

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 148752 B



DIREKTORATET FOR PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 4281/79

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

(22) Indleveringsdag: 10 okt 1979

(41) Alm. tilgængelig: 19 apr 1980

(44) Fremlagt: 16 sep 1985

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 18 okt 1978 CH 10776/78 22 mar 1979 CH 2696/79 15 aug 1979 CH 7480/79

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

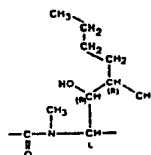
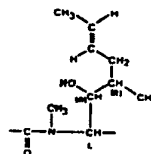
(72) Opfinder: Rene P. \*Traber; CH, Hans \*Hofmann; CH, Eugen \*Haerri; CH, Max \*Kuhn; CH.

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af cyclosporinderivater

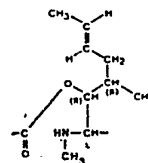
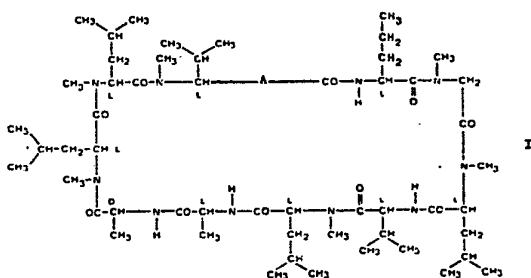
hvor A betegner

(57) Sammendrag:



4281-79

Cyclosporinderivater med formlen

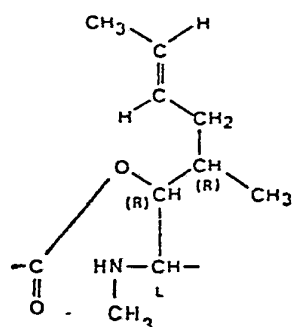


fremstilles ved dyrkning af cyclosporin G-producerende stamme, fortrinsvis af Tolypocladium, og dihydrocyclosporin G og isocyclosporin G fremstilles ved henholdsvis hydrogenering og omløjring af cyclosporin G.

Cyclosporin G, dihydrocyclosporin G og isocyclosporin G udviser en monosuppressiv og betændelsehæmmende virkning.

DK 148752 B





(i det efterfølgende betegnet isocyclosporin G).

Det er kendt, jfr. dansk fremlæggeskrift nr. 136.780 og beskrivelserne til de danske patentansøgninger nr. 4831/76 og 1887/78, at fremstille cyclosporiner betegnet cyclosporin A (også kendt som S 7481/F-1), cyclosporin B (også kendt som S 7481/F-2), cyclosporin C og cyclosporin D ved dyrkning af en stamme af svampearten *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers) især NRRL 8044 og isolering af nævnte cyclosporiner fra kulturfiltratet. Nævnte stamme er nu indordnet under svampearten *Tolypocladium inflatum Gams*.

Det har nu overraskende vist sig, at ovennævnte mikroorganismeart udover cyclosporin A, B, C og D danner et yderligere cyclosporin, nemlig cyclosporin G.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse til fremstilling af de hidtil ukendte cyclosporiner med den almene formel I er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved, at der

- a) ud fra et kulturfiltrat vundet ved dyrkning af en cyclosporinproducerende stamme af svampearten *Tolypocladium inflatum Gams* isoleres cyclosporin G, hvorpå det vundne cyclosporin G
- 20 b) eventuelt hydrogeneres til dannelse af dihydrocyclosporin G, eller
- c) eventuelt underkastes syrebehandling til dannelse af isocyclosporin G.

Til fremstilling af cyclosporin G kan som nævnt anvendes stammer af svampearten *Tolypocladium inflatum Gams*, fx NRRL 8044 eller sådanne,

som fås ved selektion eller mutation af svampestammen NRRL 8044 under indvirkning af ultraviolette stråler eller røntgenstråler eller ved anvendelse af andre forholdsregler, fx ved behandling af laboratoriekulturerne med egnede kemikalier.

- 5 En anden kultur af en cyclosporin G-producerende stamme er deponeret hos Fermentation Research Institute, Inage, Chiba City, Japan under kulturnummeret FRI FERM-P nr. 2796.

Cyclosporin G kan også isoleres på i og for sig kendt måde, fx som beskrevet i eksempel 1. Herved kan cyclosporin G skilles fra de samtidig tilstedeværende naturprodukter, fx det mindre polære cyclosporin D, det noget mere polære cyclosporin A og det polære cyclosporin B og det endnu mere polære cyclosporin C.

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

20 Som opløsningsmiddel anvendes fortrinsvis ethylacetat eller lavere aliphatiske alkoholer såsom methanol, ethanol eller isopropanol. Hydrogeneringen sker hensigtsmæssigt i det neutrale område ved temperaturer mellem 20°C og 30°C og ved atmosfæretryk eller svagt forøget tryk. Som katalysator kan anvendes platin eller fortrinsvis palladium, fx palladium på kul.

25 Omlejringen ifølge det eventuelle fremgangsmådetrin c) kan udføres på i og for sig kendt måde ved syrebehandling, fx med stærke organiske syrer såsom trifluoreddikesyre, fortrinsvis methansulfonsyre eller p-toluensulfonsyre.

Den mængde stærk syre, som anvendes til isomeriseringen, ligger fortrinsvis mellem 1 og 4 mol pr. mol cyclosporin G.

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

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

Cyclosporin G, dihydrocyclosporin G og isocyclosporin G udmærker sig ved interessante kemoterapeutiske og farmakologiske egenskaber og kan derfor anvendes som lægemidler.

Cyclosporin G, dihydrocyclosporin G og isocyclosporin G udmærker sig især ved en immunosuppressiv og betændelseshæmmende virkning.

Som lægemidler kan cyclosporin G, dihydrocyclosporin G og isocyclosporin G administreres alene eller i egnet lægemiddelform sammen med farmakologisk inerte hjælpestoffer.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse belyses nærmere ved følgende eksempler.

#### EKSEMPEL 1

##### Cyclosporin G.

500 liter af en næringsopløsning, som pr. liter indeholder 40 g glucose, 2,0 g natriumcaseinat, 2,5 g ammoniumphosphat, 5 g magnesiumsulfat-heptahydrat, 2 g kaliumdihydrogenphosphat, 3 g natriumnitrat, 0,5 g kaliumchlorid, 0,01 g ferrosulfat og demineraliseret vand, podes med 50 liter af en forkultur af stammen NRRL 8044 og inkuberes i en stålfermenter under omrøring (170 rpm) og beluftning (1 liter luft/min./-liter næringsopløsning) i 13 dage ved 27°C (se tysk offentliggørelses-skrift nr. 2.455.859).

Dyrkningsmediet udrøres med en lige så stor mængde n-butylacetat, efter fraskillelse koncentrerer den organiske fase i vakuum, og råekstrakten affedtes ved 3-trinsfordeling mellem methanol-vand (9:1) og petroleumsether. Den methanoliske fase fraskilles og koncentrerer i vakuum, og råproduktet udfældes ved tilsætning af vand. Det efter filtrering vundne materiale chromatograferes på en 5- til 7-gange så

stor mængde "Sephadex"® LH-20 med methanol som elueringsmiddel. Spidsfraktionerne chromatograferes derefter på "kieselgel 60", kornstørrelse 0,063-0,2 mm (Merck) med hexan-acetone (2:1), hvorved de først eluerede fraktioner overvejende indeholder cyclosporin A og cyclosporin D, de senere eluerede dele overvejende cyclosporin C. Til yderligere rensning krystalliseres de cyclosporin A- og D-holdige fraktioner af en 2- til 2,5-gange så stor mængde acetone ved -15°C og opspaltes derefter ved to ganges chromatografi på "kieselgel 60", kornstørrelse 0,063-0,2 mm (Merck), hvorhos de med hexan-acetone (2:1) først eluerede fraktioner indeholder cyclosporin D i stærkt beriget form. Disse opløses i en dobbelt så stor mængde acetone og lades henstå ved -15°C til krystallisation. Det derved vundne råkrystalliserat består af særdeles stærkt beriget cyclosporin D, og moderluden indeholder foruden cyclosporin D yderligere bestanddele, således cyclosporin G. Til udvinding af cyclosporin G chromatograferes den til tørhed inddampede moderlud på "kieselgel 60", kornstørrelse 0,063-0,2 mm (Merck), med vandmættet ethylacetat, hvorhos de først eluerede fraktioner indeholder cyclosporin D, og de senere eluerede fraktioner cyclosporin G i blanding med yderligere bestanddele. Til yderligere berigelse chromatograferes blandingen først på "kieselgel 60", kornstørrelse 0,063-0,2 mm (Merck), med chloroform-methanol (98:2) og derefter til opspaltning med hexan-acetone (2:1); de senere eluerede fraktioner indeholder cyclosporin G i stærkt beriget form. Til renudvinding krystalliseres cyclosporin G-bestanddele to gange af ether-petroleumsether (1:1) ved stuetemperatur, hvorved fås tyndtlagschromatografisk ensartet, rent (renhedsgrad > 95%) cyclosporin G i form af farveløse polyedere, smeltepunkt 193-194°C (efter tørring af krystallerne i højvakuum ved 80°C i to timer).

$[\alpha]_D^{20} = -245^\circ$  (c = 1,00 i chloroform)  
 -191° (c = 1,04 i methanol)

UV-spektrum i methanol: slutabsorption.

IR-spektrum i methylenchlorid: se fig. 1.

$^1\text{H}$ -NMR-spektrum i  $\text{CDCl}_3$  ved 90 MHz med tetramethylsilan som intern standard: se fig. 2.

Bruttoformel:  $\text{C}_{63}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$ .

#### EKSEMPEL 2

##### 5 Dihydrocyclosporin G.

700 mg palladium-kul (10% palladium) forhydrogeneres i 20 ml ethanol i 30 minutter. Til denne palladiumkatalysatorsuspension sættes en opløsning af 4,55 g cyclosporin G opnået som i eksempel 1 i 60 ml ethanol, og derefter hydrogeneres ved  $21^\circ\text{C}$  og et tryk på 742 mm Hg indtil afslutning af hydrogenoptagelsen. Derefter frafiltreres katalysatoren, og filtratet inddampes i vakuum ved  $20\text{--}40^\circ\text{C}$  til tørhed. Remanensen består af tyndtlagschromatografisk ensartet dihydrocyclosporin G i form af et hvidt amorft pulver, smeltepunkt  $150\text{--}153^\circ\text{C}$  (efter tørring i højvakuum i fire timer ved  $80^\circ\text{C}$ ).

15 Bruttoformel:  $\text{C}_{63}\text{H}_{115}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$ .

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -232^\circ$  ( $c = 0,64$  i chloroform)

UV-spektrum i methanol: slutabsorption

IR-spektrum i methylenchlorid: se fig. 3.

20  $^1\text{H}$ -NMR-spektrum i  $\text{CDCl}_3$  ved 90 MHz og med tetramethylsilan som intern standard: se fig. 4.

#### EKSEMPEL 3

##### Isocyclosporin G.

Til en opløsning af 6,08 g cyclosporin G opnået som i eksempel 1 i 40 ml absolut dioxan sættes en opløsning af 1,20 g methansulfonsyre i

20 ml dioxan, og blandingen holdes ved 50°C under udelukkelse af fugt. Reaktionens forløb følges ved tyndtlagschromatogram (polygram SIL G-folier, chloroform-methanol-iseddike (90:6:4), iodamp til synliggørelse). Efter 16 timer afkøles til stuetemperatur. Ved tilsætning af 1,13 g vandfrit natriumacetat neutraliseres syren, efter 45 minutters omrøring isoleres det udfældede salt ved sugefiltrering, og filtratet inddampes i vakuum ved 45°C. Herved fås 8,1 g remanens, som chromatograferes på 500 g "kieselgel", Merck, kornstørrelse 0,063-0,2 mm, hvorhos der som elueringsmiddel anvendes chloroform-methanol (98:2). De praktisk taget af rent isocyclosporin G bestående fraktioner forenes og inddampes i vakuum ved 50°C, og remanensen krystalliseres af ether ved 7°C, hvorved fås isocyclosporin G, smeltepunkt 143-146°C.

Bruttoformel:  $C_{63}H_{113}N_{11}O_{12}$ .

15  $[\alpha]_D^{20} = -196^\circ$  (c = 0,72 i chloroform)  
-128° (c = 0,73 i methanol)

UV-spektrum i methanol: slutabsorption

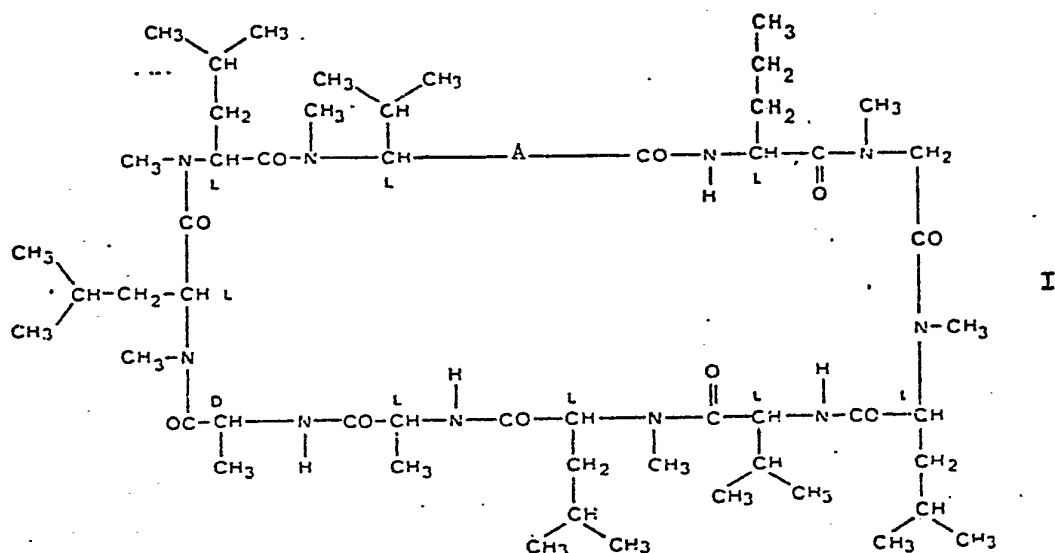
IR-spektrum i methylenchlorid: se fig. 5.

1H-NMR-spektrum i  $CDCl_3$  ved 90 MHz og med tetramethylsilan som intern standard: se fig. 6.

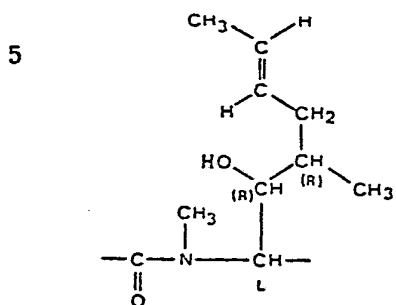


## PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af cyclosporinderivater med den al-  
mene formel I

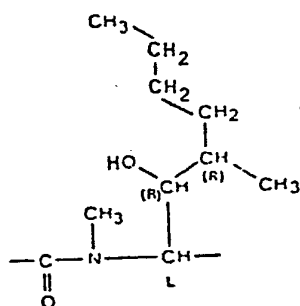


hvor A betegner



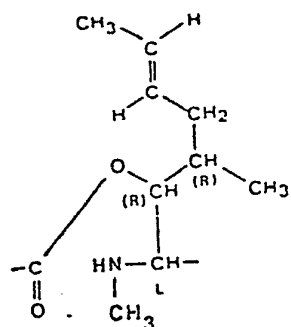
(her betegnet cyclosporin G)

eller



(her betegnet dihydrocyclosporin G)

eller



(her betegnet isocyclosporin G).

kendetegnet ved, at

- a) der ud fra et kulturfiltrat vundet ved dyrkning af en cyclosporin-producerende stamme af svampearten *Tolypocladium inflatum Gams* isoleres cyclosporin G, hvorpå det vundne cyclosporin G
- 5 b) eventuelt hydrogeneres til dannelse af dihydrocyclosporin G, eller
- c) eventuelt underkastes syrebehandling til dannelse af isocyclosporin G.

Fremdragne publikationer:

DK patent nr. 136780.

FIG. 1

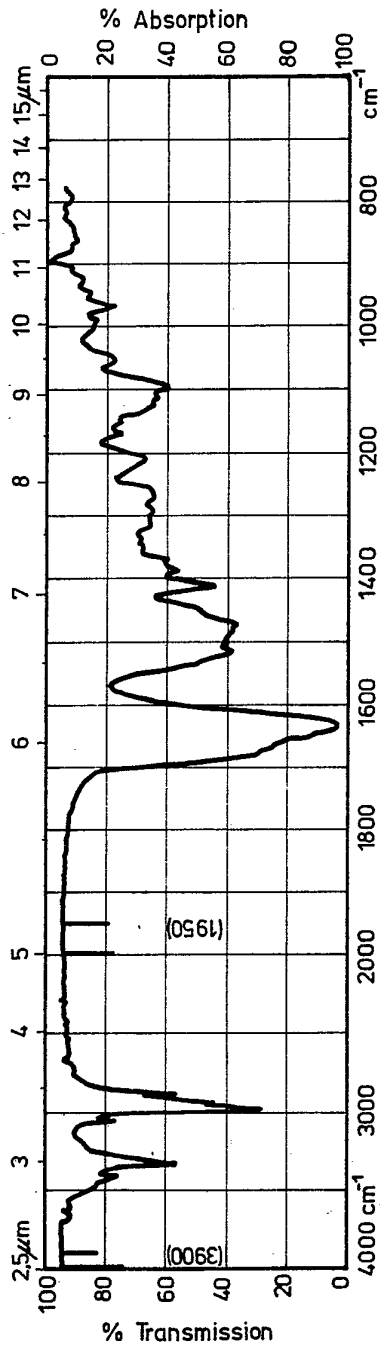
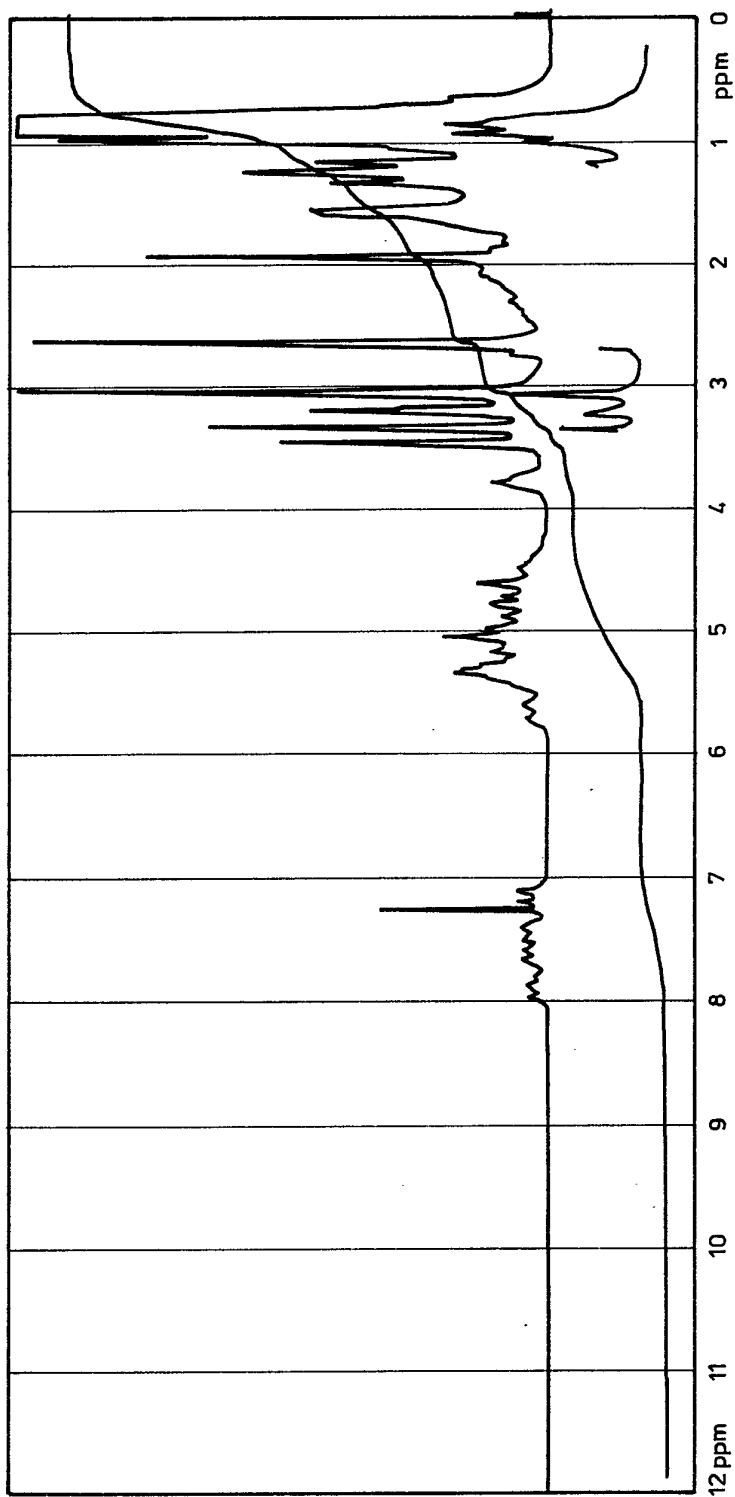


FIG. 2



- 3 -

FIG. 3

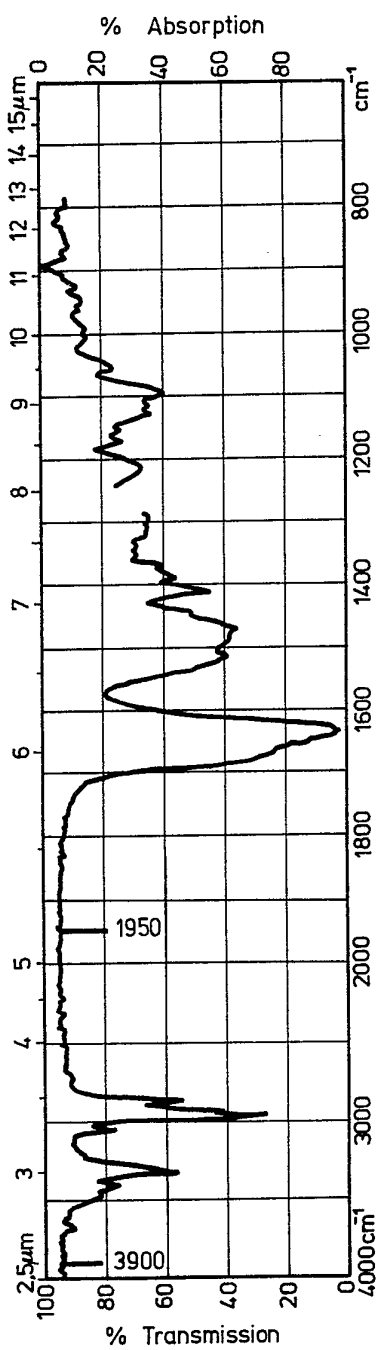


FIG. 4

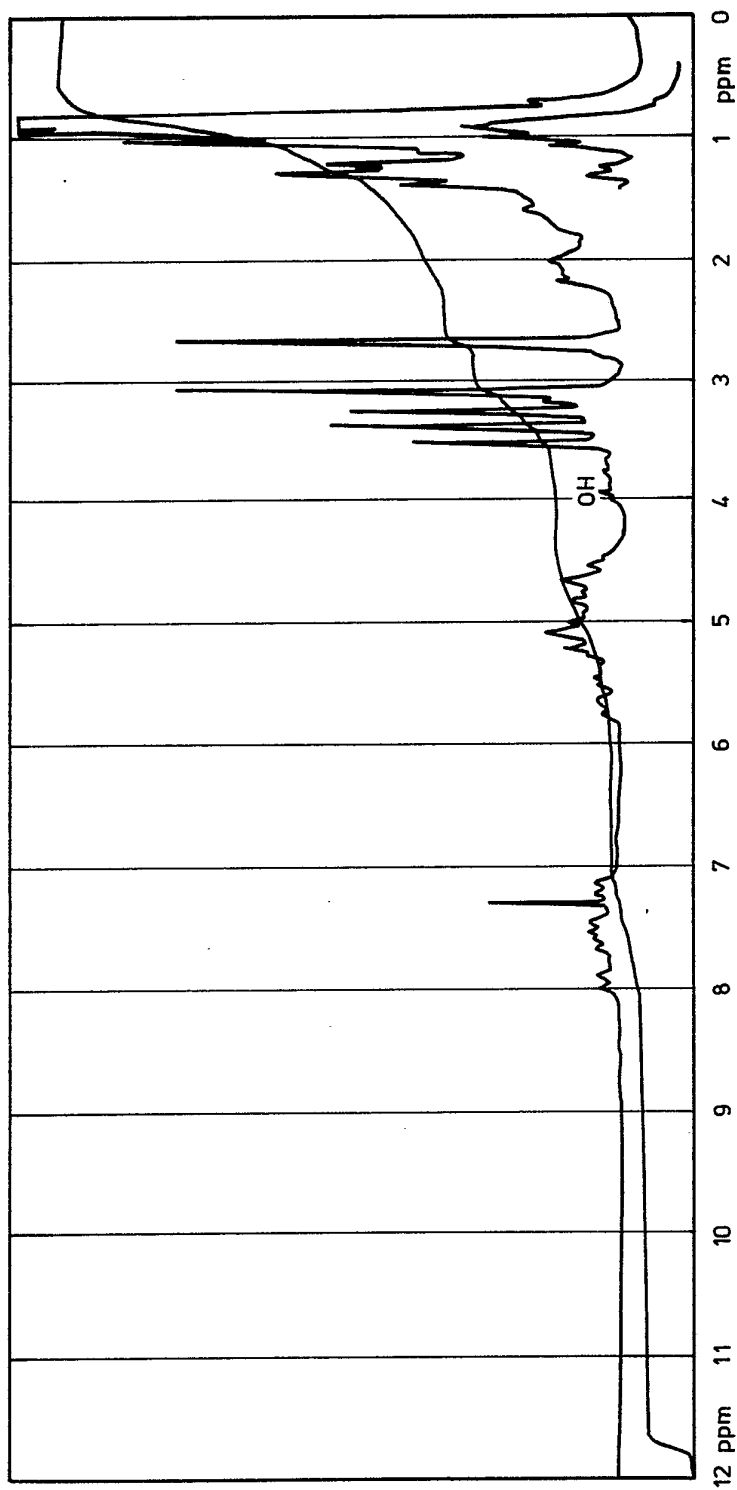
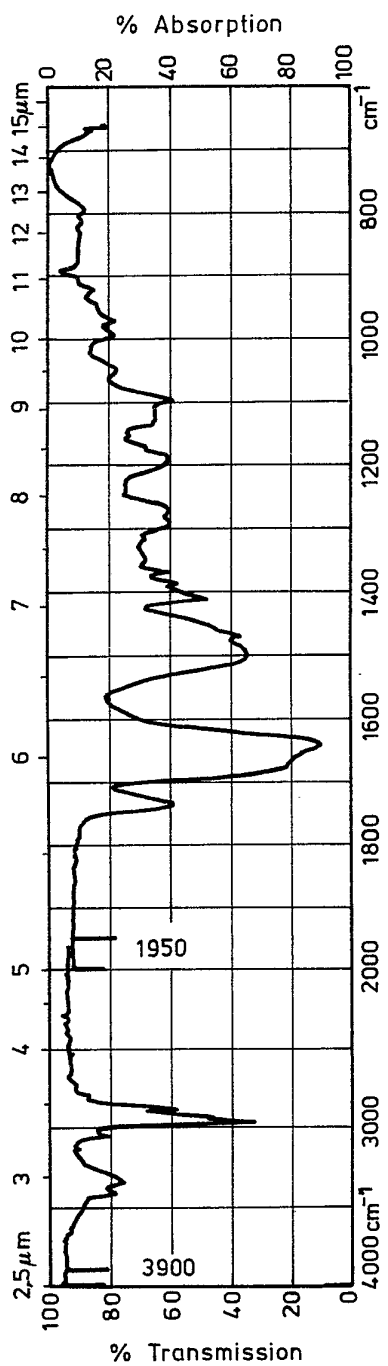


FIG. 5



- 6 -

FIG. 6

