



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

51 Int. Cl.³: C 07 C 103/52



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

12 PATENTSCHRIFT A5

11

628 022

21 Gesuchsnummer: 5822/77

73 Inhaber:
Sandoz AG, Basel

22 Anmeldungsdatum: 10.05.1977

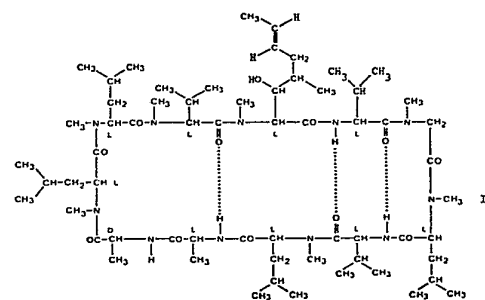
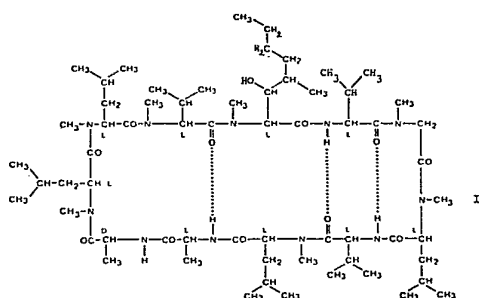
24 Patent erteilt: 15.02.1982

72 Erfinder:
Dr. René P. Traber, Basel
Max Kuhn, Basel
Hans Hofmann, Ettingen
Dr. Eugen Härri, Therwil

45 Patentschrift
veröffentlicht: 15.02.1982

54 Verfahren zur Herstellung eines Antibiotikum-Derivates.

57 Es wird die Herstellung des neuen Antibiotikum-Derivates Dihydro-cyclosporin D (Formel I)

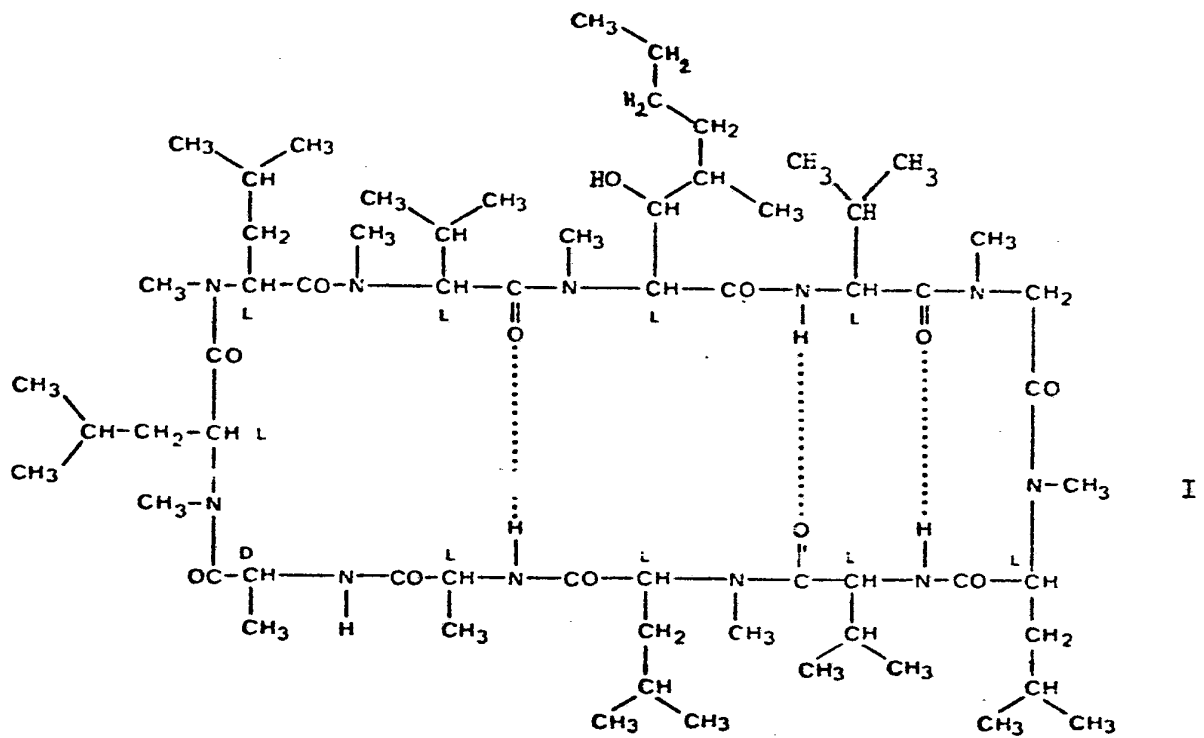


wird katalytisch hydriert.

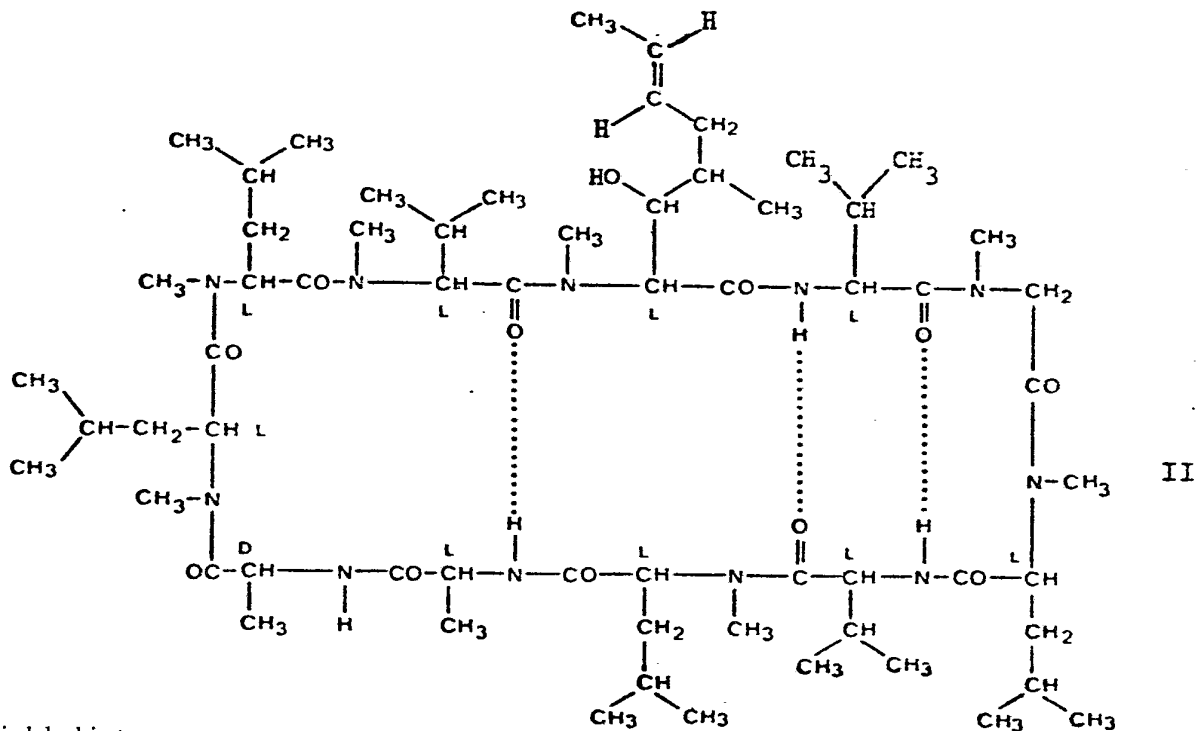
mit Wirkung als Antiarthriticum und zur Behandlung immunologisch bedingter Reaktionen beschrieben. Das Antibiotikum Cyclosporin D (Formel II)

PATENTANSPRUCH

Verfahren zur Herstellung des neuen Antibiotikum-Derivates Dihydro-cyclosporin D (Formel I),

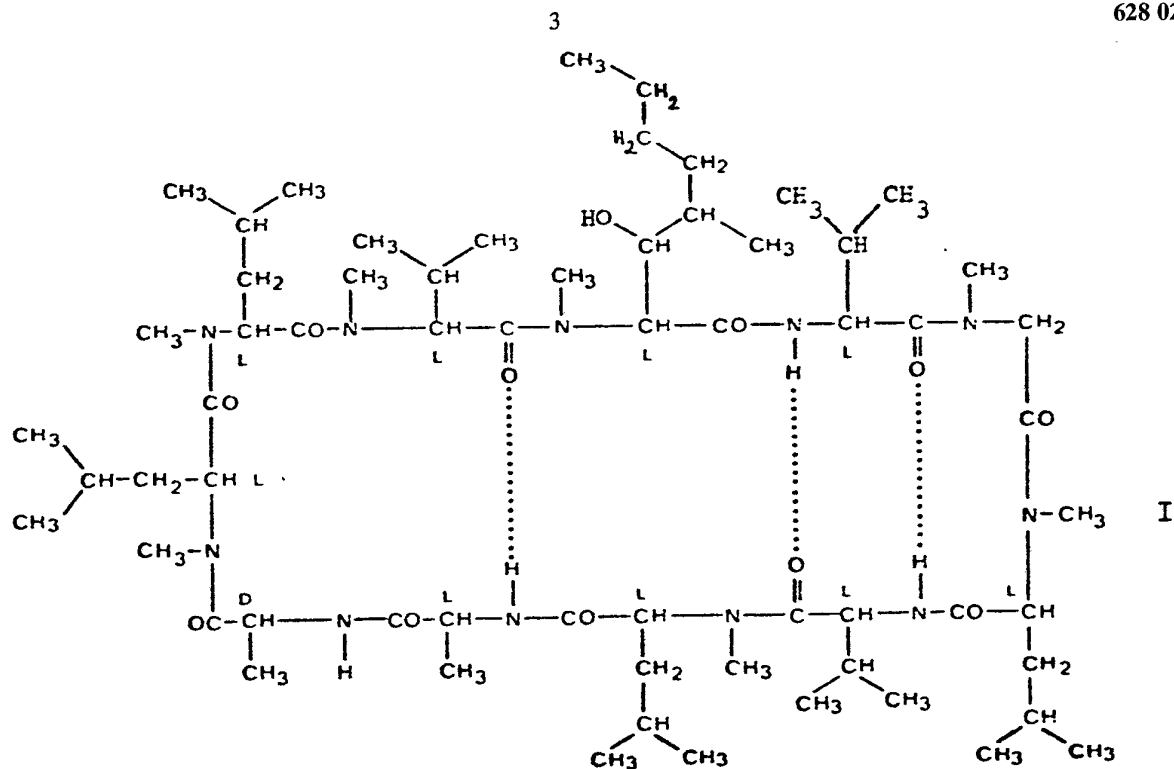


dadurch gekennzeichnet, dass man das Antibiotikum Cyclosporin D (Formel II)

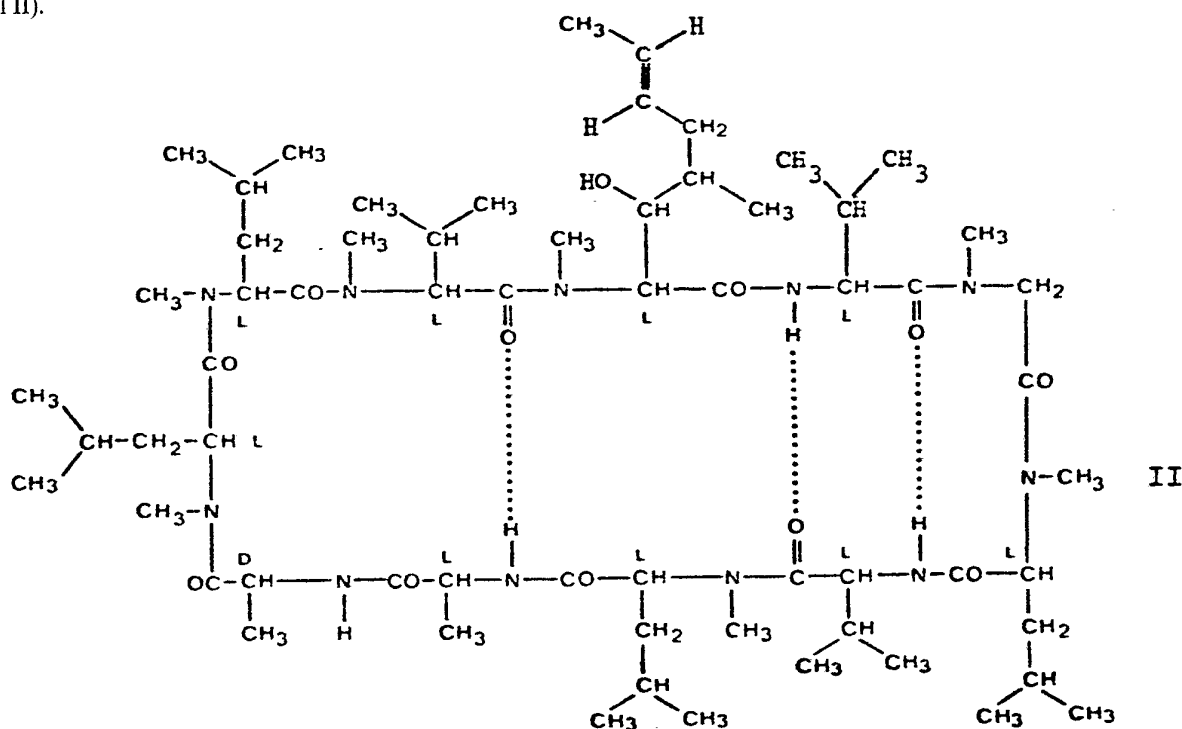


katalytisch hydriert.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung des neuen Antibiotikum-Derivates Dihydro-cyclosporin D (Formel I).



Erfindungsgemäss gelangt man zu Dihydro-cyclosporin D durch katalytische Hydrierung des Antibiotikums Cyclosporin D (Formel II).



Die Hydrierung des Antibiotikums Cyclosporin D wird vorteilhafterweise so ausgeführt, dass man das Antibiotikum Cyclosporin D in einem geeigneten Lösungsmittel in Gegenwart von katalytisch aktiviertem Wasserstoff hydriert. Als Lösungsmittel kommen vorzugsweise niedere aliphatische Alkohole, wie z. B. Methanol, Äthanol, Isopropanol, oder Äthylacetat in Frage. Die Hydrierung erfolgt zweckmässigerweise im neutralen Bereich bei Temperaturen zwischen 20 und 30 °C und bei Atmosphärendruck oder wenig erhöhtem Druck. Als Katalysator kommt vorzugsweise Palladium, z. B. Palladium auf Kohle, in Frage. Das so erhaltene Hydrierungsprodukt des Antibiotikums Cyclosporin D kann hierauf in an sich bekannter

Weise gereinigt werden, z. B. durch Chromatographie an Kieselgel.

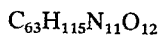
Das als Ausgangsmaterial benützte Antibiotikum Cyclosporin D kann, wie in nachstehendem Beispiel beschrieben, hergestellt werden.

Eigenschaften von Dihydro-cyclosporin D

Farbloses, amorphes Pulver
Smp. 153–156°

$[\alpha]_D^{20} = -237^\circ$ (c = 0,56 in CHCl_3)
 $= -196^\circ$ (c = 0,58 in CH_3OH)

Elementaranalyse



Ber.: C 62,1 H 9,5 N 12,6 O 15,8%

Gef.: C 61,8 H 9,5 N 12,9 O 16,0%

Dihydro-cyclosporin D ist bei Raumtemperatur gut löslich in Methanol, Äthanol, Äther, Aceton und chlorierten Kohlenwasserstoffen; praktisch unlöslich in Wasser und in gesättigten Kohlenwasserstoffen.

UV-Spektrum in CH₃OH: EndabsorptionIR-Spektrum in CH₂Cl₂: Siehe Fig. 1

¹H-NMR-Spektrum in CDCl₃, 90 MHz, mit Tetramethylsilan als internem Standard: siehe Fig. 2

Die R_F-Werte von Dihydro-cyclosporin D im Dünnschichtchromatogramm gehen aus folgender Tabelle hervor:

Fließmittel	R _F -Werte
Chloroform-Methanol (96:4)	0,42
Chloroform-Methanol-Eisessig (90:6:4)	0,57
Chloroform-Aceton (1:1)	0,57
Aceton-Hexan (1:1)	0,43

Polygram SIL G-Folien, Laufstrecke 10 cm.

Aufgetragene Substanzmenge: 40 γ

Sichtbarmachung: mit Joddampf gelbbraune Flecken.

Das neue Antibiotikum-Derivat Dihydro-cyclosporin D zeichnet sich durch interessante pharmakologische Eigenschaften aus und kann daher als Heilmittel verwendet werden. So hemmt es das Wachstum von *Aspergillus niger* und *Curvularia lunata*.

Insbesondere zeichnet sich die Substanz durch eine immunosuppressive Wirkung aus.

Die immunosuppressive Wirkung kann wie folgt gezeigt werden:

a) Im Lymphozytenstimulationstest nach Jánossy wird in vitro in Konzentrationen von 0,01 bis 10,0 μg/ml eine starke Hemmung des H³-Thymidin-Einbaus, der Proliferationsrate und der Blataogenese von mit Concanavalin A stimulierten Lymphozyten aus Mäusemilz festgestellt.

b) Oxazolone-Test an der Maus: Die Abnahme der Ohrschwellung wird als suppressiver Index (SI) ausgedrückt; SI = 0,62 nach 5 × 70 mg/kg p.o.

Aufgrund ihrer immunosuppressiven Wirkung kann die Substanz zur Prophylaxe und Behandlung von Krankheiten,

die mit der Beeinflussung der Abwehrreaktion im negativen Sinn zusammenhängen, angewandt werden.

Das neue Antibiotikum-Derivat Dihydro-cyclosporin D ist ferner indiziert als Antiarthriticum. So bewirkt es im Freund-Adjuvans-Arthritis-Latenzzeitversuch an der Ratte in Dosen von ca. 30 mg/kg p.o., Körpergewicht/Tag eine starke Hemmung der primären und sekundären Entzündung.

Die zu verwendenden Dosen variieren naturgemäss je nach Art der Administration und des zu behandelnden Zustandes. Im allgemeinen werden jedoch bei Testtieren befriedigende Resultate mit einer Dosis von 60 bis 300 mg/kg Körpergewicht erzielt. Diese Dosis kann nötigenfalls in 2 bis 3 Anteilen oder auch als Retardform verabreicht werden. Für grössere Säugtiere liegt die Tagesdosis bei etwa 300 bis 900 mg. Für orale Applikationen können die Teildosen beispielsweise etwa 150 bis 300 mg des neuen Antibiotikum-Derivates Dihydro-cyclosporin D neben festen und flüssigen Trägersubstanzen enthalten.

Als Heilmittel kann das neue Antibiotikum-Derivat Dihydro-cyclosporin D allein oder in geeigneter Arzneiform mit pharmakologisch indifferenten Hilfsstoffen verabreicht werden.

In dem nachfolgenden Beispiel, das die Erfindung näher erläutert, ihren Umfang aber in keiner Weise einschränken soll, erfolgen alle Temperaturangaben in Celsiusgraden.

Beispiel

400 mg Palladium-Kohle (10% Palladium) werden in 15 ml Äthanol während 20 Minuten vorhydriert. Zu dieser Suspension des Palladiumkatalysators wird die Lösung von 3,66 g Cyclosporin D in 30 ml Äthanol zugegeben und darauf bei 24° und einem Druck von 736 mm Quecksilbersäule bis zur beendeten Wasserstoffaufnahme hydriert. Anschliessend filtriert man vom Katalysator ab und dampft das Filtrat im Vakuum bei 20 bis 40° zur Trockne ein. Dabei fällt das dünnschichtchromatographisch einheitliche Dihydro-cyclosporin D als farbloses amorphes Pulver an, das im Hochvakuum während 4 Stunden bei 70° getrocknet wird.

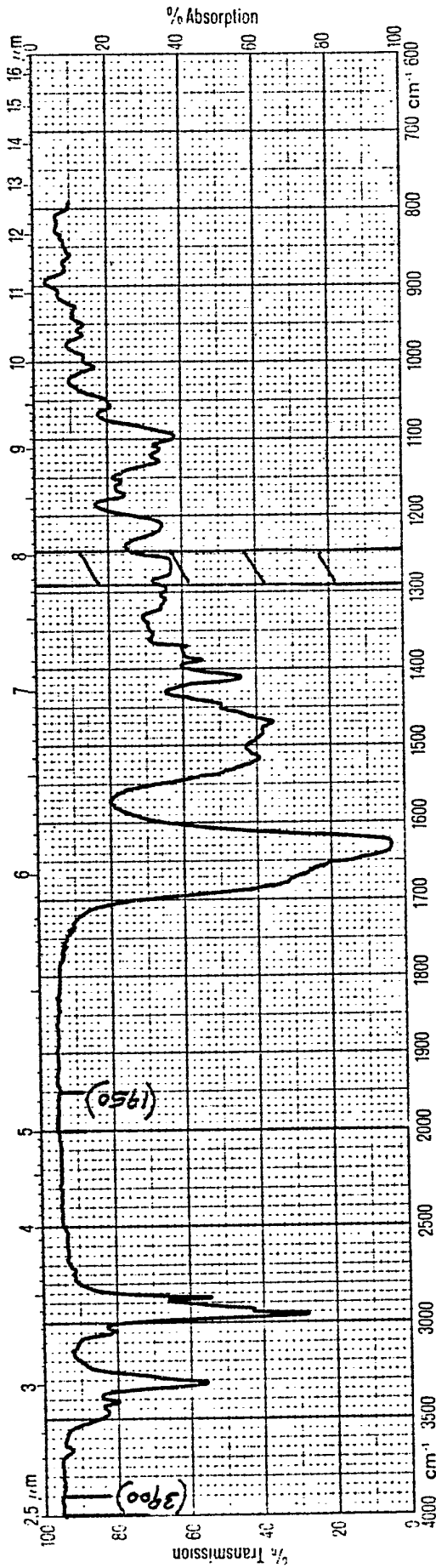
Das als Ausgangsmaterial verwendete Cyclosporin D wird wie folgt hergestellt:

500 l einer Nährlösung, die pro Liter 40 g Glucose, 5 g Caseinpepton, 5 g MgSO₄ · 7H₂O, 2 g KH₂PO₄, 3 g NaNO₃, 0,5 g KCl, 0,01 g FeSO₄ und entmineralisiertes Wasser enthält, werden mit 50 l einer Vorkultur des Stammes NRRL 8044 angeimpft und in einem Stahlfermenter unter Rühren (170 UPM) und Belüftung (1 Liter Luft/Min./Liter Nährlösung) 13 Tage bei 27° inkubiert (siehe DOS 2 455 859).

Die Kulturbrühe wird mit der gleichen Menge n-Butylacetat ausgerührt, nach Abtrennung der organischen Phase wird diese im Vakuum konzentriert und der Rohextrakt durch 3-stufige Verteilung zwischen Methanol-Wasser (9:1) und Petroläther entfettet. Die methanolische Phase wird abgetrennt, im Vakuum konzentriert und das Rohprodukt durch Zugabe von Wasser ausgefällt. Das nach der Filtration gewonnene Material wird an der 5- bis 7fachen Menge Sephadex LH-20 mit Methanol als Elutionsmittel chromatographiert. Die Spitzenfraktionen werden anschliessend an Kieselgel 60, Korngrösse 0,063–0,20 mm (Merck) mit Hexan-Aceton (2:1) chromatographiert, wobei die zuerst eluierten Fraktionen vorwiegend Cyclosporin A und Cyclosporin D enthalten, die später eluierten Anteile vorwiegend Cyclosporin C. Zur weiteren Reinigung werden die Cyclosporin A- und D-haltigen Fraktionen aus der 2- bis 2,5fachen Menge Aceton bei –15° kristallisiert und anschliessend durch zweimalige Chromatographie an Kieselgel 60, Korngrösse 0,063–0,20 mm (Merck) weiter aufgetrennt, wobei die mit Hexan-Aceton (2:1) zuerst eluierten Fraktionen Cyclosporin D in stark angereicherter Form enthalten. Diese werden in der doppelten Menge Aceton gelöst und bei –15° kristallisieren lassen. Das dabei erhaltene Rohkristallat von Cyclosporin D wird zur weiteren Reinigung in der 10fachen Menge Aceton gelöst, mit 2 Gewichtsprozent Aktivkohle versetzt und während 5 Minuten auf 60° erwärmt. Das nach Filtration über Talk erhaltene klare und beinahe farblose Filtrat wird auf ein Drittel des Volumens eingeeengt und auf Raumtemperatur erkalten lassen, wobei Cyclosporin D spontan auskristallisiert. Durch Stehenlassen bei –17° wird die Kristallisation vervollständigt. Die durch Abfiltrieren gewonnenen Kristalle werden mit wenig eiskaltem Aceton gewaschen und anschliessend im Hochvakuum bei 80° während 2 Stunden getrocknet.

Smp. 148–151°

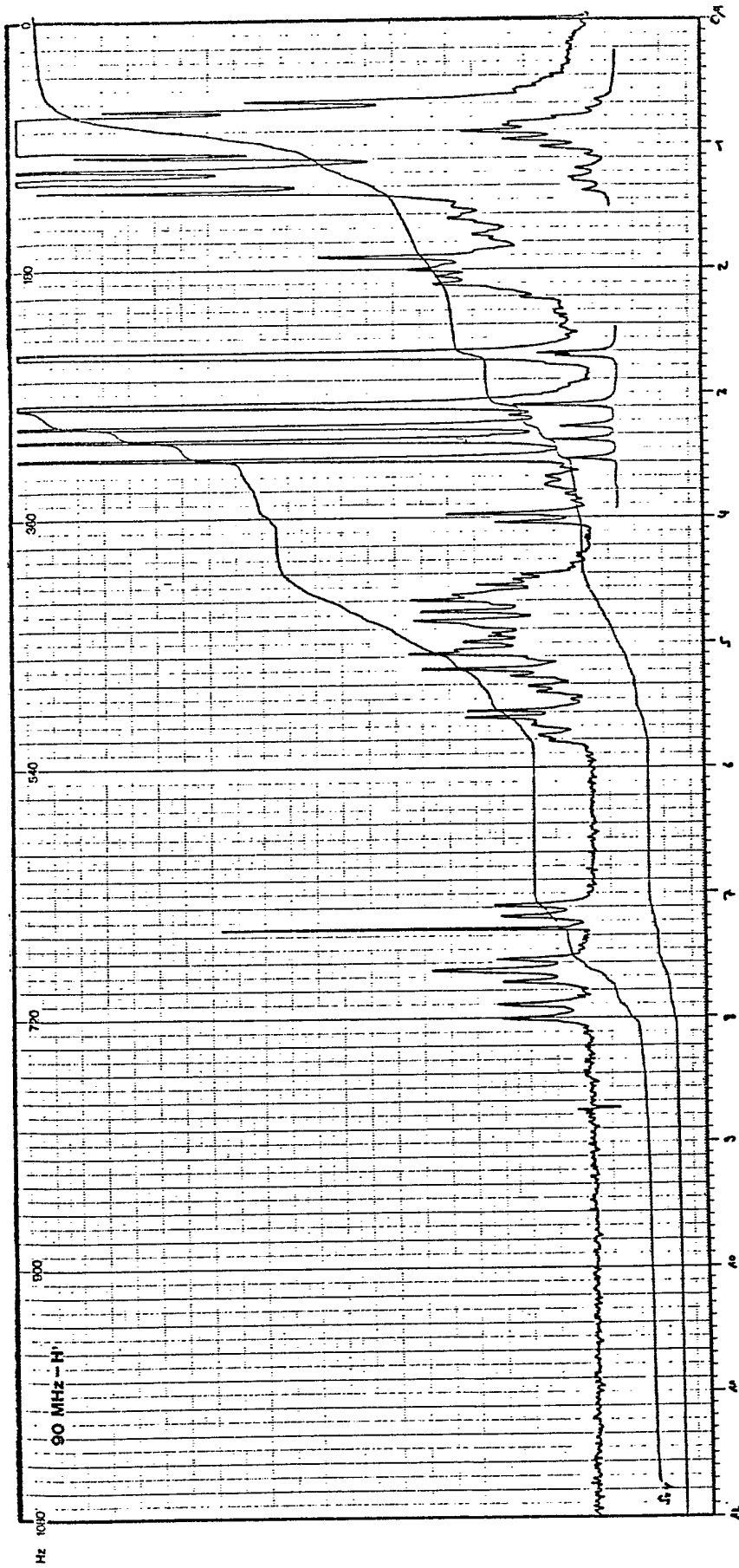
[α]_D²⁰ = –245° (c = 0,52 in CHCl₃)[α]_D²⁰ = –211° (c = 0,51 in CH₃OH).



Case 100-4801

Dihydro-cyclosporin D

Fig. 1



Case 100-4801

Dihydro-cyclosporin D

Fig. 2