



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **148907 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 4831/76
(22) Indleveringsdag: 26 okt 1976
(41) Alm. tilgængelig: 05 maj 1977
(44) Fremlagt: 11 nov 1985
(86) International ansøgning nr.: –
(30) Prioritet: 04 nov 1975 CH 14195/75

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

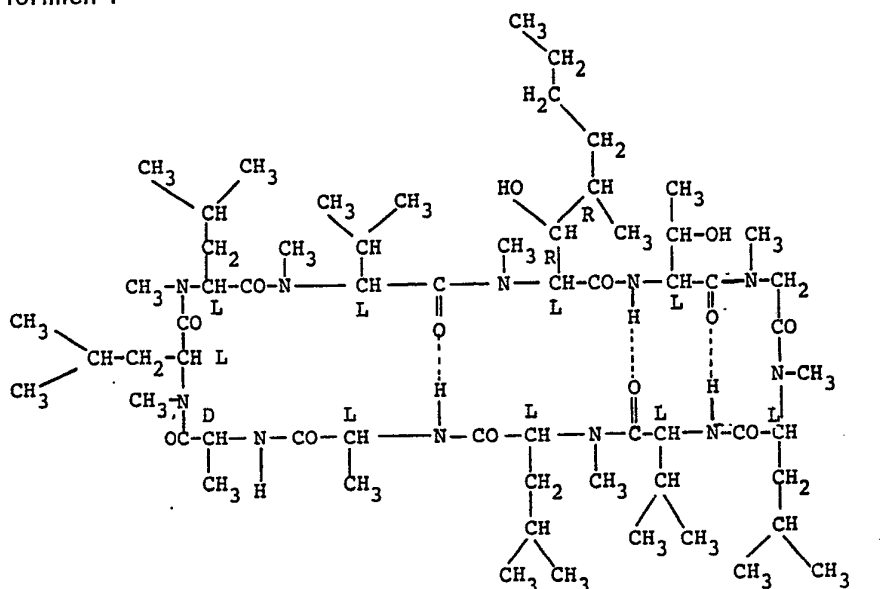
(71) Ansøger: ***SANDOZ A.G.; Basel, CH.**
(72) Opfinder: **Artur *Ruegger; CH, Max *Kuhn; CH.**

(74) Fuldmægtig: **Plougmann & Vingtoft Patentbureau**

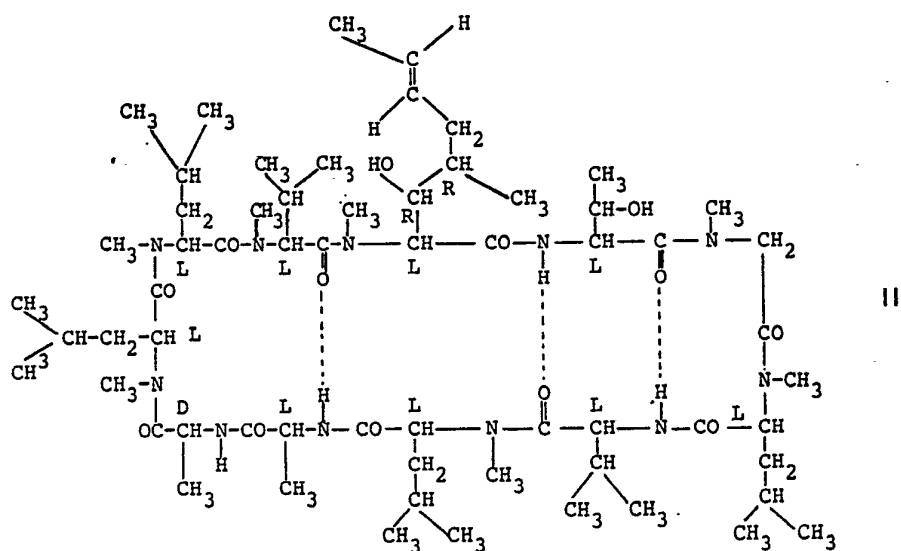
(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af di-
hydrocyclosporin C**

DK 148907 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af den hidtil ukendte forbindelse dihydrocyclosporin C med formelen I



- 5 Ved analogifremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstilles dihydrocyclosporin C ved hydrogenering af cyclosporin C med formelen II



Dihydrocyclosporin C har følgende karakteristika:

Smeltepunkt 160-162°C (amorf), let hygroskopisk.

$$[\alpha]_D^{20} = -242^\circ \quad (c = 0,5 \text{ i } \text{CHCl}_3)$$

$$-174,5^\circ \quad (c = 0,5 \text{ i } \text{CH}_3\text{OH})$$

- 5 I UV-spektret (methanol) viser forbindelsen slutabsorption. IR-Spektret i CH_2Cl_2 er angivet i fig. 1 på tegningen, og NMR-spektret i CDCl_3 , 90 MHz, med tetramethylsilan som intern standard er angivet i fig. 2 på tegningen (signalerne ved 7,23 ppm og ved 7,33 ppm beror på meget små mængder af CHCl_3 henholdsvis C_6H_6).

Analyse:

- 10 Beregnet for $\text{C}_{62}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$: C 61,0 H 9,3 N 12,6 O 17,0
Fundet: C 61,1 H 9,6 N 12,4 O 17,3.

Dihydrocyclosporin C er ved stuetemperatur letopløseligt i benzen, dichlormethan, chloroform, ethylacetat, acetone, ethanol og methanol og meget tungt opløseligt i vand.

- 15 R_f -Værdierne af dihydrocyclosporin C i tyndtlagschromatogram fremgår af følgende tabel:

R_f -Værdier	
	Chloroform-methanol (94:6) 0,40
20	Acetone 0,66
	Acetone-hexan (1:1) 0,38
	Acetone-chloroform (1:1) 0,42

"DC-færdigplade Merck®, Kieselgel 60 F-254".

- 25 Synliggørelsen af pletterne kan udføres på kendt måde, fx med iod.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan udføres under anvendelse af i og for sig kendte metoder, fx ved katalytisk hydrogenering.

Som opløsningsmiddel kommer fortrinsvis ethylacetat eller lavere aliphatiske alkoholer såsom methanol, ethanol eller isopropanol i betragtning. Hydrogeneringen udføres hensigtsmæssigt i det neutrale område ved temperaturer mellem 20 og 30°C og ved atmosfæretryk eller lidt
5 forhøjet tryk. Som katalysator kommer platin, fortrinsvis palladium, fx palladium på kul, i betragtning. Det på denne måde vundne hydrogeneringsprodukt af cyclosporin C renses derefter på i og for sig kendt måde, fx ved chromatografering.

Det som udgangsprodukt anvendte cyclosporin C kan fremstilles ved,
10 at en cyclosporin C-producerende stamme af svampearten *Tolypocladium inflatum* Gams, tidligere kaldet *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai, eller *Cylindrocarpon lucidum* Booth dyrkes, og cyclosporin C isoleres fra dyrkningsmediet. Dyrkningen udføres på i og for sig kendt måde, idet der fortrinsvis anvendes en stamme NRRL 5760
15 eller en stamme NRRL 8044 (se fx tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.455.859). Kulturer af de to stammer er deponeret hos United States Department of Agriculture (Northern Research and Development Division), Peoria, Illinois, USA. Cyclosporin C kan isoleres på chromatografisk måde som et mod *Aspergillus niger* aktivt produkt med mere
20 polar virkning end cyclosporin A og B (i tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.455.859 betegnes cyclosporin A og B som S 7481/F-1 og S 7481/F-2).

Hvad angår dets farmakologiske egenskaber adskiller dihydrocyclosporin C sig fra det fra dansk fremlæggelsesskrift nr. 136.780 kendte
25 cyclosporin A på følgende måde:

I sin farmakologiske virkningsprofil minder dihydrocyclosporin C kun til en vis grad om cyclosporin A. De fælles egenskaber hos dihydrocyclosporin C og cyclosporin A er den stærke hæmning af lymfocytformering *in vitro*, den gode undertrykkelse af den cellebundne
30 immunitet og den tydelige virkning på adjuvans arthritis.

Den væsentligste forskel mellem dihydrocyclosporin C og cyclosporin A består i deres virkning på den humorale immunitet (dvs. antistofdannelse). Denne påvirkes med dihydrocyclosporin C først i høje, til

dels toksiske doser, idet den optræder forsinket og kun formindskes, men aldrig undertrykkes fuldstændigt. Ved eksempelvis hæmagglutinationstesten (HAT) bevirker den orale behandling af rhesusaber med 5 x 250 mg/kg dihydrocyclosporin C ingen statistisk signifikant formindskelse af hæmagglutinationstiteren i forhold til kontroldyrene. Den samme dosis cyclosporin A forårsagede ved denne test en næsten fuldstændig hæmning. De udprægede anticellulære, men svagt antihumorale komponenter påpeger en fordel hos dihydrocyclosporin C til indikationen kronisk inflammation eftersom præparater, der hæmmer kroniske, dvs. immunologisk betingede, inflammationsmodeller godt og endvidere i videst muligt omfang skåner den "resterende" immunokompetance, er at foretrække.

Dihydrocyclosporin C udmærker sig således ved interessante kemoterapeutiske og farmakologiske egenskaber og kan derfor anvendes som lægemiddel.

Dihydrocyclosporin C er især indiceret som antiarthritikum og til behandling af immunologisk betingede reaktioner.

Dihydrocyclosporin C's immunodepressive virkning er vist ved de følgende forsøg, der er beskrevet af J.F. Borel et al. i *Agents and Actions* 6, 1976, s. 468-475.

Jerne-test (PFC: plaque-dannende celler)

Dihydrocyclosporin C's inhiberende virkning på de celler, der danner de hæmolytiske antistoffer (IgM/19S), blev bestemt hos mus. Mus blev immuniseret ved intravenøs indgivelse af 4×10^8 fåreerythrocyter og behandlet med testforbindelsen, og antallet af PFC i milten blev bestemt og sammenlignet med kontroldyr. Ved oral indgivelse i doser på mellem 50 og 200 mg/kg udøver dihydrocyclosporin C i denne test en klar stimulering af dannelsen af IgM-antistof.

Reaktion på hæmagglutination hos mus

Virksomheden af dihydrocyclosporin C hos mus på indholdet af serumagglutinin IgG/7S blev bestemt. Dyrene blev immuniseret ved intrave-

nøs indgivelse af 4×10^8 fåreerythrocyter. På dagen for injektionen samt de fire følgende dage blev musene behandlet med testforbindelsen. På den 9. dag blev der udtaget blod, og indholdet af serumagglutinin blev bestemt ved mikroagglutinationstesten ifølge Takatsy.

- 5 Virkningen på indholdet af agglutinin udtrykkes ved undertrykkesindexet (SI), der defineres på følgende måde:

$$SI = \frac{\text{Titer } (-\log_2) \text{ af behandlede dyr}}{\text{Titer } (-\log_2) \text{ af kontroldyr}}$$

- 10 Efter oral indgivelse af 5×250 mg/kg dihydrocyclosporin C blev der fundet en SI-værdi på 1,14, hvilket svarer til en ubetydelig forøgelse af indholdet af agglutinin.

Forlængelse af overlevelsestiden for transplantationer hos mus

- 15 Forlængelsen af overlevelsestiden for transplantationer ved locus H-2 hos histo-inkompatible mus blev bestemt efter oral indgivelse af dihydrocyclosporin C. Ved en dosis på $6 \times 200 + 4 \times 100$ mg/kg er forlængelsen af overlevelsestiden for transplantationer sammenlignet med kontroller meget betydelig (ca. 15 dage).

Inhibering af eksperimentel allergisk encephalomyelitis hos rotter.

- 20 Den inhiberende virkning af dihydrocyclosporin C på eksperimentel allergisk encephalomyelitis blev bestemt hos rotter. Dyrene blev sensibiliseret ved subcutan indgivelse af en emulsion af rygmarv og Freund's adjuvans til hver af bagpoterne, og rotterne blev derefter behandlet 15 gange efter hinanden med testforbindelsen. Den allergiske encephalomyelitis viste sig ved fremkomsten af lammelsessymptomer.
- 25 Efter oral indgivelse af 15×80 mg/kg dihydrocyclosporin C blev der ikke observeret nogen lammelsessymptomer hos en gruppe på 8 sensibiliserede rotter, medens alle rotterne i en gruppe kontroldyr blev ramt af lammelse.

Cutan test af retarderet hypersensibilitet hos mus.

- Den inhiberende virkning af dihydrocyclosporin C på hypersensibilitet over for oxazon hos mus blev bestemt. Musene blev sensibiliseret ved en cutan påføring af oxazon, og 10 dage derefter blev der foretaget endnu en påføring af oxazon på dyrenes ene øre med henblik på at fremkalde den allergiske reaktion. På dagen for den første påføring samt 4 dage derefter blev musene behandlet med testforbindelsen. Inhibering af hypersensibiliteten udtrykkes ved undertrykkelsesindexet (SI), der defineres på følgende måde:

$$SI = \frac{\text{Øretykkelsesforskel hos behandlede dyr}}{\text{Øretykkelsesforskel hos kontroldyr}}$$

Efter oral indgivelse af 5 x 70 mg/kg og 5 x 200 mg/kg blev der fundet en SI-værdi på henholdsvis 0,63 og 0,48.

- 15 Takket være disse egenskaber kan dihydrocyclosporin C anvendes terapeutisk til profylakse og behandling af sygdomme, der nødvendiggør sænkning af den cellulære immunitetsreaktion.

- Den antiarthritiske virkning af dihydrocyclosporin C blev påvist hos rotter ved følgende test. I en gruppe på 6-10 dyr, der hver vejede ca. 130 g, blev der i såleregionen på en bagpote subcutant injiceret en oliesuspension af dræbte og lyofiliserede mycobakterier (6 mg/ml). Der blev først observeret en forøgelse af potens volumen og derefter, efter 12-14 dage, en generel arthritis. Testforbindelsen blev indgivet oralt på dagen for injektion, hvilket blev gentaget 14 gange under de tre følgende uger. Der blev derefter bestemt forøgelse af potevolumenet på den pote, hvor suspensionen var blevet injiceret (primært symptom), og forøgelse af volumenet af den anden bagpote (sekundær arthritis). Sammenligning af de opnåede værdier for de dyr, der var behandlet med testforbindelsen, med værdierne for kontroldyrene gav et mål for den antiarthritiske virkning. I denne test inhiberer dihydrocyclosporin C klart forøgelsen af potevolumenet hos rotter. Efter oral indgivelse med en daglig dosis på fx 30 mg/kg inhiberer forbin-

delsen det primære symptom med 78% og den sekundære arthritis med 100%.

Ved gentagelse af den samme test, men ved indgivelse af testforbindelsen fra den 14. til den 21. dag efter injektionen med en daglig oral dosis på 20 mg/kg, blev der med dihydrocyclosporin C observeret en inhibering af det primære symptom på 32% og af den sekundære arthritis på 57%.

Takket være denne egenskab kan dihydrocyclosporin C anvendes terapeutisk til profylakse og behandling af arthritis og reumatiske sygdomme.

Som lægemiddel kan dihydrocyclosporin C administreres alene eller i egnet lægemiddelform med farmakologisk indifferente hjælpestoffer.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved følgende eksempel

15 EKSEMPEL

420 mg palladium/kul (10% palladium) hydrolyseres forud i 75 minutter i 40 ml ethanol. Til denne suspension af palladiumkatalysatoren sættes en opløsning af 8,53 g cyclosporin C i 110 ml ethanol, og derefter hydrogeneres ved 20°C og et tryk på 736 mm kviksølvstøjle indtil afslutning af hydrogenoptagelse. Derefter frafiltreres katalysatoren, og filtratet inddampes i vakuum ved 20-40°C til tørhed. Remanensen chromatograferes på en søjle af 1 kg silicagel Merck®, kornstørrelse 0,06-0,2 mm. Ved eluering med chloroform/methanol (97,5:2,5) fås efter forening af de rene fraktioner hvidt amorft dihydrocyclosporin C, som tørres i højvakuum ved 55°C i 6 timer. Til befrielse fra vand inddampes præparatet tre gange med benzen i vakuum ved 30-50°C og tørres derefter først ved 55°C (2 timer) og derefter ved 80°C (2 timer) i højvakuum.

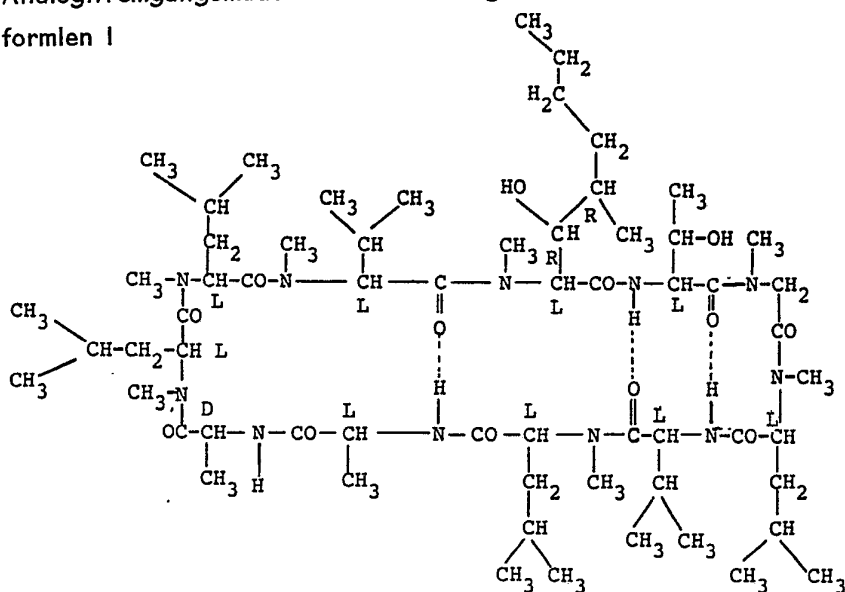
Det som udgangsmateriale anvendte cyclosporin C fremstilles på følgende måde:

- Et ved aerob submers dyrkning af *Tolypocladium inflatum* Gams, tidligere kaldet *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai (NRRL 8044) vundet dyrkningsmedium (400 liter) (se eksempel 3 i tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.455.859) udrøres med 400 liter n-butylacetat. Efter behandling i en Westfalia-centrifuge koncentrerer den organiske fase i vakuum, og rækstrakten affedtes ved 3-trinsfordeling mellem petroleumsether og methanol/vand (9:1). Det vundne materiale opløses i chloroform og chromatograferes på 4,5 kg Merck® Kieselgel 60, kornstørrelse 0,2-0,5 mm, hvorved der som elueringsmiddel anvendes chloroform med stigende mængder methanol. De med chloroform + 1,5% methanol vundne fraktioner indeholder overvejende cyclosporin A og B, og de senere med chloroform +3% methanol eluerede dele indeholder overvejende cyclosporin C. Påvisningen deraf i eluatfraktionerne udføres ved hjælp af tyndtlagschromatografi, idet den udviser en væsentlig lavere R_f -værdi end de to først angivne substanser, fx på Polygram® Silicagel-færdigfolier med chloroform/methanol (95:5) som løbemiddel, R_f -værdi = 0,26 (R_f af cyclosporin A: 0,44 og af cyclosporin B: 0,37). Efter forening og inddampning af de eluatfraktioner, som ifølge tyndtlagschromatografisk undersøgelse helt eller overvejende består af cyclosporin C, gentages den chromatografiske rensning. Eluatfraktionerne undersøges ved tyndtlagschromatogram som angivet ovenfor med hensyn til sammensætningen, og de fraktioner, som helt består af cyclosporin C, samles og inddampes i vakuum til tørhed ved 20-40°C. Remanensen behandles efter opløsning i den 10-dobbelte mængde alkohol med 5 vægtprocent aktivt kul, filtratet inddampes efter frafiltrering af kullet i vakuum ved 20-40°C, og remanensen tørres i højvakuum ved 55°C.
- Det sidste rensningstrin består i, at remanensen opløses i den 5-dobbelte mængde ether, og det faste stof udfældes ved langsom tilsætning af den 30-dobbelte mængde hexan under rystning, og det frafiltreres efter afkøling af blandingen til 0-5°C, vaskes med kold hexan og tørres i højvakuum ved 55°C. Ud fra den 2,5-dobbelte mængde acetone vindes ved -15°C farveløse prismatiske nåle af krystallinsk cyc-

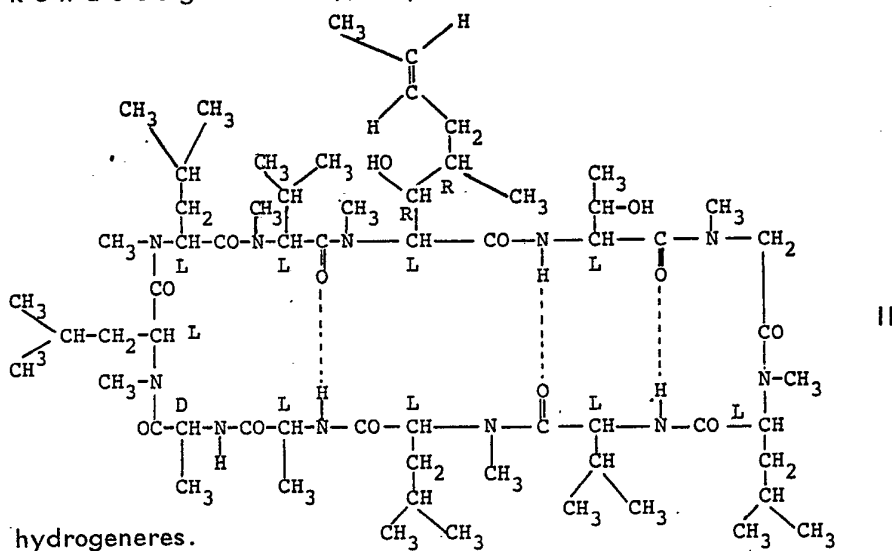
losporin C. Smeltepunkt 152-155°C, $[\alpha]_D^{20} = -255^\circ$ (chloroform, c = 0,5) og $[\alpha]_D^{20} = -182^\circ$ (methanol, c = 0,5).

PATENTKRAV

Analogifremgangsmåde til fremstilling af dihydrocyclosporin C med
5 formen I



kendetegnet ved, at cyclosporin C med formen II



hydrogeneres.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 6170/74 (patent nr. 136780).

FIG. 1

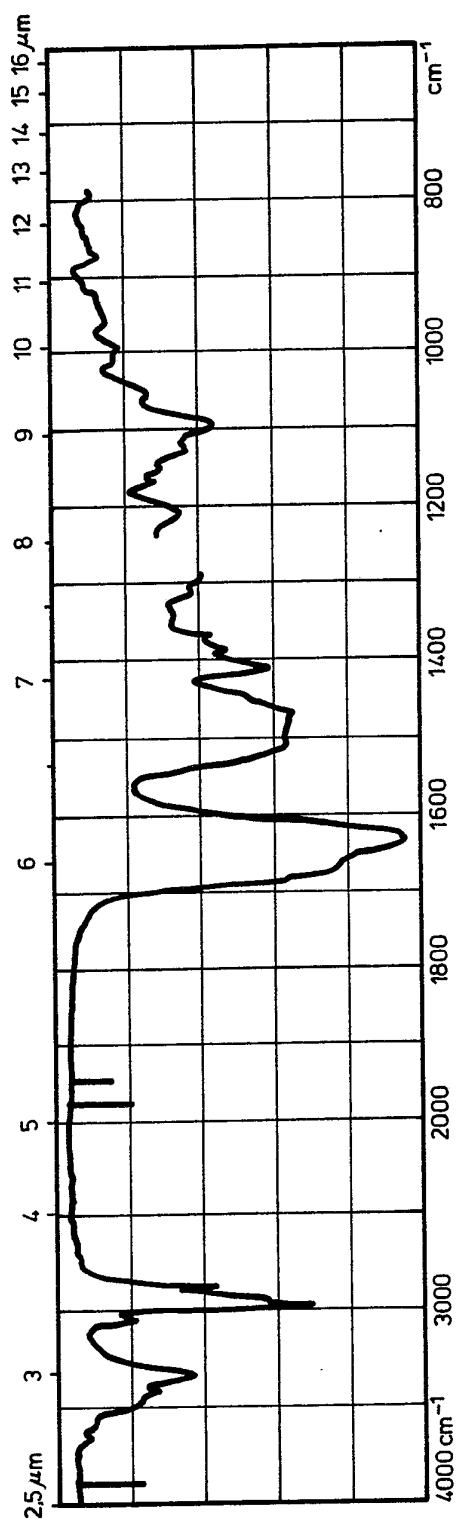


FIG. 2

