

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 148751 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 1887/78

(51) Int.Cl.⁴: C 12 P 21/04
C 07 K 7/64

(22) Indleveringsdag: 01 maj 1978

(41) Alm. tilgængelig: 11 nov 1978

(44) Fremlagt: 16 sep 1985

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 10 maj 1977 CH 5822/77 10 maj 1977 CH 5823/77 17 jun 1977 CH 7457/77

(71) Ansøger: *SANDOZ A.G.; CH-4002 Basel, CH.

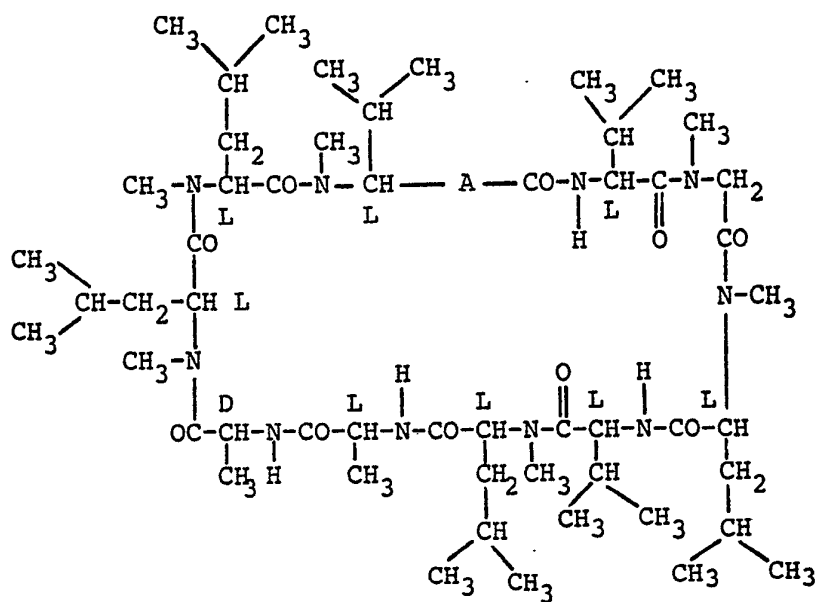
(72) Opfinder: Rene P. *Traber; CH, Max *Kuhn; CH, Hans *Hofmann; CH, Eugen *Haerri; CH.

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af cyclosporin-
derivater

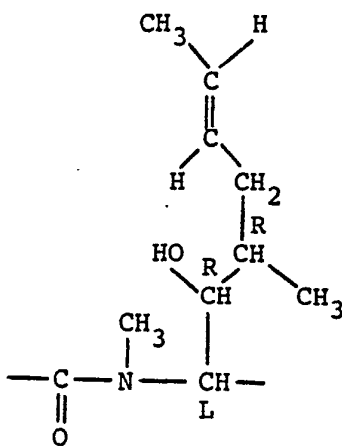
DK 148751 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte cyclosporinderivater med den almene formel I

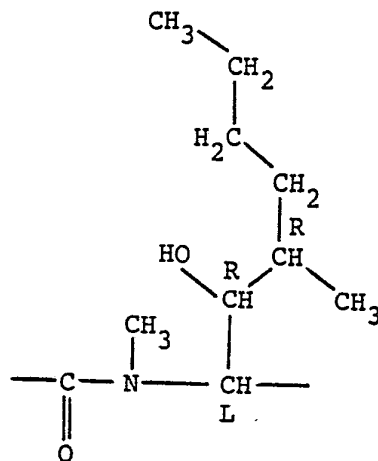


hvor A betegner

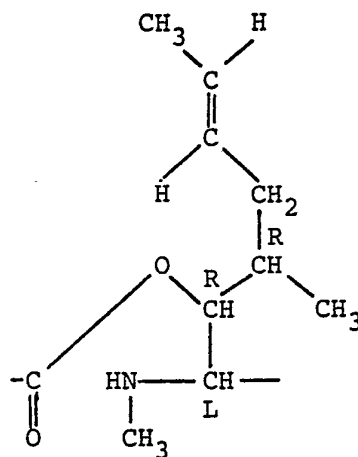
- 5 (i det nedenstående betegnet cyclosporin D), eller



(i det nedenstående
betegnet dihydro-cyclo-
sporin D), eller



(i det nedenstående
5 betegnet isocyclosporin D).



Det er kendt, jfr. dansk fremlæggeskrift nr. 136.780 og beskri-
velsen til dansk patentansøgning nr. 4831/76, at fremstille antibiotika
betegnet cyclosporin A (også kendt som S 7481/F-1), cyclosporin B

- (også kendt som S 7481/F-2) og cyclosporin C ved dyrkning af en stamme af svampearten *Trichoderma polysporum* (Link ex. Pers) især NRRL 8044 og isolering af nævnte cyclosporiner fra kulturfiltratet. Nævnte stamme indordnes nu under svampearten *Tolypocladium inflatum* Gams. Cyclosporin A, B og C har immunundertrykkende, betændelseshæmmende og arthritishæmmende virkning.

Det har nu overraskende vist sig, at ovennævnte svampeart ud over cyclosporin A, B og C danner en yderligere cyclosporin, nemlig cyclosporin D.

- 10 Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse til fremstilling af de hidtil ukendte cyclosporin D, dihydro-cyclosporin D eller isocyclosporin D er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved, at

- a) der ud fra et kulturfiltrat vundet ved dyrkning af en cyclosporin-producerende stamme af svampearten *Tolypocladium inflatum* Gams isoleres cyclosporin D, hvorpå det vundne cyclosporin D

b) eventuelt hydrogeneres til dannelse af dihydro-cyclosporin D, eller

c) eventuelt underkastes syrebehandling til dannelse af isocyclosporin D.

- 20 Til fremstillingen af cyclosporin D kan som nævnt anvendes stammer af svampearten *Tolypocladium inflatum* Gams, fx NRRL 8044 eller sådanne, som kan fås ved selektion eller mutation af svampestammen NRRL 8044 ved påvirkning med ultraviolette stråler eller røntgenstråler eller under anvendelse af andre foranstaltninger, fx behandling af laboratoriekulturer med egnede kemikalier.

- 25 Cyclosporin D kan isoleres på i og for sig kendt måde, fx som beskrevet i eksempel 1. Herved kan cyclosporin D skilles fra samtidigt i store mængder tilstedeværende noget mere polært cyclosporin A, mere polært cyclosporin B og det endnu mere polære cyclosporin C.

Det eventuelle fremgangsmådetrin b) ifølge den foreliggende opfindelse kan udføres på i og for sig kendte måder, fx ved katalytisk hydrogenering.

5 Som opløsningsmidler kan fortrinsvis anvendes lavere aliphatiske alkoholer, fx methanol, ethanol eller isopropanol, eller ethylacetat. Hydrogeneringen udføres hensigtsmæssigt ved neutral pH-værdi ved temperaturer mellem 20 og 30°C og ved atmosfæretryk eller ved svagt forhøjet tryk. Som katalysator anvendes fortrinsvis palladium, fx palladium/kul.

10 Syrebehandlingen ved det eventuelle fremgangsmådetrin c) kan udføres på i og for sig kendt måde, fx med trifluoreddikesyre, fortrinsvis med methansulfonsyre eller p-toluensulfonsyre.

Den til isomeriseringen anvendte mængde stærk syre ligger fortrinsvis mellem 1 og 4 mol pr. mol cyclosporin D.

15 Som opløsningsmidler kan fx anvendes lavere alkoholer, fx methanol, halogenerede carbonhydrider, fx chloroform, eller ethere, fx dioxan.

Reaktionstemperaturen kan variere mellem 20 og 65°C, fortrinsvis mellem 45 og 55°C.

20 Cyclosporin D, dihydro-cyclosporin D og isocyclosporin D udmærker sig ved interessante kemoterapeutiske og farmakologiske egenskaber og kan derfor anvendes som lægemidler.

Cyclosporin D, dihydro-cyclosporin D og isocyclosporin D er især indiceret til anvendelse som antiarthritica.

25 Cyclosporin D, dihydro-cyclosporin D og isocyclosporin D kan som lægemidler administreres alene eller i en egnet lægemiddelform sammen med farmakologisk indifferente hjælpestoffer.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse belyses nærmere ved følgende eksempler.

EKSEMPEL 1

Cyclosporin D

500 liter af en næringsopløsning, som pr. liter indeholder 40 g glucose, 2,0 g natriumcaseinat, 2,5 g ammoniumphosphat, 5 g
5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 , 3 g natriumnitrat, 0,5 g kaliumchlorid, 0,01 g FeSO_4 og demineraliseret vand, podes med 50 liter af en
forkultur af stamme NRRL 8044 og inkuberes i 13 dage ved 27°C i en
stålfermenteringsbeholder under omrøring (170 OPM) og beluftning (1
liter luft/minut/liter næringsopløsning) (se tysk offentliggørelsesskrift
10 nr. 2.455.859).

Dyrkningsvæsken ekstraheres med en lige så stor mængde n-butylacetat, den organiske fase skilles fra og inddampes i vakuum, og råekstrakten affedtes ved tre-trins-fordeling mellem methanol-vand (9:1) og petroleumsether. Den methanoliske fase fraskilles og inddampes i
15 vakuum, og råproduktet udfældes ved tilsætning af vand. Det ved filtrering vundne materiale chromatograferes på silicagel med hexan-acetone (2:1) som elueringsmiddel, hvorhos de først eluerede fraktioner overvejende indeholder cyclosporin A og cyclosporin D og de
senere eluerede dele overvejende cyclosporin C. De cyclosporin A- og
20 D-holdige fraktioner krystalliseres til yderligere rensning af en 2 til 2,5 gange så stor mængde acetone ved -15°C, og det krystallinske materiale opspaltes derpå yderligere ved to gange chromatografi på silicagel, hvorhos de med vandmættet ethylacetat først eluerede fraktioner indeholder cyclosporin D i stærkt opkoncentreret form. Disse
25 opløses i en dobbelt så stor mængde acetone og lades krystallisere ved -15°C. Det således vundne rå krystallinske cyclosporin D opløses til videre rensning i en 10 gange så stor mængde acetone, der tilsættes 2 vægtprocent aktivt kul og opvarmes i 5 minutter til 60°C. Efter filtrering over talkum fås et klart og næsten farveløst filtrat, som
30 derpå inddampes til 1/3 af det oprindelige volumen og lades afkøle til stuetemperatur, hvorved cyclosporin D spontant udkrystalliserer. Ved henstand ved -17°C fuldendes krystalliseringen. Krystallerne frafiltreres og vaskes med lidt iskold acetone og tørres derpå i højvakuum ved 80°C i 2 timer.

Karakterisering af cyclosporin D:

Farveløse, prismatiske krystaller, smeltepunkt 148-151°C, $[\alpha]_D^{20} = -245^\circ$ (c = 0,52 i chloroform),

$[\alpha]_D^{20} = -211^\circ$ (c = 0,51 i methanol).

5 EKSEMPEL 2

Dihydro-cyclosporin D

400 mg palladium/kul (10%'s palladium) forhydrogeneres i 15 ml ethanol i 20 minutter. Til denne suspension af palladiumkatalysatoren sættes en opløsning af 3,66 g cyclosporin D opnået som i eksempel 1 i 30 ml ethanol, og derpå hydrogeneres ved 24°C og et tryk på 736 mm Hg, til der ikke længere optages hydrogen. Derpå filtreres katalysatoren fra, og filtratet inddampes til tørhed i vakuum ved 20-30°C. Derved fås tyndtlagschromatografisk ensartet dihydro-cyclosporin D i form af et farveløst amorft pulver, som tørres i højevakuum i 4 timer ved 70°C.

Egenskaber for dihydro-cyclosporin D:

Smeltepunkt 153-156°C,

$[\alpha]_D^{20} = -237^\circ$ (c = 0,56 i CHCl_3),

$[\alpha]_D^{20} = -196^\circ$ (c = 0,58 i CH_3OH).

20 EKSEMPEL 3

Isocyclosporin D

Til en opløsning af 18,25 g cyclosporin D opnået som i eksempel 1 i 120 ml absolut dioxan sættes en opløsning af 3,60 g methansulfonsyre i 60 ml dioxan, og blandingen holdes ved 50°C under fugtighedsudelukkelse. Reaktionens forløb følges på tyndtlagschromatogram (Poly-

gram SIL G-folier, chloroform-methanol-iseddike (90:6:4), ioddamp til fremkaldelse).

- Efter 17 timer afkøles til stuetemperatur. Syren neutraliseres ved til-
- sætning af 3,38 g vandfrit natriumacetat, der omrøres i 15 minutter,
- 5 det udfældede salt isoleres ved sugefiltrering, og filtratet inddampes i
- vakuum ved 45°C. Remanensen (21 g) chromatograferes på 1,5 kg si-
- licagel, hvorhos der elueres med chloroform-methanol (98:2). De frak-
- tioner, som praktisk taget består af rent isocyclosporin D, forenes og
- inddampes i vakuum ved 50°C, og remanensen krystalliseres to til tre
- 10 gange af ether, hvorved fås isocyclosporin D.

Egenskaber for isocyclosporin D:

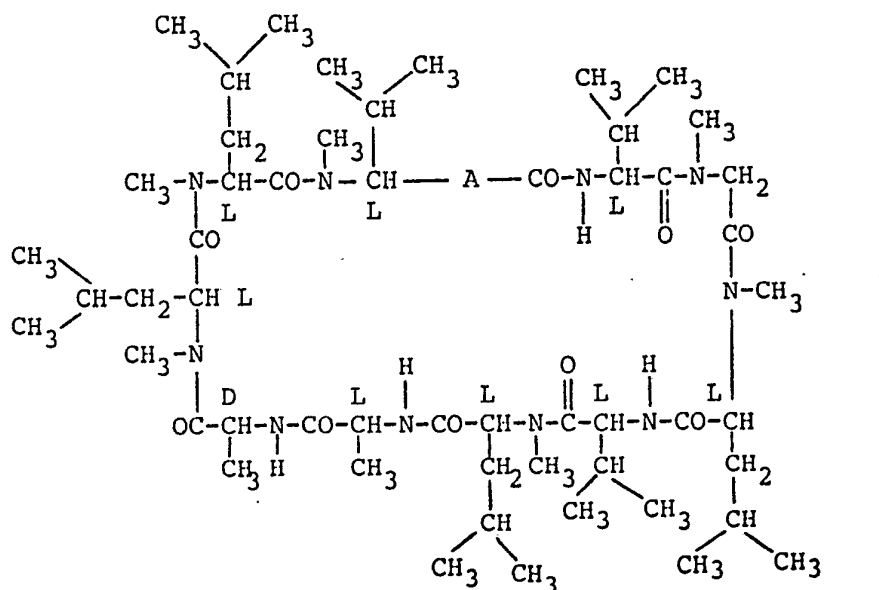
Farveløse prismen, smeltepunkt 142-144°C.

$[\alpha]_D^{20} = -205,5^\circ$ ($c = 0,51$ i CHCl_3),

$[\alpha]_D^{20} = -144,4^\circ$ ($c = 0,64$ i CH_3OH).

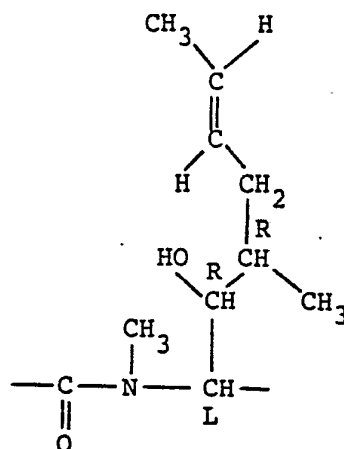
15 PATENTKRAV

Fremgangsmåde til fremstilling af cyclosporinderivater med den almene formel I

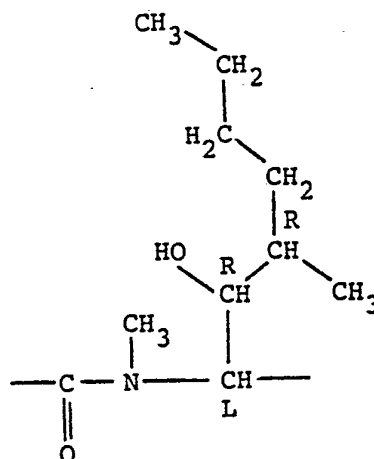


hvor A betegner

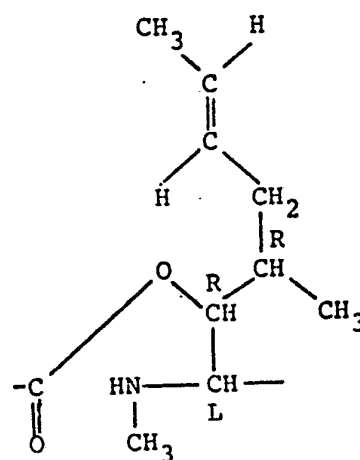
(i det nedenstående
betegnet cyclosporin D),
eller



5 (i det nedenstående
betegnet dihydro-cyclo-
sporin D), eller



(i det nedenstående
betegnet isocyclosporin D),



k e n d e t e g n e t ved, at

a) der ud fra et kulturfiltrat vundet ved dyrkning af en cyclosporin-producerende stamme af svampearten *Tolypocladium inflatum Gams* isoleres cyclosporin D, hvorpå det vundne cyclosporin D

5 b) eventuelt hydrogeneres til dannelse af dihydro-cyclosporin D, eller

c) eventuelt underkastes syrebehandling til dannelse af isocyclosporin D.

Fremdragne publikationer:
