



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 65254

C Patentti ja Rekisteri 10.14.1984

(45) Patent meddelat

(51) Kv.kk.³/Int.Cl.³ C 07 D 498/08

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansöknin	783639
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	28.11.78
(23) Alkuperäpäivä — Giltighetsdag	28.11.78
(41) Tullut julkiseksi — Blivt offentlig	30.05.79
(44) Nähtävissäpanon ja kuuljulkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.12.83
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	29.11.77
Italia-Italien(IT) 3620 A/77	

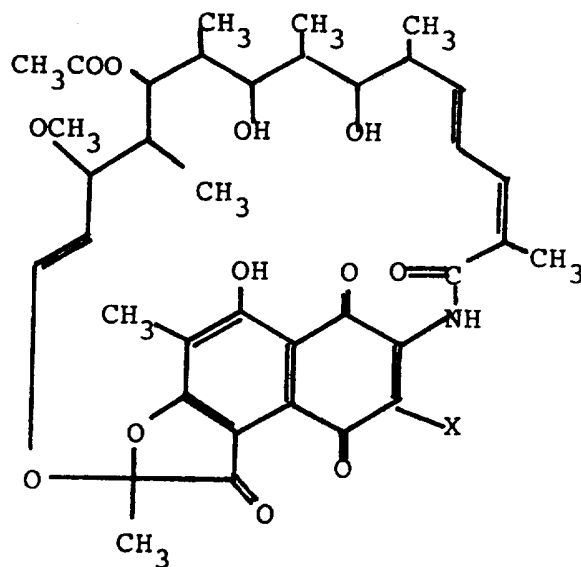
(71) Alfa Farmaceutici S.p.A., Via Ragazzi del '99, n. 5, I-40133 Bologna,
Italia-Italien(IT)

(72) Egidio Marchi, Bologna, Lauretta Montecchi, Bologna,
Italia-Italien(IT)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Parannettu menetelmä 3-jodi- ja 3-bromirifamysiini S:n valmistamiseksi
- Förbättrat förfarande för framställning av 3-jod- och 3-bromrifamysin S

Keksinnön kohteena on parannettu menetelmä rifamysiini S:n
3-halogeenijohdannaisten valmistamiseksi, erityisesti 3-jodi- ja
3-bromirifamysiini S:n valmistamiseksi, joilla on kaava



jossa X on jodi tai bromi, ja jotka ovat käyttökelpoisia välituotteinä valmistettaessa 3-substituoituja terapeuttisesti aktiivisia rifamysiinejä, koska kinoniosassa oleva halogeeni on kemiallisesti huomattavan reaktiivinen. Niiden kemiallinen reaktiivisuus on samankaltainen kuin DE-hakemusjulkaisusta 2 548 128 tunnettujen 3-atsidorifamysiinien reaktiivisuus, mutta niiden etuna näihin 3-atsidorifamysiineihin verrattuna on, että niitä voidaan valmistaa paljon suuremmin saannoin tarvitsematta suorittaa hankalia puhdistuksia silikageelipylväissä ja käyttää vaarallisia reagentteja, kuten NaN_3 :a tai HN_3 :a.

3-halogeenirifamysiini S ja SV ovat tunnettuja; niiden valmistusta kuvataan julkaisussa J. Am. Chem. Soc., 98: (1976) 22 s. 7065-7066). Tässä tunnetussa menetelmässä 3-jodirifamysiini S valmistetaan saattamalla yksi rifamysiini SV-mooli reagoimaan yhden moolin kanssa kiinteässä tilassa olevaa alkuainejodia pyridiinin läsnäollessa 25°C :ssa. Reaktiotuotetta käsitellään sen jälkeen kaliumferri-syanidin vesiliuoksella ja se puhdistetaan silikageeliä sisältävällä kromatografiapylväällä. Puhtaan 3-jodirifamysiini S:n saanto on 37%.

Samassa artikkelissa esitetään myös menetelmä 3-bromirifamysiini S:n valmistamiseksi, jolloin yksi rifamysiini SV-mooli saataan reagoimaan 1,8 moolin kanssa pyridiinivetybromidiperbromidia etanolissa alhaisessa lämpötilassa. Reaktiotuote puhdistetaan kromatografisesti silikageelipylväessä. Puhtaan 3-bromirifamysiini S:n saanto on 30%.

DE-hakemusjulkaisussa 2 548 128 esitetyssä menetelmässä 3-bromi-rifamysiini S:ien valmistamiseksi mooliekvivalenttiset määrät bromia tai N-bromisukkiini-imidiä ja rifamysiini S:ää saatetaan reagoimaan keskenään dimetyylisulfoksidissa tai dimetyylisulfoksidin ja jonkin toisen aproottisen dipolaarisen liuottimen seoksessa ympäristön lämpötilassa noin päivän ajaksi. Reaktiotuotetta käsitellään vedellä, jolloin saadaan raakatuotetta, joka puhdistetaan joko käsittelemällä sitä dimetyylieetterin ja veden seoksella tai kromatografisesti silikageelipylväällä. Puhtaan 3-bromirifamysiini S:n saanto on 29-63% teoreettisesta.

3-jodirifamysiini S muunnetaan 3-jodirifamysiini SV:ksi käsittelemällä sitä askorbiinihapolla 60% vettä sisältävässä metanolissa. 3-bromirifamysiini S muutetaan 3-bromirifamysiini SV:ksi samalla tavalla.

Rifamysiini S:n ja SV:n 3-halogeenijohdannaiset ovat käyttökelpoisia välituotteina valmistettaessa rifamysiini S:n ja SV:n mikrobiologisesti aktiivisia johdannaisia. Tunnetuilla menetelmillä saadaan kuitenkin 3-halogeenijohdannaisia vain pienin saannoin, joten niiden teollinen hyväksikäyttö ei ole ollut mahdollista.

Keksinnön mukaiselle paranneltulle menetelmälle 3-jodi- ja 3-bromirifamysiini S:n valmistamiseksi on tunnusomaista että rifamysiini S saatetaan reagoimaan yhtä rifamysiini S-moolia kohden vähintään kahden ekvivalentin kanssa jodia tai bromia, kun läsnä on halogeeniekvivalenttia kohden vähintään yksi mooli pyridiiniä ja kun läsnä on etanolia, metanolia tai dioksaania tai niiden vesiseosta lämpötilassa, joka ei ylitä huoneen lämpötilaa.

Keksinnön mukaisella menetelmällä 3-jodi- ja 3-bromirifamysiini S:ää saadaan hyvin suurin saannoin, jotka ovat suuruusluokkaa 85-96% ja sitäkin korkeimpia, ja saatujen tuotteiden puhtausaste on niin korkea, että niitä voidaan käyttää sellaisenaan välituotteina valmistettaessa rifamysiini S:n ja SV:n mikrobiologisesti aktiivisia johdannaisia tarvitsematta suorittaa lisäpuhdistusta.

Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettu 3-jodi- ja 3-bromirifamysiini S voidaan haluttaessa puhdistaa esimerkiksi kromatografisesti silikageelipylväässä tai kiteyttämällä sopivasta liuotimesta.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävä halogeenimäärä voi vaihdella halogeenista, lämpötilasta ja liuotimesta riippuen.

Halogeenin ollessa jodi saadaan tyydyttäviä tuloksia, kun yhtä rifamysiini S:n moolia kohden käytetään 2-6 jodiekvivalenttia, ja parhaimmat tulokset saadaan käyttämällä 4 jodiekvivalenttia. Halogeenin ollessa bromi saadaan tyydyttäviä tuloksia, kun yhtä rifamysiini S:n moolia kohden käytettävän 2-4 bromiekvivalenttia, ja parhaimmat tulokset saadaan kolmella bromiekvivalentilla.

Edullinen pyridiinimäärä halogeeniekvivalenttia kohden on bromin tapauksessa yksi mooli tai tähän määrään nähden hieman ylimäärin. Jodin tapauksessa edullinen pyridiinimäärä on 1-10 moolia.

Reaktiolämpötila määräytyy käytetyn halogeenin, reagenssien painosuhteiden sekä käytetyn liuotimen tyyppin ja määrän perusteella. Jodin tapauksessa suositeltava lämpötila on noin huoneen lämpötila, kun taas bromin tapauksessa se on alueella $-10 \dots +15^{\circ}\text{C}$,

edullisesti noin 0°C .

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävät liuottimet ovat inerttejä, poolisia ja hydrofiilisiä liuottimia. Jodin tapauksessa edullisia liuottimia ovat metanoli, etanoli ja niiden vesiseokset, ja bromin tapauksessa dioksaani, metanoli ja etanoli. Reaktion päätyttyä on välttämätöntä eliminoida vapaa halogeeni, jodin tapauksessa riittää reaktioseoksen haihduttaminen kuiviin joitakin kertoja niin, että jodi sublimoituu.

Bromin tapauksessa on suositeltavaa käsitellä reaktioseos pelkistimellä alkuainebromin muuttamiseksi bromi-ioneiksi, jotka on helppo poistaa pesumenetelmillä. Tähän tarkoitukseen sopivien pelkistimien joukossa on joitakin (esim. alkalimetallitiosulfaattit laimeina vesiliuoksina), jotka ainoastaan pelkistävät bromin ja jättävät muodostuneen 3-bromirifamysiini S:n muuttumattomaksi. Toiset pelkistävät toisaalta (esim. askorbiinihappo, rikkidioksidi) myös 3-bromirifamysiini S:n 3-bromi-rifamysiini SV:ksi. Jälkimmäisessä tapauksessa on välttämätöntä palauttaa S-muoto sopivilla hapetuskäsittelyillä (esim. mangaanioksidilla, kaliumferrisyaniidilla, ferrikloridilla, hopeaoksidilla jne).

Seuraavat esimerkit on annettu kyseisen keksinnön kuvailemiseksi.

Niissä mainittu ohutkerroskromatografia (TLC) on suoritettu 0,2 mm:n paksuisilla alumiinipohjaisilla 60 F₂₅₄ -silikageeli-levyillä (Merck). Tuotteille annetut R_{fR}-arvot viittaavat rifamysiini S:n R_f-arvoon.

ESIMERKKI 1

3-jodirifamysiini S:n valmistaminen

Liuotetaan 508 mg (4 mekv) jodia 8 ml:aan pyridiiniä (99 mmoolia) samalla jäädyttäen ja sekoittaen. 5 minuutin kuluttua lisätään 696 mg

(1 mmooli) rifamysiini S:ää. Sekoitetaan 40 minuuttia lämpötilassa alle 15°C , minkä jälkeen lisätään 200 ml kloroformia. Orgaaninen kerros pestään kloorivetyhapon 0,1-n vesiliuoksella ja sen jälkeen vedellä. Orgaaninen kerros kuivataan ja haihdutetaan kuiviin. Kloroformia lisätään ja liuos haihdutetaan jälleen kuiviin. Toimenpide toistetaan useita kertoja jodin poistamiseksi. Kloroformiin liuotettu jäännös käsitellään n-heksaanilla, jolloin saostuu 840 mg raakatuotetta, joka sisältää 700 mg 3-jodirifamysiini S:ää (saanto 85 %). Raakatuote voidaan käyttää suoraan välituotteina lisäreaktioissa. Tuote puhdistetaan liuottamalla se 3 ml:aan kloroformin ja metanolin 40/1-seosta (tilavuus/tilavuus), joka sisältää 0,1 % (paino/tilavuus) oksaalihappoa ja kuljettamalla se kromatografisen silikageelikolonin ($\varnothing = 2,5$ cm, korkeus 20 cm) läpi. Eluointiaineena käytetään samaa yllä mainittua liuotinseosta.

Punaruskean tuotteen sisältävät fraktiot, joilla on TLC:llä 3-jodirifamysiini S:ää vastaava R_{fR} -arvo = 0,6 (kloroformi 40/metanoli 1) yhdistetään, pestään ensin happamalla liuoksella ja sen jälkeen vedellä, kuivataan lopuksi ja haihdutetaan kuiviin.

Saadaan 670 mg puhdasta 3-jodifamysiini S:ää (saanto 81,5 %).

ESIMERKKI 2

Lisätään koko ajan sekoittaen 508 mg (4 mekv) jodia 2 ml:aan (25 mmoolia) pyridiiniä. 5 minuutin kuluttua lisätään 8 ml etanolia, 696 mg rifamysiini S:ää (1 mmooli) ja 3 ml vettä. Sekoitetaan 40 minuuttia huoneen lämpötilassa, minkä jälkeen lisätään 300 ml kloroformia.

Kloroformiliuosta käsitellään kuten esimerkissä 1, jolloin saadaan 825 mg raakatuotetta, joka sisältää 757 mg 3-jodirifamysiini S:ää (saanto 92 % teoreettisesta arvosta).

Valmistus toistettiin käyttäen etyyliasettaattia kloroformin asemesta, jolloin saatiin edellisen kanssa käytännöllisesti katsoen yhtäläinen tulos (saanto ja puhtausaste).

ESIMERKKI 3

Toimitaan kuten esimerkissä 2. Reaktion päätyttyä lisätään kloroformin sijasta 10 ml metanolin ja veden 70/30-seosta (tilavuus/tilavuus), joka sisältää 0,700 g askorbiinihappoa. Sekoitetaan 15 minuuttia ja konsentroidaan sen jälkeen liuos vakuuissa noin kolmanneksen alkuperäisestä tilavuudesta. Lisätään 100 ml etyyliasettaattia ja liuos pestään toistuvasti pyridiinin poistamiseksi. Liuos kuivataan vedettömällä natriumsulfaatilla ja haihdutetaan kuiviin, jolloin saadaan 840 mg tuotetta, joka sisältää 740 mg 3-jodirifamysiini SV:tä (saanto 90 %).

Tuotetta voidaan käyttää lisäreaktioihin: Yस्ताayasti 3-jodirifamysiini S:ksi muuttamiseksi tuote liuotetaan orgaaniseen liuottimeen, häpetetaan mangaanidioksidilla ja puhdistetaan edellisessä esimerkissä kuvatulla tavalla.

ESIMERKKI 4

Lisätään -5°C :ssa 2,39 g (30 mekv) bromia koko ajan sekoitetaan 2,37 g:aan (30 mmoolia) pyridiiniä. 5 minuutin kuluttua lisätään 150 ml etanolia ja 6.96 g (10 mmoolia) rifamysiini S:ää. Sekoitetaan 15 minuuttia lämpötilassa $-10\dots 0^{\circ}\text{C}$, minkä jälkeen reaktio keskeytetään lisäämällä 300 ml etyyliasetaattia ja pesemällä orgaanista kerrosta toistuvasti natriumtiosulfaatin 0,1-n liuoksella kunnes bromi on täydellisesti pelkistynyt, ja sen jälkeen laimealla happamalla liuoksella pyridiinin poistamiseksi ja lopuksi vedellä. Orgaaninen kerros kuivataan ja haihdutetaan kuiviin.

3-bromirifamysiini S liuotetaan kloroformiin ja saostetaan n-heksaanilla.

Saadaan 7,82 g raakatuotetta, joka sisältää 7,410 g 3-bromirifamysiini S:ää (saanto 95 %).

Raakatuotetta voidaan käyttää suoraan välituotteena lisäreaktioissa.

Tuote voidaan puhdistaa pylväskromatografisesti silikageelillä.

Analoginen tulos saadaan käyttämällä etyyliasetaatin sijasta kloroformia liuottimena.

ESIMERKKI 5

Toimitaan kuten esimerkissä 4. Reaktio keskeytetään lisäämällä 5,28 g (30 mmoolia) askorbiinihappoa liuotettuna 100 ml:aan 30 % vettä sisältävää metanolia (tilavuus/tilavuus). Liuosta sekoitetaan 10 minuuttia ja konsentroidaan vakuumissa kolmannekseen alkuperäisestä tilavuudestaan. Jäännös laimennetaan etyyliasetaatilla ja orgaaninen faasi pestään kloorivetyhapon 0,1-n vesiliuoksella ja sen jälkeen vedellä, kuivataan ja haihdutetaan kuiviin ja jäännös liuotetaan kloroformiin ja siihen lisätään 3,5 g (40 mmoolia) mangaanidioksidia (valmistettu Rosenkrantzin menetelmän mukaisesti).

Sekoitetaan 15 minuuttia, minkä jälkeen dioksidi suodatetaan pois ja orgaaninen faasi pestään kloorivetyhapon 0,1-n vesiliuoksella ja sen jälkeen vedellä, kuivataan ja haihdutetaan kuiviin. Jäännös liuotetaan kloroformiin ja saostetaan n-heksaanilla.

3-bromirifamysiini S:n saanto ja puhtausaste on yhtäläisiä esimerkissä 4 saatujen kanssa.

ESIMERKKI 6

Toimimalla kuten esimerkissä 5, mutta käyttämällä reaktioliuot-
timena etanolia metanolin sijasta, saatiin 95 % saanto.

ESIMERKKI 7

Toimimalla kuten esimerkissä 5, mutta käyttämällä reaktioliuot-
timena dioksaania metanolin sijasta, saatiin 85-90 % saanto.

ESIMERKKI 8

Toimitaan kuten esimerkissä 5. Reaktio keskeytetään lisäämällä rikkidioksidin kyllästettyä metanoliliuosta määrä, joka riittää pelkistä-
mään vielä läsnä olevan bromin ja samalla pelkistämään 3-bromirifamysiini S:n 3-bromirifamysiini SV:ksi, Sekoitusta jatketaan 10 minuuttia. Jatketaan esimerkissä 5 kuvatulla tavalla, jolloin saadaan pääasialli-
sesti sama tulos.

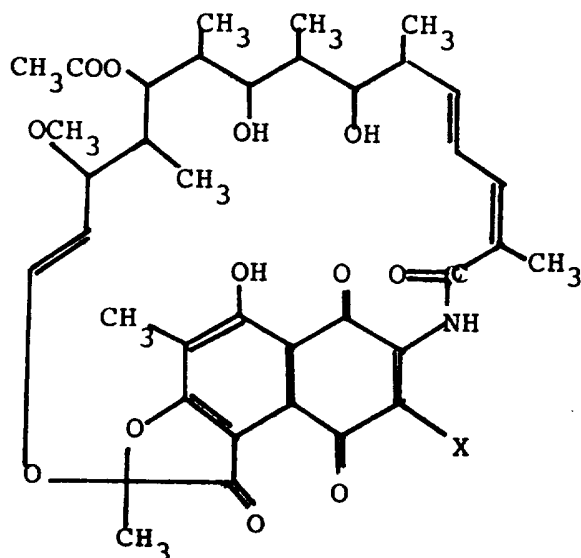
ESIMERKKI 9

Lisätään koko ajan sekoittaen 9,6 g (60 mmoolia) bromia ja 4,90 g (60 mmoolia) pyridiiniä 27,8 g:aan (40 mmoolia) rifamysiini S:ää, joka on suspentoitu 600 ml:aan etanolia. Reaktiolämpötila pidetään -10°C :ssa. Reagenssit liukenevat vähitellen ja suspensiosta tulee kir-
kas liuos. 30 minuutin kuluttua lisätään 20 g askorbiinihappoa. 3-bromirifamysiini S:n ja ylimääräisen bromin pelkistymisen päätyttyä lisätään 2500 ml etyyliasettaattia ja liuos pestään monta kertaa vedellä. Sen jälkeen orgaaninen faasi käsitellään 300 ml:lla ferrikloridin 30 % vesiliuosta (paino/paino). Kun 3-bromirifamysiini SV:n hapettuminen 3-bromirifamysiini S:ksi on päättynyt, erotetaan faasit ja etyyliase-
taattiliuos pestään toistuvasti, kunnes se on neutraali, kuivataan ja haihdutetaan kuiviin. Jäännös kiteytetään 60 ml:sta glykolimonoettyli-
eetteri/vesi-seosta (4/1).

Saadaan 26,5 g tätä kiteistä tuotetta (saanto 85,5 %). Kiteyt-
täminen voidaan suorittaa myös etyyliasetaatista.

Patenttivaatimukset

1. Parannettu menetelmä 3-jodi- ja 3-bromirifamysiini S:n valmistamiseksi, joilla on kaava



jossa X on jodi tai bromi, t u n n e t t u siitä, että rifamysiini S saatetaan reagoimaan yhtä rifamysiini S-moolia kohden vähintään kahden ekvivalentin kanssa jodia tai bromia, kun läsnä on halogeeni-ekvivalenttia kohden vähintään yksi mooli pyridiiniä ja kun läsnä on etanolia, metanolia tai dioksaania tai niiden vesiseosta lämpötilassa, joka ei ylitä huoneen lämpötilaa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä käytetään yhtä rifamysiini S-moolia kohden 2-6 ekvivalenttia jodia ja 1-10 moolia pyridiiniä jodiekvivalenttia kohden ja että lämpötila on suunnilleen huoneen lämpötila.

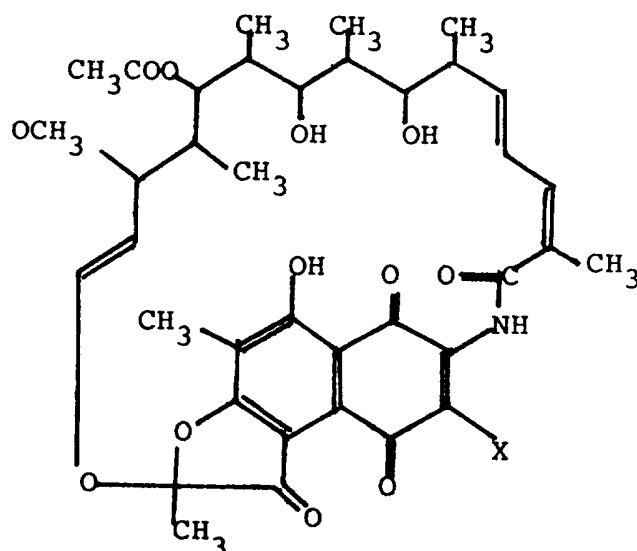
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhtä rifamysiini S-moolia kohden käytetään 4 ekvivalenttia jodia.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhtä rifamysiini S-moolia kohden käytetään 2-4 ekvivalenttia bromia, ja yksi mooli tai hieman ylimäärin pyridiiniä bromiekvivalenttia kohden ja että lämpötila on alueella $-10...+15^{\circ}\text{C}$, edullisesti noin 0°C .

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhtä rifamysiini S-moolia kohden käytetään kolme ekvivalenttia bromia.

Patentkrav

1. Förbättrat förfarande för framställning av 3-jod- och 3-bromrifamysin S med formeln



vari X är jod eller brom, k ä n n e t e c k n a t därav, att rifamycin S bringas att reagera med minst två ekvivalenter av jod eller brom per mol rifamycin S i närvaro av minst en mol pyridin per halogenekvivalent och i närvaro av etanol, metanol eller dioxan eller en blandning därav med vatten vid en temperatur ej över rumstemperatur.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att vid det används 2-6 ekvivalenter jod per mol rifamycin S och 1-10 mol pyridin per ekvivalent jod och att temperaturen är omkring rumstemperatur.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att 4 ekvivalenter jod används per mol rifamycin S.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att 2-4 ekvivalenter brom används per mol i rifamycin S och en mol eller ett lätt överskott av pyridin används per ekvivalent brom och att temperaturen ligger inom området $-10... +15^{\circ}\text{C}$, företrädesvis omkring 0°C .

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att tre ekvivalenter brom används per mol rifamycin S.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Förbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 548 148 (C 07 D 498/08).

Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Journal of the American chemical society 98 (1976): 22, p. 7064-9