

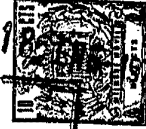
PATENTE DE INVENCION

Lp. 469.

410754

F.O. 27-2-75

Int. Cl.: CO7F//A61K



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR DERIVADOS 3-ALQUENILO
DE RIFAMICINA SV.

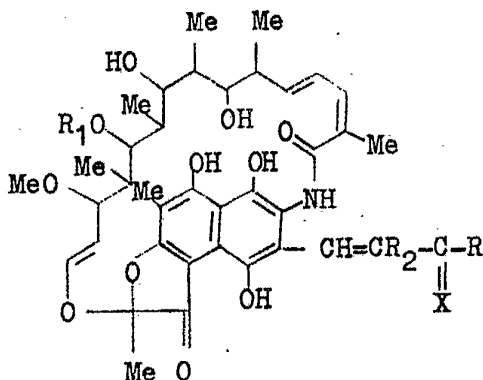
Solicitante: GRUPPO LEPETIT S.p.A., entidad italiana, residente en
Via Durando 38, MILAN, Italia.

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar nuevos derivados de rifamicina SV. Más particularmente, la invención se relaciona con la producción de derivados 3-alquenilo de rifamicina SV, de fórmula:

5.



10754

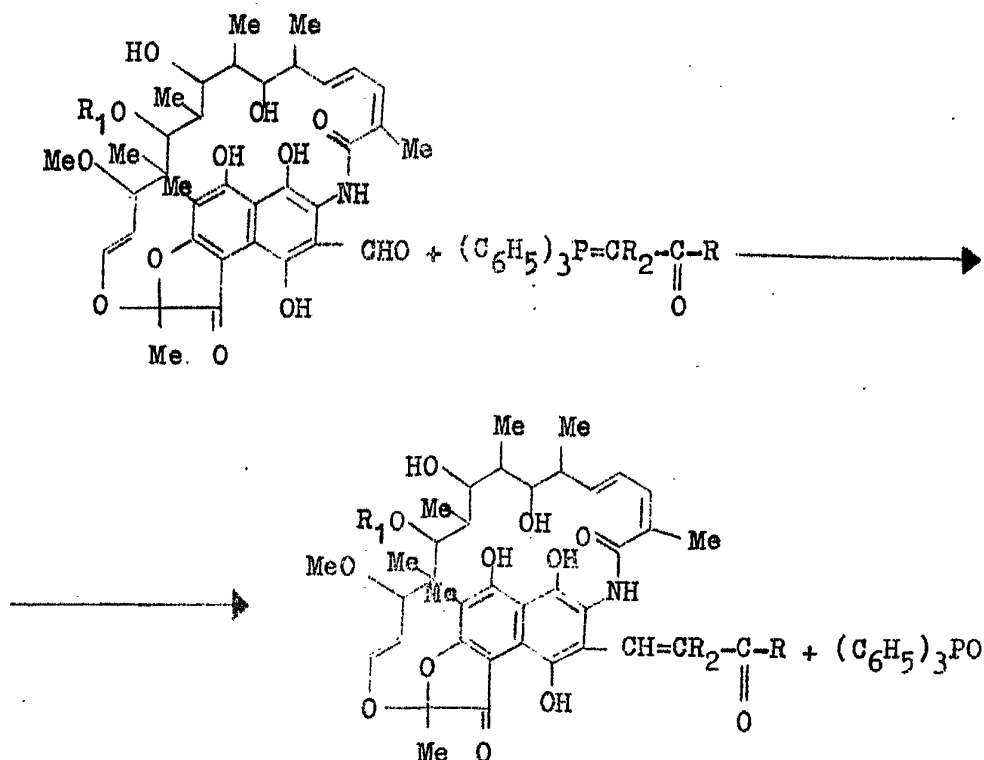


5. en la que R representa hidrógeno, alquilo o aril-alquilo inferior, R₁ representa hidrógeno o acetilo, R₂ representa hidrógeno, alquilo inferior o terc-butoxicarbonilo, X representa oxígeno, imino, imino sustituido, oximino, oximino sustituido, hidrazono o un radical hidrazono sustituido.

10. Los derivados imino o imino sustituido de fórmula I, son practicamente bases de Schiff formadas por reacción de los compuestos de fórmula I en la que X es oxígeno, con aminas primarias. Los derivados oximino son los productos de condensación de los compuestos I en donde X es oxígeno, con hidroxilamina o hidroxilamina O-sustituida. Los términos hidrazono e hidrazono sustituido se refieren a los productos de reacción de compuestos de fórmula I en la que X es oxígeno con hidrazina o hidrazinas N-sustituidas. En este último caso, los sustituyentes del átomo de nitrógeno, pueden formar también un anillo heterocíclico tal como, por ejemplo, piperazina, morfina, piperidina, heptametenimina, octametenimina, 3,8-diazabicyclo[3,2,1]-octano.

20. Igualmente, debe entenderse que los correspondientes compuestos hexahidro de rifamicina están incluidos en la presente invención. De acuerdo con un método general para llevar a cabo la invención, el compuesto clave para la prepara-

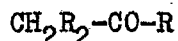
5. ción de la clase anterior de sustancias es una 3-formilrifamicina SV la cual se hace reaccionar con un alquilidenfosforano o aralquilidenfosforano, adecuado, bajo las condiciones que se conocen como la reacción de Wittig. El siguiente esquema de reacción, en donde R, R₁ y R₂ se definen como anteriormente, ilustran el procedimiento para preparar los compuestos carbonílicos.



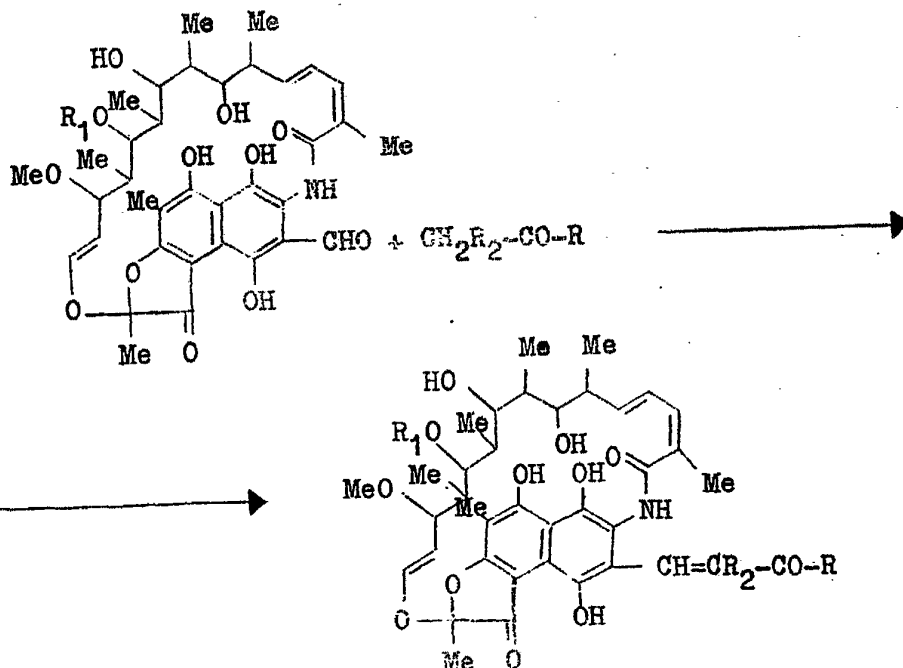
10. Los disolventes de reacción para este procedimiento se eligen entre los disolventes orgánicos inertes, tales como, por ejemplo, tetrahidrofurano, acetato de etilo, dioxano, benceno y cloroformo. Los intermediarios iluros se preparan a partir de halocetonas y de trifenilfosfina, de acuerdo con el procedimiento descrito por Ramirez et al., J. Org. Chem. 22, 41, (1957) ó por H.J. Bestman et al. Chem.Ber. 95, 1513 (1962).
- 15.



Otro método adecuado para preparar los compuestos carbonílicos de fórmula II, comprende una reacción de condensación de 3-formilrifamicina SV o su derivado 25-desacetilo o 16, 17, 18, 19, 28, 29-hexahidro, con un aldehído o cetona de fórmula:



de acuerdo con el siguiente esquema:



10. La reacción se efectúa ordinariamente en presencia de un catalizador básico, tal como, por ejemplo, hidróxidos alcalinos, aminas, alcóxidos alcalinos o amidas de metales alcalinos. Un modo preferido para realizar la condensación sigue esencialmente las mismas condiciones de reacción que la
15. condensación de Knoevenagel (Org. Reactions Vol. 15, 204, John Wiley 1967). En este caso, el catalizador básico se elige generalmente entre amoniaco o aminas tales como piperidina, piridina, dietilamina. Otros catalizadores utilizados normalmente son el amoniaco o las sales de metales alcalinos con
20. ácidos orgánicos, tales como acetato de amonio, de potasio o



- de sodio. Más particularmente, la reacción se efectúa convenientemente en tetrahidrofurano como disolvente, mediante reacción de un derivado de 3-formilrifamicina SV con un aldehído o cetona predeterminado, a una temperatura que oscila entre 0 y 5°C aproximadamente. Como catalizador se emplea una mezcla de piperidina:ácido acético 5:1.
- 5.
- Los compuestos carbonílicos de fórmula II pueden hacerse reaccionar ulteriormente de acuerdo con los procedimientos usuales; con aproximadamente una proporción molecular de una amina primaria seleccionada o con hidroxilamina o con un derivado de hidrazina. Esta reacción de condensación se efectúa generalmente a temperatura ambiente y mediante empleo de tetrahidrofurano como disolvente preferido. Los compuestos finales son sólidos coloreados que se descomponen tras la fusión y que pueden cristalizarse fácilmente en acetato de etilo o en otros disolventes orgánicos, tales como metanol y etanol. Dichos compuestos son claramente solubles en acetona, tetrahidrofurano, dioxano y cloroformo.
- 10.
- 15.
- Los compuestos de la invención poseen una elevada actividad antibacterial que es particularmente notable contra Streptococcus hemolyticus y Diplococcus pneumoniae.
- 20.
- En ensayos representativos, se encontró que la concentración mínima inhibitoria contra estos microorganismos oscilaba entre 0,002 y 0,05 $\mu\text{g/ml}$, tal como se muestra en la siguiente tabla I.
- 25.

410754

- 6 -



T a b l a I

Concentraciones mínima inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$) in vitro

Compuesto del Ejemplo	1	2	3	4	5	6
Staphylococcus aureus	0,1	0,1	0,02	0,01	0,2	0,01
Staphylococcus aureus (con 20% de suero bovino)	0,2	0,05	0,2	0,05	0,02	0,02
S. aureus Tour.	0,1	0,1	0,05	0,02	0,1	0,02
Streptococcus hemoliticus	0,005	0,2	0,05	0,002	0,002	0,01
Streptococcus faecalis	0,5	1	0,1	0,1	0,5	0,01
Diplococcus pneumoniae	0,005	0,05	0,002	0,002	0,002	0,02
Proteus	100	50	50	50	100	100
E. coli	100	10	50	50	100	100
Klebsiella pneumoniae	100	100	100	50	100	100
Pseud. aereata	100	100	100	100	100	100
Myc.Tub.H ₃₇ Rv.	0,5	0,5	0,5	0,1	1	1

- La actividad antimicrobial viene acompañada con una baja toxicidad. Otra característica muy importante de los compuestos obtenidos según la invención, reside en su actividad de inhibición
5. de polimerasas DNA que son características de linfoblastos sanguíneos leucémicos en humanos y contra las transferasas (polimerasas) nucleotídificas, típicas, de virus no utilizados por las células normales. A partir de los estudios sobre miembros representativos de grupos de virus, se sabe que los mismos pueden transportar o
10. inducir en las células anfitrionas polimerasas como una parte esencial de su aplicación. De este modo, existen virus tales como picornavirus o poliovirus que inducen la polimerasa RNA dependiente de RNA mientras que otros grupos, tales como virus de leucemia-sarcoma, transportan una polimerasa DNA dependiente de RNA.
15. La presencia y el papel muy importante de la polimerasa DNA dependiente de RNA (transcriptasa inversa) en virus RNA oncogénicos, ha sido descubierta por D. Baltimore, Nature, 226, 1209 (1970) y por H.M. Temin et al., Nature, 226, 1211 (1970). El reciente descubrimiento de la enzima de polimerasa DNA dependiente



de RNA en virus tumorales RNA de especies animales, ha sido confirmado también por otros autores, tal y como se indica, por ejemplo, en los siguientes documentos:

5. Green et al.: mecanismo de carcinogenesis por virus tumorales RNA. Una polimerasa DNA dependiente de RNA en virus de sarcoma. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 385-393, 1970.
- Spiegelman et al.: caracterización de los productos de polimerasa DNA dirigidos a RNA en virus RNA oncogénicos, Nature, London, 227, 563, 1970.
10. Hatanaka et al.: actividad de polimerasa DNA asociada con los virus tumorales RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 143, 1970.
- Scolnick et al.: síntesis de DNA por RNA conteniendo virus tumorales. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 67, 1034, 1970.
15. La implicación de virus RNA en ciertos tumores, ha sido apoyada también por otros factores: se ha encontrado que la transcriptasa inversa está presente en partículas de leche humana obtenida de mujeres con una historia familiar de cáncer de mama y de personas imbricadas. (Scholn et al. Nature, 231, 97, 1971). Priori et al. (Nature, New Biology, 232, 16, 1971) han aislado un virus denominado ESP-1, que contiene transcriptasa inversa, de células del fluido pleural de un niño con linfoma y lo han desarrollado con éxito en cultivos de tejidos.
20. La presencia en el cáncer de mama humano de homólogos RNA al virus tumoral RNA de mama de ratones, ha sido demostrada a través de los experimentos de hibridación molecular de R. Axel et al. (Nature 235, 32, 1972).
25. La posibilidad de un virus de cáncer de mama humano,
- 30.



5. se confirmó también por microscopía electrónica de leche humana (N.H. Sarkar et al. Nature, 236, 103, 1972). La actividad de polimerasa DNA dependiente de RNA y los virus de tipo partículas, han sido aislados también de células de rabdomiosarcoma humanas (Mc Allister et al. Nature, New Biol. 235, 3 1972).

10. En la actualidad no existen drogas eficaces para el tratamiento de enfermedades virales puesto que los virus y células tienen requerimientos metabólicos comunes así como idénticas trayectorias. La investigación más prometedora en la quemoterapia viral consiste claramente en el proyecto de productos químicos adecuados que se combinan específicamente con polimerasa de células virales o de células transformadas en virus pero no con polimerasas de células anfitrionas que controlan la expresión de información genética de los virus.

15. Los inhibidores específicos de las enzimas de células virales o transformadas en virus y, en particular, los inhibidores de polimerasas de virus tumorales RNA, pueden tener un papel importante a la hora de probar las drogas para la terapia de

20. la leucemia y para otras terapias cancerígenas. La actividad inhibitoria de los compuestos obtenidos según la invención, ha sido ensayada sobre polimerasa DNA dependiente de RNA de virus de sarcoma de murina (endógeno) y la actividad de polimerasa DNA dependiente de RNA de enzimas purificadas. La inhibición fué ensayada de acuerdo con los métodos descritos por

25. C. Gurgo et al., Nature, New Biology, 229, 111, 1971. El efecto de las diferentes concentraciones de drogas sobre la actividad de la polimerasa, fué determinado a través de la incorporación de ³H-dTTP (trifosfato de timina-deoxirribido tri-

30. tiado) en la fracción insoluble. Un ejemplo típico de los pro-



cedimientos experimentales es el siguiente:

1) Aislamiento de virus y purificación de la polimerasa viral

5. El virus se aísla y purifica de células de rata transformadas en virus de sarcoma de murina (aislamiento de Moloney) y de células de ratón transformadas en virus de sarcoma de murina (aislamiento de Harvey) como anteriormente se ha descrito (Green et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 385-393, 1970, Rokutanda et al., Nature, 227, 1026-1028, 1970). La polimerasa viral se purifica 20-40 veces por incubación de virus purificado con 0,5 % NP-40 (nonidet P-40) en cloruro sódico 0,1 M, tampón Tris 0,01 M (pH 7,6), EDTA 0,001 M, durante 5 minutos a temperatura ambiente, y centrifugación zonal en gradientes de sucrosa al 15-30 % en 10 milimoles de tampón de fosfato sódico (pH 7,4), 2,5 milimoles de cloruro de magnesio, 10 milimoles de ditiotreitol y 5 % de glicerol, durante 24 horas, a 38.000 r.p.m. en un rotor Spinco SW41. Las fracciones máximas de actividad enzimática (13-17) de 22 fracciones recogidas, son introducidas en un tanque y almacenadas a -70°C en glicerol al 30 %.

Ensayo de la polimerasa DNA

25. Se realiza la incubación de la enzima durante 1 hora a 37°C en 100 µl de mezcla de reacción conteniendo 40 milimoles de tampón Tris (pH 8,0), 5 milimoles de ditiotreitol, 30 milimoles de cloruro sódico, 2,5 milimoles de cloruro de magnesio, 0,1 milimoles de dATP, dGTP, dCTP y 10 µCi de ³H-dTTP (12-L8 Ci/mmol) tal y como describe Green et al. en Proc. Nat. Acad. Sci, USA 67, 385-393, 1970. La reacción es terminada mediante la adición de 150 µl de ácido perclórico
30. 1N. Como vehículo se añade DNA de timo de ternera (100 µg);



el producto DNA radioactivo es procesado en la forma descrita en los dos artículos mencionados anteriormente. La actividad de la polimerasa DNA dependiente de RNA endógeno es medida después de la adición de 0,01 % FN-40 a virus purificado al mismo tiempo que el ensayo. La actividad de polimerasa DNA de polimerasa viral purificada se mide con 2 μ g de poli d(A-T) como patrón y no NP-40.

Ensayo con respecto a la inhibición por los derivados de rifamicina

10. Los derivados de rifamicina se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 5 mg/ml y se almacenan a 4°C. La inhibición de la actividad de polimerasa DNA dependiente de RNA endógeno es ensayada mediante la adición de 2 μ l de derivado adecuadamente diluido en DMSO ó 2 μ l de DMSO (control) a la mezcla del ensayo antes de la adición a virus roto que contiene 15-30 μ g de proteína viral. La incubación enzimática se realiza durante 60 minutos a 37°C. La inhibición de la enzima purificada se ensaya mediante pre-incubación de 2 μ l de derivado ó DMSO con 30 μ l de enzima (1 a 2 μ de proteína) durante 10 minutos a 37°C; a continuación se añaden 70 μ l de mezcla de sustrato y la mezcla se incuba y procesa adicionalmente en la forma anteriormente descrita.

25. En los ensayos representativos, los compuestos de la invención, a una concentración de 2 - 100 μ g/ml o menos, reducen la incorporación de H³-dTTP a menos del 10 % en comparación con los ensayos de control, lo que demuestra claramente la inhibición del mecanismo de carcinogenesis mediante virus tumorales RNA de acuerdo con los puntos de vista bioquímicos más recientes.

30. El efecto inhibitorio de las transcriptasas inver-

5. sas ha sido confirmado también mediante un ensayo sobre polimerasa de cirus de leucemia murina. La polimerasa RNA de virus de leucemia murina se prepara a partir de virus rotos TRITON X 100 tal y como describe Gallo et al., Nature, New Biology, 232, 141 (1971). El virus, tanto del tipo Rauscher como del tipo Moloney, se purifica previamente mediante congregación en la región de 1,16 g/ml de un gradiente de densidad de sucrosa después de la centrifugación inicial a baja velocidad para eliminar los restos celulares y enlechando sobre sucrosa al 60 % hasta sucrosa al 20 %. La concentración final de preparación del virus es de 10^{11} partículas/ml. Como control o patrón se utiliza RNA 70S endógeno. Las concentraciones de 50 μ g/ml o inferiores fueron eficaces a la hora de inhibir la enzima.

10. 15. Se obtuvieron resultados similares empleando polimerasas de células tumorales de origen humano. En este caso, la actividad inhibitoria fué estudiada también sobre polimerasas de células normales para caracterizar un efecto selectivo. Los derivados de rifamicina de fórmula I, representativos, han sido evaluados con respecto a sus efectos sobre dos polimerasas DNA purificadas aisladas de (1) linfocitos sanguíneos normales humanos (estimulados con PHA) (2) una línea de células de linfoblastos (derivada de un donador normal) y (3) linfoblastos sanguíneos leucémicos, humanos. Se utilizaron controles o patrones sintéticos y/o naturales.

20. 25. Un ejemplo típico del procedimiento experimental es el siguiente:

Linfoblastos sanguíneos humanos

30. Los linfoblastos leucémicos son aislados de la sangre periférica de pacientes con leucemia linfocítica aguda



- (ALL) mediante leucoforesis. Las células son lavadas y los eritrocitos se separan mediante lisis hipotónica. Los linfocitos normales son obtenidos de la sangre periférica de donadores sanos después de la separación de granulocitos mediante cromatografía en columna de nylon. Estos fueron estimulados con fitohemaglutinina (PHA) durante 72 horas como se describe anteriormente (Gallo et al. Nature, 228, 927, 1970, Gallo et al. Science, 165, 400, 1968) con el fin de maximizar la actividad de la polimerasa DNA.
- 5.
10. Sin embargo, debido a los problemas logísticos para la obtención de cantidades suficientes de estas células, se utiliza una línea de células de cultivo de tejido "normal" humano (1788) para suministrar polimerasas DNA menos purificadas durante parte de los estudios de reconocimiento inicial.
15. Los compuestos de interés fueron estudiados entonces más detalladamente con las enzimas más purificadas de los linfocitos sanguíneos normales y leucémicos. Estas células de cultivo de tejidos fueron obtenidas de Associated Biomedio System, Inc.
20. Preparados de polimerasa DNA
- La polimerasa DNA celular se extrae y purifica de linfocitos sanguíneos normales (estimulados con PHA) y linfocitos sanguíneos leucémicos y células linfoidas (1788), mediante homogeneización en tampón hipotónico seguido por Triton X 100 y/o elevada extracción con sales del pellet extraliososomal. Después de la centrifugación diferencial, los extractos celulares son purificados adicionalmente mediante celulosa DEAD, fosfocelulosa y cromatografía en columna Sephadex G 200.
- 25.

Ensayos con polimerasa DNA

- Los ensayos con polimerasa DNA se realizan en un volumen final de 100 μ l. La mezcla de ensayo contiene tampón de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mmoles; MgAc, 6,0 mmoles; ditiotreitól, 8,0 mmoles; NaCl, 60 mmoles. El ajuste del valor pH se realiza después de la adición de los inhibidores los cuales se disuelven previamente en dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final de DMSO es de 0,5 % y todas las muestras de control incluyen esta cantidad de DMSO. Se utiliza en el ensayo una concentración de enzima que cataliza una incorporación de aproximadamente 1,0 pmol/hora. La enzima es pre-incubada, en la mayor parte de los casos, durante 5 minutos, con el inhibidor. La reacción se inicia entonces mediante la adición de control o patrón de o bien DNA sintético (poli d(AT), Miles Lab.) o bien de híbrido de DNA.RNA (oligo dT.poli rA), a 5 μ g/ml o controles naturales: DNA de esperma de salmón activo a 50 μ g/ml y RNA viral 70S endógeno; 10 μ Ci de (3 H-metil)-TTP (New England Nuclear, 18,6 mCi/ μ mol, liofilizado y redissuelto en HCl 0,01 M justo antes de su utilización) y dATP (8×10^{-5} M, con control sintético) o los tres trifosfatos de deoxinucleóxico (8×10^{-5} M con reacciones de control de RNA o DNA). En algunos experimentos, no se realizó la pre-incubación de la enzima con inhibidor. En estos casos, las reacciones son iniciadas mediante la adición de la enzima a la mezcla de reacción completa que incluye el inhibidor. Se extraen muestras al comienzo de la incubación y después de 30 minutos se termina mediante la adición de 2 ml de pirofosfato sódico 0,08 M y se precipita en ácido tricloroacético frío al 12,5 % (TCA) con RNA de levadura (400 μ g) como vehículo. Los productos son recogidos sobre un filtro de miliporas,



se lavan extensivamente con TCA al 5 % y 1 ml de una mezcla DMSO-etanol-NaCl 0,1 M (0,5:70:29,5), se secan y se recuentan en 2 ml de BBS₃ (Beckman) y 10 ml de liquifluor (New England Nuclear) en un contador de escintilación de líquidos Packard.

5.

Se averiguó que las concentraciones comprendidas entre 5 y 20 $\mu\text{g/ml}$ provocaban una inhibición del 50 % de la polimerasa leucémica con un control o patrón de DNA sintético. La reacción controlada mediante un control de RNA sintético (poli RA.rU) fue incluso más susceptible.

10.

Los experimentos representativos realizados con un control natural sobre polimerasa de células normales y tumorales demostraron una susceptibilidad superior de las enzimas tumorales con respecto a los compuestos del ensayo.

15.

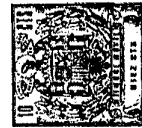
Otras características biológicas exhibidas por los nuevos derivados de rifamicina, incluyen la inhibición de formación de focos en células de ratón, de rata y humanas mediante la cepa de Moloney y Kirsten de virus de sarcoma de murina; inhibición selectiva de la producción de virus por las células de ratón ya transformadas; detección de células reversibles empleando los sistemas celulares del ratón y de la rata, no productores, transformados en virus de sarcoma de murina. Los compuestos de hidrazina de la presente invención han confirmado además su toxicidad selectiva con respecto a las células transformadas en virus de ratón, rata y de origen humano, cuando se ensayaron con respecto a la capacidad de formación de colonias.

20.

25.

30.

En los estudios realizados para determinar el efecto de los compuestos para inhibir la formación de focos mediante el virus de sarcoma Moloney sobre cultivos de tejidos



BALB/3T3, se utiliza el siguiente procedimiento.

- Se desarrollan o crecen cultivos celulares ABLB/3T3 en matraces de plástico de 250 ml en un medio de crecimiento consistente en medio esencial mínimo de Eagle con 10 % de suero bobino fetal. Los recuentos de células se efectúan con un contador Coulter después de suspender las células con tripsina-EDTA y dilución en el medio de crecimiento. Como homogenato tumoral se emplea virus de sarcoma de murina Moloney. Este último se pasa cuatro veces por una línea embrio-celular de ratón, de paso elevado, derivado de Swiss, y se ensaya con respecto a las unidades de formación de focos en células BALB/3T3. En la realización de los estudios, se utiliza una modificación del método descrito por Hartley y Rowe, Proc. Nat. Acad. Sci. 55, 780 (1966). En el presente trabajo, los matraces son sembrados con $1-2 \times 10^6$ células en 25 ml de medio de crecimiento y se incuban a 37°C durante 24 horas. Después de la separación de fluidos, el virus, en un número predeterminado de unidades formadoras de focos, se introduce en 0,5 ml de medio de crecimiento y se deja adsorber sobre la monocapa de células, durante 90 minutos, a 37°C. Después de este periodo de adsorción, se añade una cantidad predeterminada, normalmente como una gama de dosis de 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$, aproximadamente, de un compuesto de alquenilrifamicina (previamente disuelto en dimetilsulfóxido a una concentración de 1 mg/ml) y se transporta en 25 ml de medio de crecimiento, y los cultivos se devuelven al incubador. Como control, se añade, a un cultivo separado, dimetilsulfóxido solo en el medio de crecimiento. Después de 3 días de inoculación, los cultivos son cambiados de fluidos y se recuentan, en el séptimo día, los focos de células transformadas.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



410754

En este mismo método, se estudia el virus estomati-
tis vesicular, serotipo de New Jersey. Los métodos empleados
para crecer y ensayar este virus han sido descritos por Hackett
et al., Virology, 31, 114 (1967).

5. Estas propiedades indican que dichos compuestos po-
seen una actividad inhibitoria eficaz sobre los tumores indu-
cidos por virus en animales.

10. Para ilustrar una forma de realización de la inven-
ción, se proporciona a continuación la preparación de los si-
guientes compuestos.

EJEMPLO 1

3-(3-oxo-1-butenil)-rifamicina SV

15. A una solución de 10 g de acetnilidentrifenilfos-
forano en 600 ml de tetrahidrofurano, se añaden 7,2 g de 3-
formilrifamicina SV y la mezcla se refluje durante 3 horas.
Después de concentración a un pequeño volúmen, se añaden 300
ml de acetato de etilo y la solución orgánica se lava con agua
acídica (pH = 2) y entonces con agua. El residuo obtenido des-
pués de la evaporación de la solución orgánica seca, se cris-
20. taliza dos veces en acetato de etilo. Rendimiento, 60 %.
El sólido no tiene un punto de fusión bien definido. Se des-
compone lentamente entre 200 y 290°C.

Las bandas de absorción U.V. visibles más signifi-
cativas, son las siguientes:

25.	λ max (m μ)	485	340	262
	E ₁ ¹ % 1 cm.	160,5	291,5	386,5

Análisis:

Calculado para C ₄₁ H ₅₁ NO ₁₃	C, 64,30; H, 6,71; N, 1,83;
Encontrado	C, 63,62; H, 6,61; N, 1,30

410754



EJEMPLO 2

3-(3-fenilhidrazono-1-butenil)-rifamicina SV

A una solución de 1,5 g del compuesto del ejemplo anterior en 50 ml de tetrahidrofurano, se añade, a temperatura ambiente, bajo agitación, 220 mg de fenilhidrezina. Después de 2 horas, se recoge en un filtro el sólido precipitado y se cristaliza en acetato de etilo. Rendimiento, 60 %. El sólido se descompone tras calentarlo por encima de 210°C.

5.

λ max (m μ)	475	360
E ₁ ¹ % 1 cm	181,9	379,9

10.

Análisis:

Calculado para C ₄₇ H ₅₇ N ₅ O ₁₂	C, 65,95; H, 6,71; N, 4,91;
Encontrado	C, 65,40; H, 6,58; N, 4,35.

EJEMPLO 3

3-(3-fenetiloximino-1-butenil)-rifamicina SV

El compuesto se prepara en la forma descrita en el ejemplo anterior empleando O-fenetilhidroxilamina en lugar de hidrazina. Rendimiento, 87 %. P.f. 168-173°C con descomposición.

20.

λ max (m μ)	478	337	262
E ₁ ¹ % 1 cm.	136,5	339,4	349,5

Análisis:

Calculado para C ₄₉ H ₆₀ N ₂ O ₁₃	C, 66,50; H, 6,83; N, 3,16;
Encontrado	C, 65,23; H, 6,81; N, 3,28.

25.

EJEMPLO 4

3-(3-benciloximino-1-butenil)-rifamicina SV

A una solución de 800 mg del compuesto del ejemplo 1 en 40 ml de tetrahidrofurano, se añaden 160 mg de hidrocloreuro de O-bencilhidroxilamina y 2 ml de piridina. Después de 60 minutos, la solución se concentra hasta sequedad y el residuo

30.



se disuelve en acetato de etilo. La solución orgánica se lava con agua y se evapora entonces in vacuo. El residuo, cristalizado en acetato de etilo, funde a 183-190°C con descomposición.

Rendimiento, 60 %.

5.	λ max (m μ)	470	336	258	Punto de inflexión a 230
	E ₁ ¹ % 1 cm.	154,8	338	391	

Análisis:

Calculado para C ₄₈ H ₅₈ N ₂ O ₁₃	C, 66,19; H, 6,71; N, 3,22
Encontrado	C, 65,08; H, 6,61; N, 2,67

10.

EJEMPLO 5

3-(β -formil-vinil)-rifamicina SV

El compuesto se prepara de acuerdo con el mismo procedimiento del ejemplo 2, empleando 1-amino-4-metilpiperazina en lugar de fenilhidrazina. Rendimiento, 65 %. P.f. 160°C con descomposición.

15.

λ max (m μ)	480	338	261	271
E ₁ ¹ % 1 cm	351,6	369,1	295,8	136,8

Análisis:

Calculado para C ₄₆ H ₆₂ N ₄ O ₁₂	C 64,02; H, 7,24; N, 6,49
Encontrado	C 64,12; H, 7,24; N, 5,78

20.

EJEMPLO 6

3-(β -formil-vinil)-rifamicina SV

Se suspende 1 g de 3-formilrifamicina SV en 70 ml de tetrahydrofurano y se añade una mezcla de 1 ml de piperidina y 0,2 ml de ácido acético tras enfriar en un baño de hielo a 0-5°C. Después de la adición de 0,2 ml de acetaldehído, la mezcla se agita durante 2 horas y se concentra entonces a un pequeño volumen bajo vacío. El residuo se diluye con acetato de etilo y la solución se lava con agua ácida. La fase orgánica se evapora y el residuo se cromatografía a través de

30.

410754



100 g de gel de sílice tamponado a pH 6, eluyendo con cloroformo:acetona 1:1. Rendimiento, 250 mg del producto del título. P.f. > 200°C con descomposición.

5.	λ max (m μ)	500	385
	E ₁ ¹ %	176	410
	1 cm.		

Análisis:

Calculado para C₄₀H₄₉NO₁₃ C, 63,90; H, 6,57; N, 1,86;

Encontrado C, 63,46; H, 6,68; N, 1,77.

EJEMPLO 7

10. 3- β -(4-metil-1-piperazinil)imino-1-propanil-rifamicina SV

Este compuesto se prepara a partir de 3-(β -formilvinil)-rifamicina SV y 1-amino-4-metilpiperazina, de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 2. P.f. > 200°C con descomposición.

15.	λ max (m μ)	485	384	260
	E ₁ ¹ %	164	426	177
	1 cm			

Análisis:

Calculado para C₄₀H₆₂N₄O₁₂ C, 63,66; H, 7,12; N, 6,60;

Encontrado C, 64,60; H, 6,64; N, 5,91.

EJEMPLO 8

20. 3- β -oxo-2-(terc-butoxicarbonil)-1-butenil-rifamicina SV

El compuesto se prepara por reacción de 3-formilrifamicina SV y acetoacetato de terc-butilo, de acuerdo con las condiciones del ejemplo 6. P.f. 140-145°C.

25.	λ max (m μ)	475	370	280
	E ₁ ¹ %	90,4	101,5	511,3
	1 cm			

Análisis:

Calculado para C₄₆H₅₉NO₁₅ C, 63,80; H, 6,87; N, 1,62;

Encontrado C, 63,91; H, 6,90; N, 1,72.



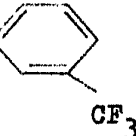
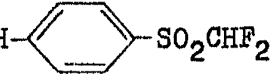
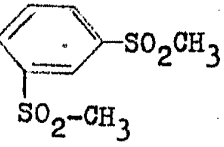

410754₂₀ -



Los compuestos descritos en los ejemplos anteriores se proporcionan solo con fines ilustrativos, debiéndose entender que otros compuestos comprendidos dentro del significado de la fórmula genérica I son también útiles para la finalidad que acaba de explicarse. Por ejemplo, las rifamicinas de fórmula I, o sus derivados 25-desacetilo y hexahidro, en donde R, R₂ y X tienen los siguientes significados, pueden prepararse de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.


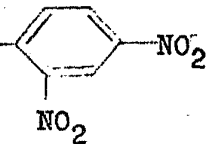


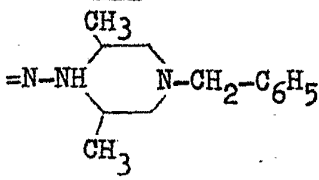
R	R ₂	X
H	H	<chem>=N-C6H5</chem> <chem>NO2</chem>
H	H	<chem>=N-NH-</chem> <chem>c1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>
H	H	<chem>=N-N</chem> <chem>C1CCNCC1</chem>
H	H	<chem>=N-N</chem> <chem>C1CC(C)N(C1)C2=CC=CC=C2</chem>
H	H	<chem>=N-NH-</chem> <chem>(CH2)3-C6H5</chem>
H	H	<chem>=N-N</chem> <chem>(C3H7)2</chem>
H	H	<chem>=N-NH-</chem> <chem>C1=CC=CC=C1</chem>



R	R ₂	X
H	H	=NO-(CH ₂) ₇ -CH ₃
CH ₃	H	=N-NHCH ₃
CH ₃	H	=N-NH-CH ₂ -CH ₂ OH
CH ₃	H	=N-NH-  -CH ₃
CH ₃	H	=N-NH-CH ₂ - 
CH ₃	H	=N-N(CH ₃) ₂
CH ₃	H	=N-NH-  -CF ₃
CH ₃	H	=N-NH-  -SO ₂ CHF ₂
CH ₃	H	=N-NH-  -SO ₂ CH ₃ SO ₂ -CH ₃
CH ₃	H	=NO-  -H
CH ₃	H	=N-O-CH(C ₃ H ₇) ₂
CH ₃	H	=N-O-CH(C ₆ H ₅) ₂

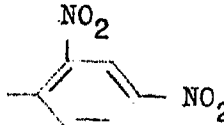
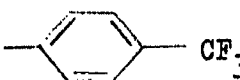
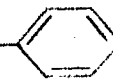

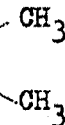


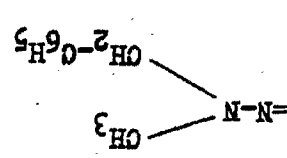
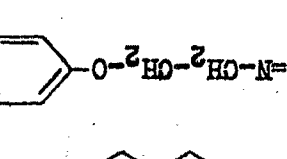
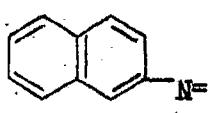

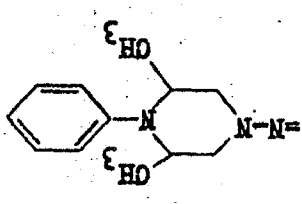
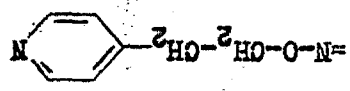
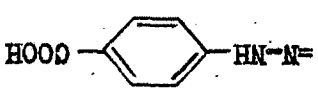
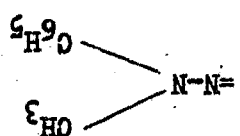
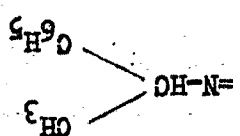
410754

R	R ₂	X
-C ₂ H ₅	H	=O
-C ₂ H ₅	H	=N- 
-C ₂ H ₅	H	=N-NH ₂
-C ₂ H ₅	H	=N-NH- 
-C ₂ H ₅	H	=N-N(C ₂ H ₅) ₂
-C ₂ H ₅	H	=N-N(C ₆ H ₅) ₂
-C ₂ H ₅	H	=N-NH- 
-C ₂ H ₅	H	=N-NH-CH ₂ -CH=CH ₂
-C ₂ H ₅	H	=N-NH-CH ₂ -CH=CH-C ₆ H ₅
-C ₂ H ₅	H	=N-NH-CH ₂ -CH ₂ -N(C ₂ H ₅) ₂
-C ₂ H ₅	H	=N-N- 
-C ₂ H ₅	H	=N-NH- 



410754

R	R ₂	X
-C ₂ H ₅	H	=NO-geranilo
-C ₂ H ₅	H	=N-O(CH ₂) ₃ -CH ₃
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	H	=O
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	H	=N-NH-C ₂ H ₅
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	H	=N-N(CH ₂ -CH ₂ OH) ₂
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	H	=N-NH- 
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	H	=N-NH- 
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	H	=N-OH
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	H	=N-O-C ₂ H ₅
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	H	=N-O-CH ₂ -CH ₂ -O- 
-(CH ₂) ₆ -CH ₃	H	=N-N- 
-(CH ₂) ₆ -CH ₃	H	=O
-(CH ₂) ₆ -CH ₃	H	=N-(CH ₂) ₃ -N- 

	H	-O ₃ H ₇
	H	-O ₃ H ₇
	H	-O ₃ H ₇
	H	-O ₃ H ₇
	H	-O ₂ H ₅
	H	-(CH ₂) ₆ -CH ₃
	H	-(CH ₂) ₆ -CH ₃
	H	-(CH ₂) ₆ -CH ₃
	H	-(CH ₂) ₆ -CH ₃
X	R ₂	R

410754





410754

R	R ₂	X
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	H	$=\text{N}-\text{NH}_2$
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	H	$=\text{N}-\text{N} \begin{cases} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{cases}$
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	H	$=\text{N}-\text{NH} \begin{array}{c} \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \end{array}$
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	H	$=\text{N}-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	H	$=\text{N}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	H	$=\text{N}-\text{O} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \end{array}$
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	H	$=\text{N}-\text{OH}$
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	H	$=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
$-\text{CH}_3$	$-\text{C}_3\text{H}_7$	$=\text{O}$
$-\text{CH}_3$	$-\text{C}_3\text{H}_7$	$=\text{N}-\text{N} \begin{cases} \text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \end{cases}$

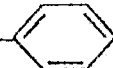
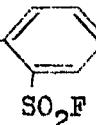
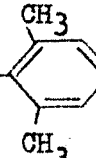


410754

R	R ₂	X
-CH ₃	-C ₃ H ₇	<chem>=N-N1CCCCC1NH</chem>
-CH ₃	-C ₃ H ₇	<chem>=N-NH-C1=CC=C(C=C1)S(=O)(=O)C(F)(F)F</chem>
-CH ₃	-C ₃ H ₇	<chem>=N-NH-C1=CC=C(C=C1)[N+](=O)[O-]</chem>
-CH ₃	-C ₃ H ₇	<chem>=N-N1CCCC1</chem>
-CH ₃	-C ₃ H ₇	<chem>=N-O-CH2-C#C</chem>
-CH ₃	-C ₃ H ₇	<chem>=N-O-CH(COOH)C(C)C</chem>
-C ₃ H ₇	-CH ₃	=O
-C ₃ H ₇	-CH ₃	<chem>=N-N(C)C(C)C</chem>
-C ₃ H ₇	-CH ₃	<chem>=N-N1CCCCC1NCC2=CC=CC=C2</chem>
-C ₃ H ₇	-CH ₃	<chem>=N-O-CH2-CH2-C1=CC=CC=C1</chem>



410754

R	R ₂	X
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{C}_3\text{H}_7$	=O
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{C}_3\text{H}_7$	$=\text{N}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \diagup \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagdown \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$
$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{C}_3\text{H}_7$	$=\text{N}-\text{N} \begin{matrix} \diagup \text{NH} \\ \diagdown \end{matrix}$
$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	=O
$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	$=\text{N}-\text{NHCH}_2-\text{CH}_2-$ 
$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	$=\text{N}-\text{N} \begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{NH} \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	$=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	$=\text{N}-\text{NH}-$  $-\text{SO}_2\text{F}$
$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	$=\text{N}-\text{NH}-$  $-\text{C} \begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$

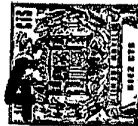


410754

R	R ₂	X
$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	
$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	
$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	

NOTA

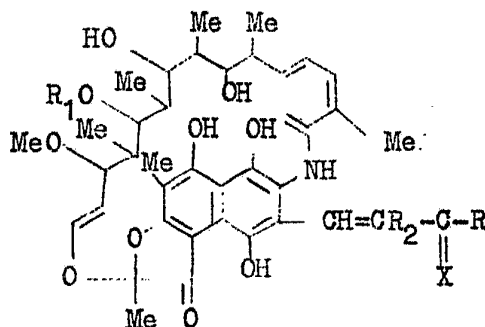
Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Italia con el nº 19524 A/72 de 19 de enero de 1972, acogién- dose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios



Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR DERIVADOS 3-ALQUENILO DE RIFAMICINA SV; caracterizándose por lo siguiente:

5.

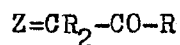
1.- Procedimiento para preparar derivados 3-alqueni-
lo de rifamicina SV, de fórmula general



10.

en la que R representa hidrógeno, alquilo o aril-alquilo inferior, R₁ representa hidrógeno o acetilo, R₂ representa hidrógeno, alquilo inferior o terc-butoxicarbonilo, X representa oxígeno, imino, imino sustituido, oximino, oximino sustituido, hidrazono y radicales hidrazono sustituidos, y los derivados 16, 17, 18, 19, 28, 29-hexahidro de los mismos; caracterizado porque comprende hacer reaccionar 3-formilrifamicina SV o su derivado 25-desacetilo ó 16, 17, 18, 19, 28, 29-hexahidro, con un derivado carbonílico de fórmula:

15.



20.

en la que Z es H₂ ó (C₆H₅)₃P, teniendo R y R₂ el significado indicado anteriormente y, cuando se desea que X sea imino sustituido, oximino, hidrazono o hidrazono sustituido, se trata el derivado carbonílico obtenido con un compuesto seleccionado entre aminas primarias, hidrazinas e hidroxilaminas.

2.- Procedimiento para preparar derivados 3-alqueni-

amc

410754 - 31 -



lo de rifamicina SV, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 31 hojas escritas a máquina por una sola cara.

5.

Madrid, 18 ENE. 1973
GRUPPO LEPETIT S.p.A.

J. GOMEZ ACEBO Y MODEY
F. F. Firmador L. Costa Ferrández

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "J. Gomez Acebo y Modey".

ACE