

Int. Cl.: COFE//A61K
18



F.C. 27-2-75

410755

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA RIFAMICINA 3-SUSTITUIDA

=====

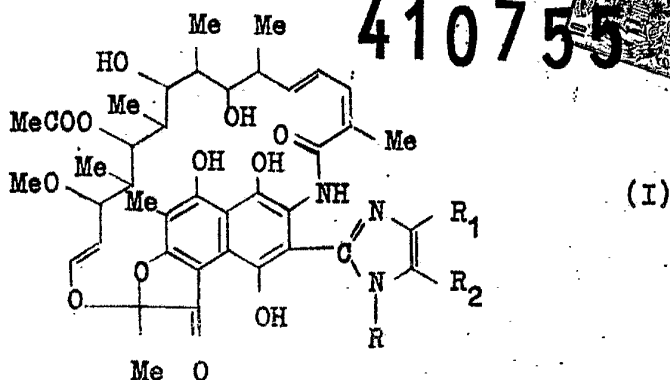
Solicitante: GRUPPO LEPETIT S.p.A., entidad italiana, residente en
Via Durando 38, MILAN, Italia.

=====

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar compuestos de rifamicina y, más particularmente, para preparar rifamicinas 3-sustituídas de fórmula I y sus derivados 25-desacetilo y 16, 17, 18, 19, 28, 29-hexahidro.

5.

18 ENE 1973
410755



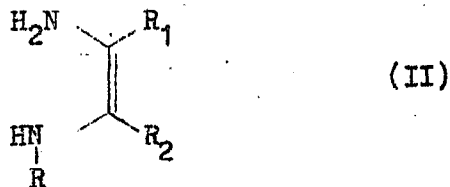
5. en la que R representa hidrógeno, alquilo inferior, fenilo y fenilalquilo inferior; R₁ y R₂ representan conjuntamente una cadena carbocíclica que forma con el doble enlace de la mitad imidazol adyacente un anillo bencénico, un anillo bencénico mono o poli-sustituído en el cual los sustituyentes se eligen independientemente entre alquilo inferior, alcoxi inferior, halo, carboxi, carbalcoxi, sulfo, sulfamoilo, nitro, trifluorometilo, carbamilo, mono y di-alquilo inferior-carbamilo y metilendioxi, un resto aromático polinuclear, fusionado, sustituido o insustituído, incluyendo 2-3 anillos condensados de 5-6 átomos de carbono cada uno.

10. Tal como se emplean en esta Memoria, los radicales "alquilo inferior" y los radicales "alcoxi inferior", están representados ordinariamente por cadenas alifáticas rectas o ramificadas de 1 a 6 átomos de carbono.

15. En los compuestos de rifamicina de fórmula I, en la que, y de acuerdo con la definición anterior, R₁ y R₂ representan conjuntamente cadenas carbocíclicas que forman un "resto aromático polinuclear fusionado", el sustituyente de la posición 3 está representado ordinariamente por un anillo imidazol condensado con una mitad naftaleno, acenafteno, fluoreno, antraceno o fenantreno.

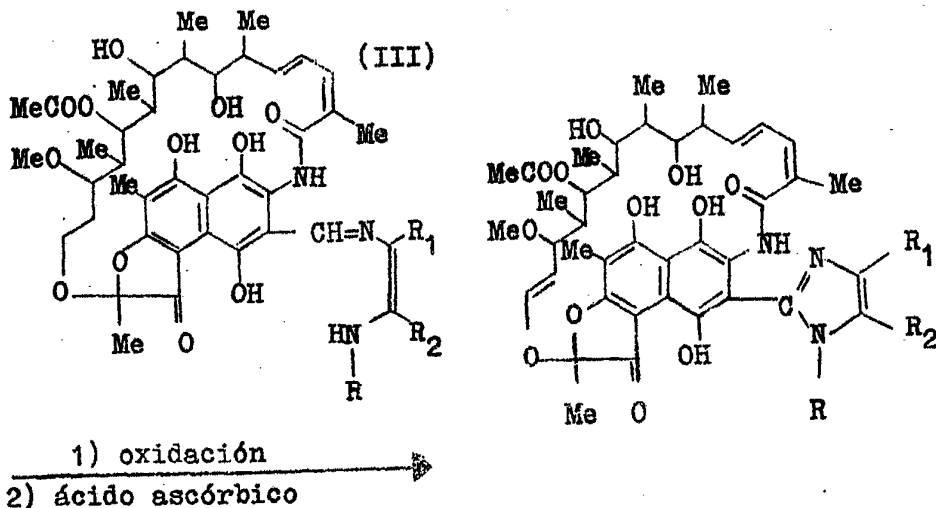
Estas mitades aromáticas pueden contener también grupos sustituyentes, tales como oxo, hidroxilo y sulfuro.

El procedimiento de la presente invención para preparar los compuestos de fórmula I, comprende la reacción de 3-formilrifamicina SV o su derivado 25-desacetilo o hexahidro, con una orto-diamina aromática de fórmula:



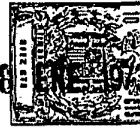
en la que R, R₁ y R₂ se definen como anteriormente.

La base de Schiff (III) obtenida, o su forma isomérica de imidazolina, se oxida entonces para formar un derivado de imidazol de acuerdo con el siguiente esquema, el cual ilustra el caso en donde se utiliza, como material de partida, 3-formilrifamicina SV. En el caso de que la mitad rifamicina se haya transformado en la forma quinona durante la etapa de oxidación, el lavado con solución de ácido ascórbico u otros reactivos equivalentes, reduce la quinona a la correspondiente hidroquinona:



410755

- 4 -



Los agentes oxidantes más adecuados, están representados por aire, sales cúpricas, óxido mercuríco, dióxido de manganeso, nitrito de isoamilo, ferricianuro potásico y tetraacetato de plomo.

5. En ciertos casos, puede que no sea necesario el aislamiento de la base de Schiff o de la correspondiente imidazolina isomérica, puesto que realizando la reacción entre la diamina aromática y el derivado de 3-formilrifamicina SV en presencia de aire u otros aceptores de hidrógeno, puede recuperarse directamente el compuesto de imidazol final.

10. De acuerdo con un método preferido para llevar a cabo la invención, se añade, a temperatura ambiente, una cantidad equimolecular de una orto-diamina seleccionada de fórmula II, a una solución de 3-formilrifamicina SV, o su derivado 25-desacetilo o hexahidro. La mezcla se mantiene a una temperatura que puede variar desde la temperatura ambiente hasta el punto de ebullición del disolvente, hasta completarse la reacción, es decir, durante un periodo de tiempo que oscila entre 20 minutos y 3 horas, recuperándose el compuesto de reacción mediante separación del disolvente. El disolvente preferido generalmente es tetrahidrofurano pero pueden utilizarse ventajosamente otros disolventes orgánicos, tales como, por ejemplo, dioxano o alcoholes inferiores. El producto bruto puede purificarse mediante cristalización o cromatografía o, si el compuesto obtenido no se encuentra en la forma imidazol, puede someterse como tal a la etapa de oxidación.

20. La oxidación se efectúa preferiblemente en una mezcla de ácido acético y un hidrocarburo inferior clorado, empleando aproximadamente una cantidad equimolecular de tetraacetato de plomo como agente oxidante. La reacción se efectúa
- 30.

410755

-5 410755



- a una temperatura comprendida entre -5 y 10°C y el producto final se recupera después de 1-3 horas aproximadamente. La solución se evapora hasta sequedad después de haber lavado la capa orgánica con una solución acuosa al 10 % de ácido ascórbico para reducir la forma quinónica de la rifamicina a su correspondiente hidroquinona.
- 5.
- Como anteriormente se ha mencionado, en muchos casos cuando la condensación entre la diamina aromática y el derivado 3-formilrifamicina, o cuando la elaboración de los productos de reacción se efectúa en presencia de aire a temperatura ambiente, el compuesto resultante no tiene porqué experimentar la etapa de ciclización oxidante y el lavado con ácido ascórbico, puesto que se encuentra ya en la forma imidazol final como en la fórmula I.
- 10.
- Los nuevos compuestos son sólidos coloreados que pueden cristalizarse en metanol, acetona, acetato de etilo, tetrahidrofurano, dioxano o mezclas de los mismos.
- 15.
- En función del significado de R_1 y R_2 , el compuesto puede ser más o menos soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. Así, por ejemplo, cuando R_1 y R_2 representan un anillo bencénico, los compuestos son muy solubles en acetato de etilo, mientras que cuando los dos símbolos representan una mitad aromática más pesada, es necesario un disolvente más potente, tal como, por ejemplo, cloroformo o dimetil formamida.
- 20.
- 25.
- Los compuestos de la invención tienen una buena actividad antibacterial contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En particular, miembros representativos de la nueva clase de compuestos, muestran una actividad notable contra Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Streptococcus
- 30.



5. hemolyticus, Diplococcus pneumoniae y Mycobacterium tuberculo-
sis H₃₇R_V. En estos casos, la concentración mínima inhibito-
ria oscila entre 0,001 y 0,05 µg/ml aproximadamente. La acti-
vidad se confirmó también en presencia de fluidos biológicos,
tal como suero bobino. Los compuestos de esta invención exhi-
ben también un buen efecto inhibitorio contra cepas de Staphy-
lococcus aureus resistente a la rifamicina. En experimentos
representativos in vitro con los compuestos de los ejemplos
4, 5, 6 y 8, el crecimiento de una cepa de Staphylococcus
10. aureus Tour, resistente a la rifamicina, fué inhibido por una
concentración que oscilaba entre 1 y 5 µg/ml.

La toxicidad de estos compuestos es muy baja.

Otra característica muy importante de los compues-
tos obtenidos según la invención, reside en su actividad de
15. inhibición de polimerasas DNA que son características de lin-
foblastos sanguíneos leucémicos en humanos y contra las trans-
ferasas (polimerasas) nucleotídicas, típicas, de virus no
utilizados por las células normales. A partir de los estudios
sobre miembros representativos de grupos de virus, se sabe que
20. los mismos pueden transportar o inducir en las células anfi-
trionas polimerasas como una parte esencial de su aplicación.
De este modo, existen virus tales como picornavirus o polio-
virus que inducen la polimerasa RNA dependiente de RNA mien-
tras que otros grupos, tales como virus de leucemia-sarcoma,
25. transportan una polimerasa DNA dependiente de RNA. La presen-
cia y el papel muy importante de la polimerasa DNA dependien-
te 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 recien-
30. te 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.

410755

- 8 -



ENE. 1973

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 quimioterapia 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 la leucemia y para otras terapias cancerígenas. La actividad

20. inhibitoria de los compuestos obtenidos según la invención, ha sido ensayada sobre polimerasa DNA dependiente de RNA de virus de sarcoma de murina y la actividad de polimerasa DNA dependiente de RNA de enzimas purificadas. La inhibición fué

25. ensayada de acuerdo con los métodos descritos por 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-deoxiribosido tritiado) en

30. la fracción insoluble. Un ejemplo típico de los procedimien-



tos 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) (células 78A1) y de células de ratón transformadas en virus de sarcoma de murina (aislamiento de Harvey) (células MEH) 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 10. 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 15. 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 20. 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 (12-18 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 % PN-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.

5.

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

15.

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

20.

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
5. 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.
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 extracta y purifica de linfocitos sanguíneos normales (estimulados con PHA) y linfocitos sanguíneos leucémicos y células linfoidas (1788), mediante homogeneización en tampón hipoténico seguido por Triton X 100 y/o elevada extracción con sales del pellet extraliso-
25. somal. Después de la centrifugación diferencial, los extractos celulares son purificados adicionalmente mediante celulosa DEAD, fosfocelulosa y cromatografía en columna Sephadex G 200.



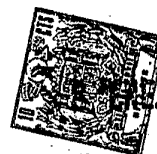
1973

410755

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 (³H-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 deoxinucleóximo (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,
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

410755



1973

5. 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.

10. Se averiguó que las concentraciones comprendidas entre 5 y 10 µg/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.

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.

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 BALB/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 rifamicina (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.

410755



En este mismo método, se estudia el virus de esto-
matitis vesicular, serotipo de New Jersey. Los métodos emplea-
dos 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-(2-bencimidazolil)-rifamicina SV

15. Una solución de 2,7 g de 3-formilrifamicina SV y
0,33 g de o-fenilendiamina, en 30 ml de tetrahidrofurano, se
mantiene, durante 30 minutos, bajo agitación a 0-5°C. Después
de la evaporación del disolvente, el sólido se utiliza como
tal para la siguiente etapa. Una muestra pura, cristalizada
en metanol, funde a 252-255°C. Rendimiento, 80 %. Se disuelve
20. 1 g de la base Schiff así obtenida en una mezcla de 10 ml de
ácido acético y 20 ml de tetracloruro de carbono y, después
de enfriar en un baño de hielo, se añaden a la misma 0,5 g
de tetraacetato de plomo. Después de 2 horas a 0-5°C, la mez-
cla se diluye con tetracloruro de carbono y se lava con una
solución acuosa al 10 % de ácido ascórbico.

25. La fase orgánica se seca y se concentra entonces
hasta sequedad. El residuo sólido se cristaliza en acetona
o metanol. P.f. 189-193°C (descomposición). Rendimiento, 40 %

| | | |
|--|-------|-------|
| λ max (m μ) | 325 | 460 |
| E ₁ ¹ % 1 cm. | 322,5 | 174,4 |

410755



EJEMPLO 2

25-desacetil-3-(2-bencimidazolil)-rifamicina SV

Una solución de 5 g de 25-desacetil-3-formilrifamicina SV y 0,7 g de o-fenilendiamina, en 100 ml de tetrahydrofurano, se mantiene bajo agitación, durante 2 horas, a temperatura ambiente, en un recipiente abierto.

Mediante evaporación del disolvente, se obtiene un producto bruto el cual, después de la cristalización en metanol, funde a 195-196°C. Rendimiento, 2,5 g.

10.

| | | |
|---------------------------|-----|-----|
| λ max (m μ) | 326 | 462 |
| E ₁ % 1 cm. | 351 | 191 |

EJEMPLOS 3 - 8

De acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo anterior, y empleando los compuestos de partida apropiados o-diamina y 3-formilrifamicina SV, se obtienen las siguientes rifamicinas SV 3-sustituídas.

| Ejem. No. | Amina de partida | Sustituyente en la posición 3 de la rifamicina SV | P.f. °C | λ max m μ | E 1% 1 cm. |
|-----------|------------------------------|---|-------------|-----------------------|----------------|
| 3 | 3,4-toluen-diamina | 5-metil-2-bencimidazolil- | 136-7 | 464 328 | 165,5 316,4 |
| 4 | 4,5-dimetil-o-fenilendiamina | 5,6-dimetil-2-bencimidazolil- | 180 | 465 332 | 149 296,3 |
| 5 | 4,5-acenaften-diamina | 4,5-dihidro-7H-acenaft/4,5-d/imidazol-8-il | 220 desc. | 485 360 | 140,4 246,1 |
| 6 | 4-cloro-o-fenilen-diamina | 5-cloro-2-bencimidazolil | 215-6 desc. | 465 328 | 166,1 326 |
| 7 | 2,3-fluoren-diamina | 1,9-dihidro-fluoreno/2,3-d/imidazol-2-il | 200 desc. | 485 356 | 132,5 348,1 |
| 8 | 1,2-diamino-antraquinona | 6,11-dioxo-antra/1,2-d/imidazol-2-il | 230 desc. | 429 | 176 |

410755



EJEMPLO 9

3-(1H-9-oxo-fluoreno/2,3-d/imidazol-2-il)-rifamicina SV

5. Se hierve durante 3 horas, una solución de 4,2 g de 2,3-diaminofluoren-9-ona y 14 g de 3-formilrifamicina en 200 ml de tetrahidrofurano. Después de enfriar, el sólido precipitado se recupera por filtración. P.f. 230°C con descomposición.

Rendimiento, 12,5 g.

| | | | | |
|-----|--|-------|-------|-------|
| | λ max (m μ) | 470 | 310 | 256 |
| 10. | E ₁ ¹ % 1 cm. | 139,2 | 357,1 | 388,3 |

EJEMPLO 10

3-(5-carboxi-2-bencimidazolil)-rifamicina SV

15. El compuesto del título se obtiene siguiendo el procedimiento del ejemplo 10, pero utilizando ácido 3,4-diaminobenzóico en lugar de la 2,3-diaminofluoren-9-ona. P.f. 215°C con descomposición.

| | | | |
|--|--|-----|-------|
| | λ max (m μ) | 462 | 328 |
| | E ₁ ¹ % 1 cm. | 161 | 310,1 |

20. Los datos microanalíticos de los compuestos descritos en los ejemplos están de acuerdo con los valores teóricos.

De acuerdo con el procedimiento descrito en los ejemplos anteriores, se separan las siguientes rifamicinas SV 3-sustituídas, o sus correspondientes derivados 25-desacetilo o hexahidro:

| | | |
|-----|------------------------------------|--|
| 25. | <u>Amina de partida</u> | <u>Sustituyente en la posición 3 de la rifamicina SV</u> |
| | 4-nitro-o-fenilendiamina | 5-nitro-2-bencimidazolilo |
| | 4-dimetilcarbamil-o-fenilendiamina | 5-dimetilcarbamil-2-bencimidazolilo |
| | 4-butil-o-fenilendiamina | 5-butil-2-bencimidazolilo |



410755

| | | |
|-----|--|---|
| | 4-pentil-o-fenilendiamina | 5-pentil-2-bencimidazolilo |
| | 3-nitro-o-fenilendiamina | 4-nitro-2-bencimidazolilo |
| | 4-bromo-o-fenilendiamina | 5-bromo-2-bencimidazolilo |
| | 4-fluoro-o-fenilendiamina | 5-fluoro-2-bencimidazolilo |
| 5. | 4,5-dicloro-o-fenilendiamina | 5,6-dicloro-2-bencimidazolilo |
| | 4,5-dimetoxi-o-fenilendiamina | 5,6-dimetoxi-2-bencimidazolilo |
| | 4,5-dietoxi-o-fenilendiamina | 5,6-dietoxi-2-bencimidazolilo |
| | 4,5-metilendioxi-o-fenilendiamina | 5,6-metilendioxi-2-bencimidazolilo |
| 10. | 4,5-dinitro-o-fenilendiamina | 5,6-dinitro-2-bencimidazolilo |
| | 4-sulfamoil-o-fenilendiamina | 5-sulfamoil-2-bencimidazolilo |
| | N-etil-o-fenilendiamina | 1-etil-2-bencimidazolilo |
| | N ¹ -metil-4-trifluormetil-o-fenilendiamina | 1-metil-5-trifluormetil-2-bencimidazolilo |
| 15. | N ¹ -metil-4,5-dimetoxi-o-fenilendiamina | 1-metil-5,6-dimetoxi-2-bencimidazolilo |
| | N-bencil-o-fenilendiamina | 1-bencil-2-bencimidazolilo |
| | N-fenil-o-fenilendiamina | 1-fenil-2-bencimidazolilo |
| | Ester etílico del ácido 3,4-diaminobenzóico | 5-carbetoxi-2-bencimidazolilo |
| 20. | Acido 2-cloro-4,5-diaminobencenosulfónico | 6-cloro-5-sulfo-2-bencimidazolilo |
| | 9,10-fenantrendiamina | fenantro[9,10-d]imidazol-2-ilo |
| | 1,2-naftalendiamina | nafto[1,2-d]imidazol-2-ilo |
| | Acido 1,2-diamino-4-naftalen-sulfónico | 5-sulfo-nafto[1,2-d]imidazol-2-ilo |
| 25. | Acido 1,2-diamino-4-fenantren-sulfónico | 5-sulfo-fenantro[1,2-d]imidazol-2-ilo |

N O T A
=====

30. 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



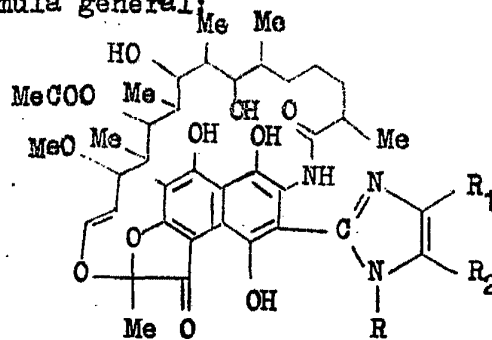
410755

principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Italia con el nº 19525 A/72 de 19 de enero de 1972, acogiéndose 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 UNA RIFAMICINA 3-SUSTITUIDA; caracterizándose por lo siguiente:

5.

10.

1.- Procedimiento para preparar una rifamicina 3-sustituída, de fórmula general:



15.

20.

25.

en la que R representa hidrógeno, alquilo inferior, fenilo y fenilalquilo inferior; R₁ y R₂ representan conjuntamente una cadena carbocíclica que forma con el doble enlace de la mitad imidazol adyacente un anillo bencénico, un anillo bencénico mono o poli-sustituído en el cual los sustituyentes se eligen independientemente entre alquilo inferior, alcoxi inferior, halo, carboxi, carbalcoxi, sulfo, sulfamoilo, nitro, trifluorometilo, carbamilo, mono y di-alquilo inferior-carbamilo y metilendioxi, un resto aromático polinuclear, fusionado, sustituido o insustituído, incluyendo 2-3 anillos condensados de 5-6 átomos de carbono cada uno; y sus derivados 25-desacetilo y 16, 17, 18, 19, 28, 29-hexahidro; caracterizado porque comprende condensar 3-formilrifamicina, o sus derivados 25-desacetilo ó 16, 17, 18, 19, 28, 29-hexahidro, con una

mg

