y se añade ácido clorhídrico acuoso al 10%, hasta un pH ácido. El producto bruto se precipita por cristalización y se extrae con acetato de etilo. La capa orgánica, lavada con agua y secada, se concentra a presión reducida. a 100 cc; se agregan 60 cc de ligroina, luego la solución se concentra nuevamente a un volumen pequeño; se forma un precipitado amorfo amarillo, que se cristaliza repetidamente en etanol; el color del producto puro es amarillo naranja: se obtiene 2,2 g (54%). Punto de descomposición 144-147°C.

Ejemplos 4 a 8





Ejemplo	R	Fórmula empirica	Punto de descomposición.	Δ Rf (+)
4	$-\text{CH}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-$	$\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_{11}$	178°C	0,19 (a)
5	$-\text{CHO}$	$\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{NO}_{12}$	161-163°C	0,07 (b)
6	$-\text{CH}=\text{N}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N}-\text{Me}$	$\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{11}$	165°C	0,15 (c)
7	$-\text{CH}=\text{N}=\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_{11}$	172°C	0,08 (b)
8	$-\text{CH}=\text{NOMe}$	$\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_{12}$	170-230°C	0,12 (c)

(+) el valor Δ Rf es la diferencia entre el valor Rf del compuesto de partida y el valor Rf del derivado desacetilado correspondiente: $\text{Rf}_{\text{ac}} - \text{Rf}_{\text{desac}}$.
Cromatografía en capa delgada en gel de sílice G (Merck);

5. \sim 10 cm de carrera

Mezclas disolventes:

- (a) acetona-cloroformo 1:1
- (b) acetona-cloroformo 2:1
- (c) etanol-cloroformo 1:2

10.

Ejemplo 9

Preparación de rifamicina SV 25-desacetilada

Una solución metanólica de rifamicina S desacetilada, se trata con un exceso de solución acuosa de ascorbato sódico, y se deja reposar durante pocos minutos. La solución se acidifica a continuación, se extrae con cloroformo y el extracto se seca y se evapora. El residuo consiste en rifamicina SV desacetilada con un valor Rf_{RO} de 0,52 (cromatografía en capa delgada en gel de sílice impregna

346731¹²



do con ácido cítrico, usando cloroformo con 10% de metanol como medio de circulación; la designación Rf_{RO} indica que el valor Rf referido al de la rifamicina 0 es igual a 1).

5.

Ejemplo 10

Preparación de hexahidro-rifamicina S 25-desacetilada

10. La rifamicina S desacetilada, se hidrogena completamente en etanol utilizando dióxido de platino como catalizador. Se recogen 4 moles de hidrógeno. La mezcla de hidrogenación se filtra, el filtrado se evapora, el residuo se disuelve en solución acuosa de bicarbonato sódico, la solución se oxida por adición de un exceso de solución de ferricianuro potásico y la hexahidrorifamicina S desacetilada, resultante, se extrae con cloroformo. Para eliminar la materia resinosa, la solución clorofórmica se trata con algo de gel de sílice y luego se evapora. El residuo cristaliza lentamente en metanol acuoso.

15.

20.

Punto de fusión 122-130°C. Peso molecular, calculado: 659; encontrado por espectrometría de masas, 659.

Ejemplo 11

Preparación de hexahidro-rifamicina SV 25-desacetilada

25.

30. Una solución metanólica de hexahidro-rifamicina S desacetilada, se trata con un exceso de solución acuosa de ascorbato sódico, y se deja reposar durante unos minutos. La solución se acidifica luego y se extrae con cloroformo, y el extracto se seca y se evapora. El residuo consiste en hexahidro-rifamicina SV 25-desacetilada.

34673

13



dro-rifamicina SV desacetilada con un valor R_{FO} de 0,52 (cromatograma en capa delgada en gel de sílice impregnado con ácido cítrico, utilizando cloroformo con 10% de metanol, como agente de circulación; la -
 5. designación R_{FO} significa que el valor de Rf referido al de la rifamicina O, es igual a 1).

Ejemplo 12

Preparación de 3-metilamino-rifamicina S 25-desacetilada

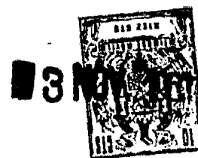
10. Una suspensión de 2 g. de 3-metilamino-rifamicina S en 60 cc. de metanol, se trata con 50 cc. de solución de hidróxido sódico al 10% y se aplica durante 10 minutos a la temperatura ambiente. La solución se acidifica a continuación con ácido cítrico, se diluye con agua y se extrae varias veces con cloroformo. Los extractos clorofórmicos se combinan, se secan y se evaporan. El residuo cristaliza en metanol + éter. Se obtienen 1,8 g de prisma color vino de 3-metilamino-rifamicina S desacetilada,
 15. que funde a 208°C.
 20.

Ejemplo 13

Preparación de 3-metilamino-rifamicina SV 25-desacetilada.

25. Una solución metanólica de 3-metilamino-rifamicina S desacetilada, se trata con un exceso de solución acuosa de ascorbato sódico, y se deja reposar durante pocos minutos.
 La solución se acidifica a continuación, se extrae con cloroformo y el residuo se seca y se evapora. El residuo esta constituido por -
 30.

346731



- 3-metilamino-rifamicina SV desacetilada, que tiene un valor Rf_{RO} de 0,35 (cromatograma en capa delgada en gel de sílice impregnado con ácido cítrico utilizando cloroformo con 10% de metanol como agente de circulación; La designación Rf_{RO} indica que el valor - Rf referido al de la rifamicina 0 es igual a 1).

Ejemplo 14

Preparación de 3-morfolino-rifamicina SV 25-desacetilada.

10. Se disuelven 5 g de 3-morfolino-rifamicina SV en un gran exceso de solución 2N de hidróxido sódico, y la solución se deja reposar a temperatura ambiente, durante 45 minutos. Luego se neutraliza, se acidifica con ácido cítrico, y se extrae varias veces con cloroformo. Los extractos clorofórmicos, se combinan, se secan y se evaporan. El residuo se recristaliza dos veces en éter, para proporcionar 4,2 g de 3-morfolino-rifamicina SV desacetilada, en forma de prismas largos y amarillos que se funden a 240°C (con descomposición).

Ejemplo 15

Preparación de 3-morfolino-rifamicina-S 25-desacetilada.

25. Una solución acuosa de la sal sódica de 3-morfolino-rifamicina SV desacetilada se trata con un exceso de ferricianuro potásico en solución acuosa. Se forma un precipitado rojo oscuro que se extrae con cloroformo. El extracto clorofórmico, se seca y se evapora, y el residuo se cristaliza en éter. Se obtienen cristales rojo violeta de -
- 30.

346731 3M



3-morfolino-rifamicina S desacetilada, que se funden y se descomponen a 175-178°C.

Ejemplo 16

Preparación de 3-dimetilhidrazono-metil-rifamicina -

5. SV 25-desacetilada

- Se suspenden 5 g de 3-dimetilhidrazono-metil-rifamicina SV en 100 cc. de metanol; - se añaden 50 cc de solución al 10% de hidróxido sódico y luego 100cc. de metanol y el conjunto se deja -
10. reposar a temperatura ambiente, durante 40 minutos. La masa se acidifica a continuación con ácido cítrico, se diluye con agua y se extrae varias veces con cloroformo. Los extractos clorofórmicos se combinan, se secan y se evaporan. El residuo que está constituido por la 3-dimetilhidrazono-metil-rifamicina SV
15. desacetilada, que cristaliza en metanol.

Rendimiento 4 g; punto de fusión 179-181°C.

Ejemplo 17

20. Preparación de 3-piperidino-rifamicina SV 25-desacetilada

- Una solución metanólica de 2 g de 3-piperidino-rifamicina SV, se trata con 5 cc de solución de hidróxido sódico al 20%, y se deja reposar
25. a la temperatura ambiente durante 45 minutos. La solución se acidifica a continuación con ácido cítrico, se diluye con agua, y se extrae con cloroformo. El extracto clorofórmico se seca y se evapora. El residuo cristaliza en metanol, en forma de prismas amarillos se obtienen 1,5 g de 3-piperidino-rifamicina
- 30.

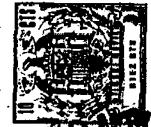
346731



SV desacetilada, de un punto de fusión de 242-245°C.
(descomposición).

N O T A

- 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 detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Inglaterra con fecha 3 de noviembre de 1.966, bajo el número 49389, acogiéndose por 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: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR DERIVADOS 25-DESACETILADOS DE RIFAMICINA"; caracterizándose por lo siguiente:
- 1ª.- Procedimiento para preparar derivados 25-desacetilados de rifamicina, caracterizado porque se somete a hidrólisis alcalina, en presencia de un disolvente, una rifamicina elegida del grupo consistente en rifamicina B, rifamicina O, rifamicina S, rifamicina SV, y derivados de las mismas.
- 2ª.- Procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado porque la rifamicina de partida se elige del grupo consistente en 3-dietilaminometil-rifamicina SV, 4-guanilazo-4-desoxi-rifamicina SV, rifamicina S, 3-pirrolidinometil-rifamicina SV, 3-formil-rifamicina SV, 3-(4-metil-piperacínil-



346731

3 NOV. 1967

5. iminometil)-rifamicina SV, 3-fenil-iminometil-rifamicina SV, 3-metoxi-iminometil-rifamicina SV, rifamicina SV, 3-metilamino-rifamicina S, 3-metilamino-rifamicina SV, 3-morfolino-rifamicina SV, 3-morfolino-rifamicina S, 3-dimetil-hidrazono-metil-rifamicina SV y 3-piperidino-rifamicina SV.

10. 3ª.- Procedimiento para preparar derivados 25-desacetilados de rifamicina; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de diecisiete hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

3 NOV. 1967

LEPETIT S.p.A. - Gruppo per la Ricerca Scientifica e la Produzione Chimica Farmaceutica y CIBA Limited

GOMEZ ACEBO Y MODEI
P. P. Fernández E. Hernández Ruiz