

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

10 ES	11 21	NUMERO	16 A 1
		452.942	
22		FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
14195/75	4.11.75	SUIZA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D/A61K	

64 TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE DIHIDROCICLOSPORINA C

71 SOLICITANTE (S)
SANDOZ, A.G.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Basilea, Suiza.

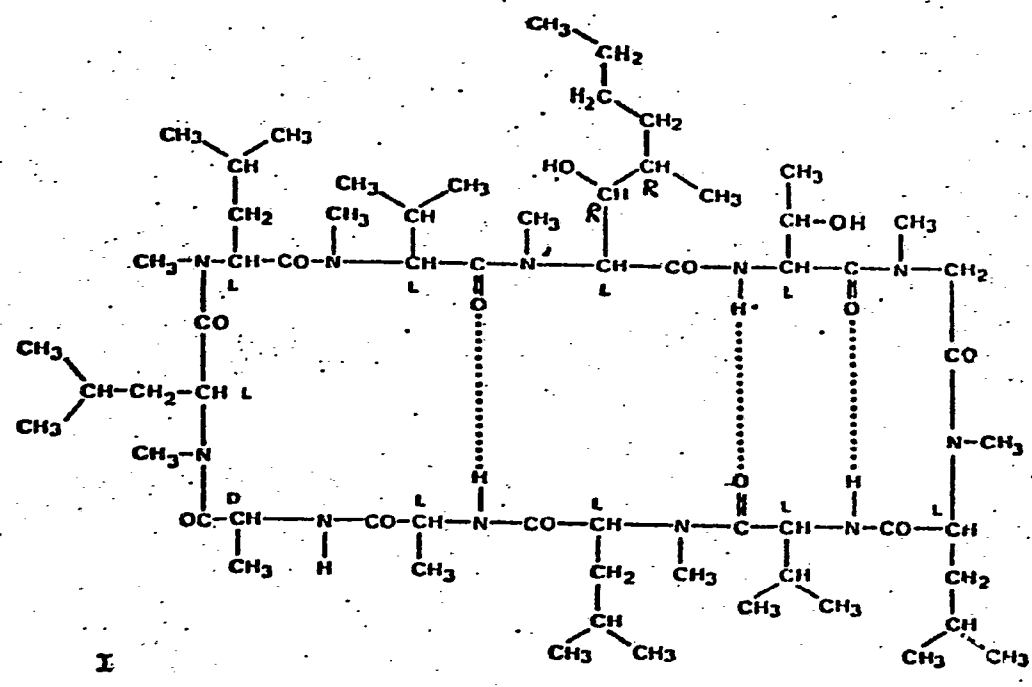
72 INVENTOR (ES)
Dr. Artur Rfegger., Max Kuhn

73 TITULAR (ES)

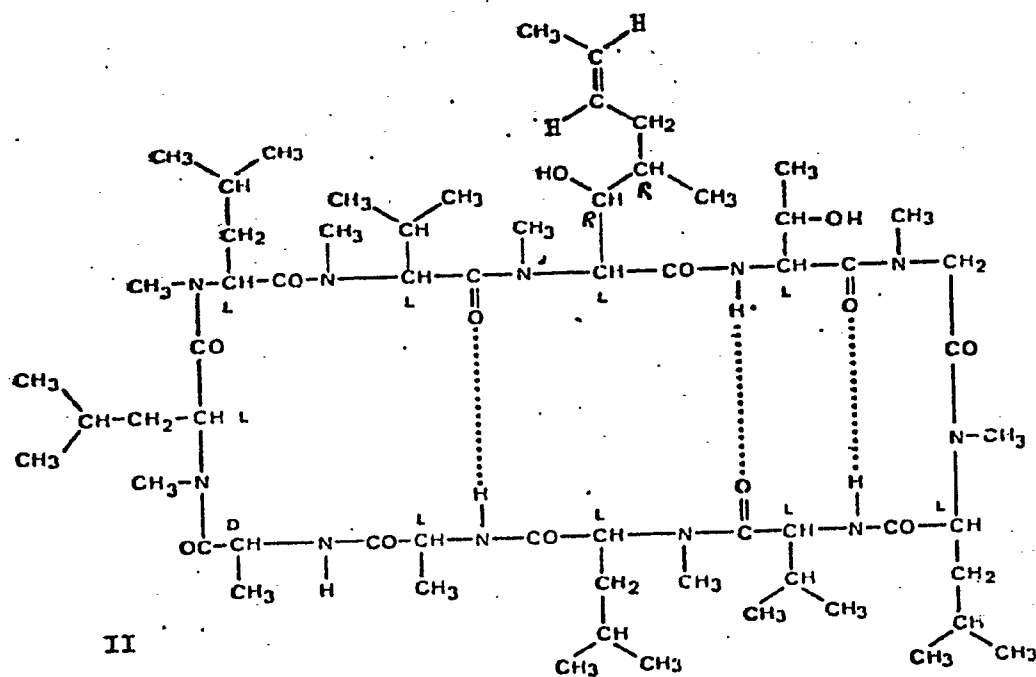
74 REPRESENTANTE
D. JAIME GOMEZ-ACEBO Y MODET

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar ciclosporinas.

La presente invención proporciona el compuesto dihidrociclosporina C de fórmula I,



5 La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de dihidrociclosporina C mediante hidrogenación de ciclosporina C de fórmula II,



La dihidrociclosporina C tiene las caracte-

rísticas siguientes:-

P.F. 160° - 162°C (amorfa), ligeramente higroscópica,

$[\alpha]_D^{20} = -242^\circ$ (c = 0,5 en CHCl_3)

5 $= -174,5^\circ$ (c = 0,5 en CH_3OH).

Espectro U.V. (CH_3OH) - absorción final

Espectro I.R. (CH_2Cl_2) - véase la figura 1.

Espectro de RMN a 90 megaciclos por segundo (CDCl_3) -

véase la figura 2 (tetrametilsilano como standard inter-

10 no; las señales a 7,23 y 7,33 ppm son ocasionadas por

pequeñas cantidades de CHCl_3 y C_6H_6 respectivamente).

Análisis

Calculado

para $\text{C}_{62}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$: C 61,0% H 9,3% N 12,6% O 17,0%

5 Hallado: C 61,1% H 9,6% N 12,4% O 17,3%

Solubilidad

A temperatura ambiente, la dihidrociclosporina C es fácilmente soluble en benceno, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol, y es difícilmente soluble en agua.

10

Cromatograma de capa delgada (Gel de sílice "Merck"
60 F-254)

Eluyente	Valor R_f
Cloroformo/metanol (94:6)	0,40
15 Acetona	0,66
Acetona/hexano (1:1)	0,38
Acetona/cloroformo (1:1)	0,42

Las manchas pueden detectarse en forma de por si conocida, por ejemplo con yodo.

20 El procedimiento puede efectuarse en forma de por si conocida para tales reacciones de hidrogena-

ción, por ejemplo mediante hidrogenación catalítica.

Los disolventes adecuados incluyen: acetato de etilo o alcoholes alifáticos inferiores, por ejemplo metanol, etanol o isopropanol. La hidrogenación se efectúa convenientemente bajo condiciones neutras a una temperatura entre 20 y 30°C, a presión atmosférica o presiones ligeramente elevadas. Los catalizadores adecuados incluyen: platino, preferentemente paladio, por ejemplo paladio sobre carbón.

El producto de hidrogenación resultante puede ser purificado en forma conocida, por ejemplo mediante cromatografía.

El material inicial, la ciclosporina C, puede obtenerse mediante el cultivo de una cepa productora de ciclosporina C de la especie de hongo *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers) Rifai o *Cylindrocarpon lucidum* Booth, y aislamiento de la ciclosporina C del caldo de cultivo resultante.

El cultivo puede efectuarse en forma conocida (véase por ejemplo la memoria de patente para publicación alemana 2,455,859), usando preferentemente la cepa NRRL 5670 o 8044 depositada en la depositaria del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Northern Research and Development Division) Peoria,

EJEMPLO

420 mg de paladio sobre carbón (10 % de paladio) en 40 cc de etanol se prehidrogenan durante 75 minutos. A la suspensión resultante del catalizador se le añade una solución de 8,53 g de ciclosporina C en 110 cc de etanol. La mezcla se hidrogena a 20° y a una presión de 736 mm de mercurio hasta que cese la absorción de hidrógeno. El catalizador se separa mediante filtración y el filtrado se evapora hasta sequedad a 20° a 40°. El residuo se cromatografía sobre una columna de 1 kg de gel de sílice "Merck" (tamaño - 0,06 - 0,2 mm de diámetro). La elución con cloroformo/metanol (97,5:2,5) proporciona, después de combinar las fracciones puras, la dihidrociclosporina C amorfa, blanca, la que se seca en un alto vacío a 55° durante 6 horas. Con el fin de separar agua, se recoge el producto en benceno y se evapora en un vacío a 30° a 50°. El procedimiento se repite dos veces más, efectuándose el secado final a 55° (2 horas) y luego a 80° (2 horas) en un alto vacío.

El material inicial ciclosporina C se obtiene como sigue:-

400 litros de un caldo de cultivo obtenido

mediante el cultivo aeróbico por sumersión de la cepa NRRL 8044 de *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers) Rifai [véase el ejemplo 3 de la memoria de patente para publicación alemana 2,455,859] se extraen median-
5 te agitación con 400 litros de acetato de n-butilo. Después de la separación en un separador Westfalia, la fase orgánica se concentra en un vacío y el extrac-
to bruto se desengrasa mediante una extracción de tres fases entre éter de petróleo y metanol/agua (9:1).
10 El material resultante se disuelve en cloroformo y se cromatografía sobre 4,5 kg de gel de sílice 60 "Merck" (diámetro 0,2 a 0,5 mm), usando cloroformo con canti-
dades crecientes de metanol como eluyente. Con cloro-
formo + 1,5% de metanol se eluyen las ciclosporinas A
15 y B, y con cloroformo + 3% de metanol se eluye la ciclosporina C. [La ciclosporina C puede detectarse usando la cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice "Polygram" usando cloroformo/metanol
95:5 como eluyente. Valores Rf - ciclosporina A
20 0,44; B 0,37; C 0,26].

Después de combinar y de evaporar las fracciones de la elución conteniendo ciclosporina C, se repite la purificación cromatográfica. Las fracciones conteniendo ciclosporina C se reúnen y se

evaporan a 20 - 40°. El residuo se trata con 10 veces su peso de una mezcla de alcohol conteniendo 5 % por peso de carbón activo. Después de la filtración, la mezcla se evapora a 20° a 40° en un vacío y luego se seca en un alto vacío a 55°C.

La purificación final consiste en disolver el residuo resultante en una cantidad 5 veces mayor de éter y en añadir lentamente una cantidad 30 veces mayor de hexano. Al sacudir, precipita una substancia sólida, la que se recoge después de enfriar la mezcla a 0° a 5°. Esta se lava con hexano frío y se seca a 55° en un alto vacío. De una cantidad 2,5 veces mayor de acetona, el residuo proporciona a -15°, agujas prismáticas, incoloras, de ciclosporina C cristalina.

P.F. = 152° - 155°

$$[\alpha]_D^{20} = -255^\circ \text{ (c = 0,5; CHCl}_3\text{)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = -182^\circ \text{ (c = 0,5; CH}_3\text{OH).}$$

La dihidrociclosporina C exhibe actividad farmacológica en animales. La dihidrociclosporina C exhibe particularmente un efecto estimulante en la inmunidad humoral, y una actividad inmunosupresiva en la inmunidad celular, como lo demuestran los ensayos usuales, por ejemplo los ensayos

descritos en J.F. Borel et al, Agents and Actions 6,
468-475 (1976), a saber:-

- 5 i) en el ensayo según Jerne se observa el efecto
de la sustancia sobre la hemólisis local en
gel. Se obtiene un estímulo significativo de
las células formadoras de placas hemolíticas,
tales como los anticuerpos de globulina inmune
M y G_{2a}, a una dosificación de 50 a 200 mg/kg
per os de peso del cuerpo del ratón;
- 10 ii) en el ensayo de hemaglutinación (EHA) en ra-
tones se obtiene un estímulo de los anti-
cuerpos formados contra los eritrocitos de la
oveja a una dosis de 100 a 200 mg/kg per os
de peso del cuerpo del animal;
- 15 iii) en el ensayo de injerto de piel (heteroinjerto)
en ratones, se observa una prolongación signi-
ficante del período de supervivencia de los
injertos de piel en ratones compatibles con
histoína H-2 a una dosis de 100 a 200 mg/kg
per os de peso del cuerpo del animal;
- 20 iv) en el ensayo de la encefalomiелitis alérgica
experimental (EAE) en ratas, se reduce signi-
ficantemente la incidencia de la parálisis in-

ducida por daños inducidos experimentalmente al tejido nervioso a una dosis entre 50 y 100 mg/kg/día;

- 5 v) en la reacción de hipersensibilidad de la piel a la oxazolona en ratones, se obtiene una inhibición significativa y pronunciada de la tumefacción (índice supresivo 0,48 a 0,63) con dosis de 70 a 200 mg/kg.

10 Por lo tanto, el uso de la dihidrociclosporina C está indicado para la supresión de la proliferación de linfocitos y, por lo tanto, es útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, suprimiendo la repulsión de transplantes, por ejemplo transplantes de órganos tales como piel, médula ósea y riñones,
15 como también en la encefalomiелitis consecutiva a infecciones y la esclerosis múltiple.

Además, la dihidrociclosporina C exhibe una actividad antiartrítica, como puede comprobarse por una inhibición de las tumefacciones en el ensayo del
20 período latente de la artritis por adyuvante de Freund en ratas, al aplicarse p.o. aprox. 1 a aprox. 10 mg/kg.

Por lo tanto, el uso de la dihidrociclosporina C está indicado además para el tratamiento

de inflamaciones crónicas y poliartritis.

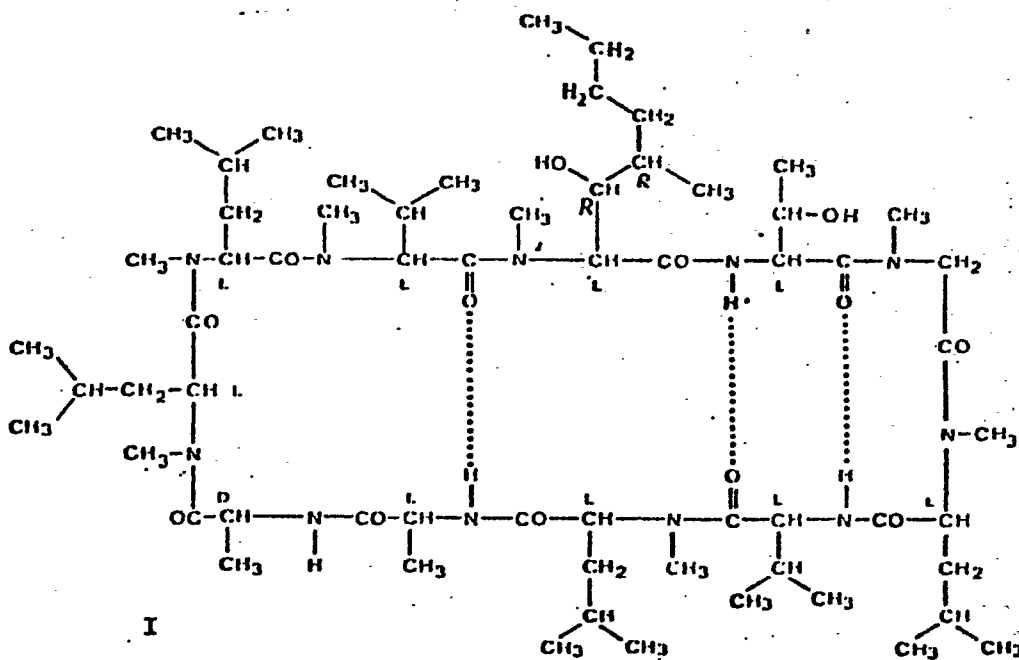
Una dosificación diaria indicada fluctúa entre aprox. 50 y aprox. 1000 mg, aplicada convenientemente en dosis divididas 2 a 4 veces por día en forma de unidad de dosis que contiene desde aprox. 12 mg hasta aprox. 500 mg del compuesto.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene dihidrociclosporina C en asociación con un diluyente o soporte farmacéutico. Tales composiciones pueden formularse en forma de por si conocida y pueden presentarse, por ejemplo en forma de una solución o de una tableta.

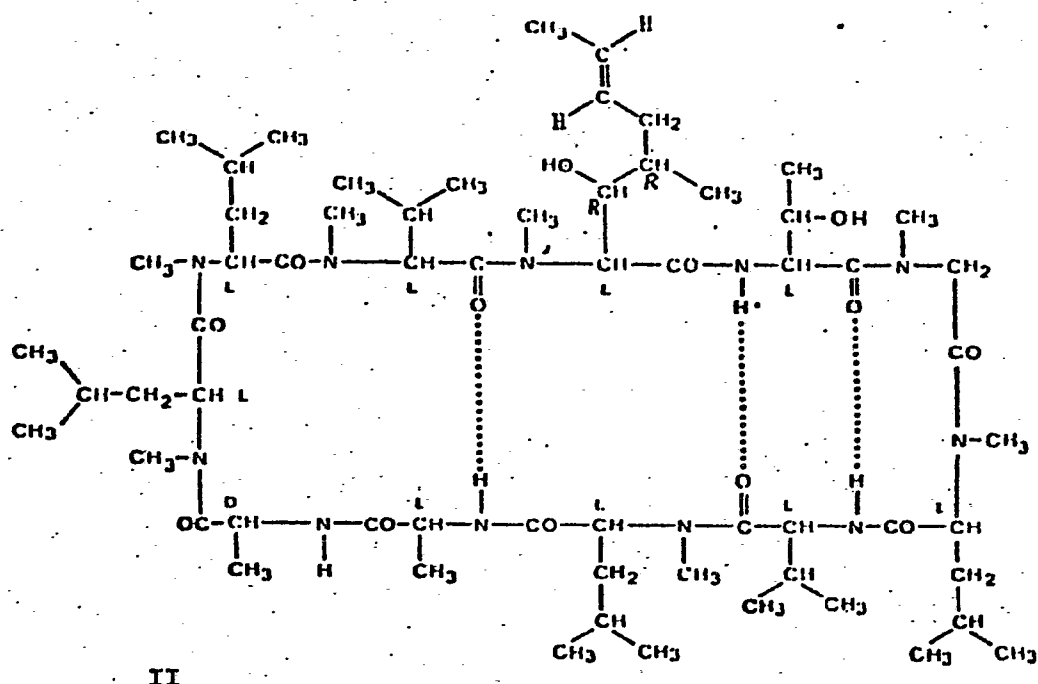
Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

1.- procedimiento para la producción de dihidrociclosporina C, de fórmula



caracterizado porque se hidrogena una ciclosporina C de fórmula



2.- Procedimiento para la producción de dihidro ciclosporina C, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

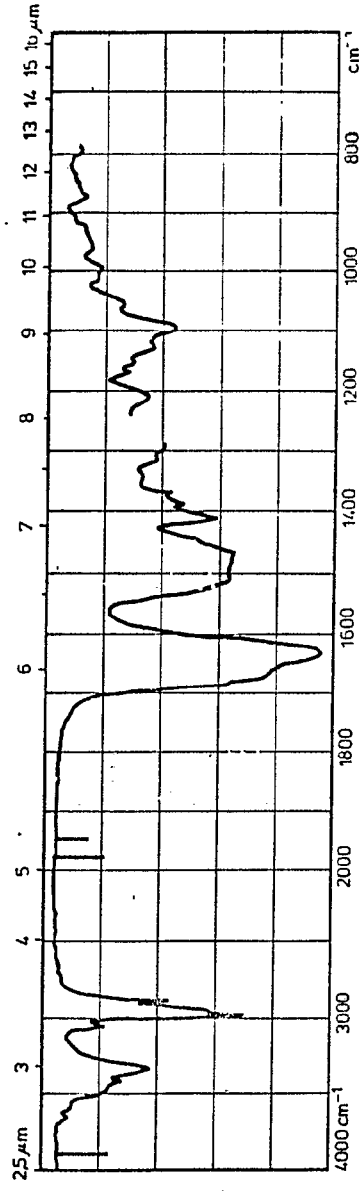
Esta Memoria consta de 14 hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid, 27 NOV. 1977

SANEOZ, A. G.
 J. M. GOMEZ ACEBO Y PARRA
 p. p. Firmador: J. Suarez Diaz

FIG.1



Madrid **22 NOV 1977**
J. M. G. L. J. M. G. L. J. M. G. L.
P. P. Firmador: J. Suarez Diles

FIG. 1

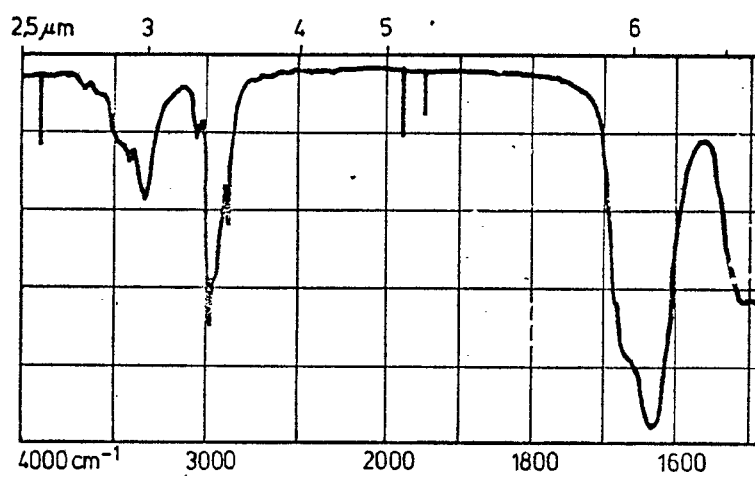
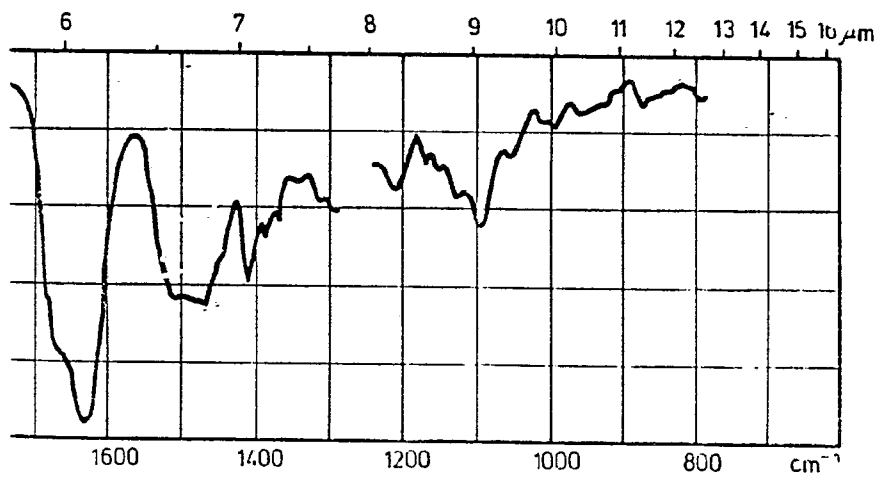
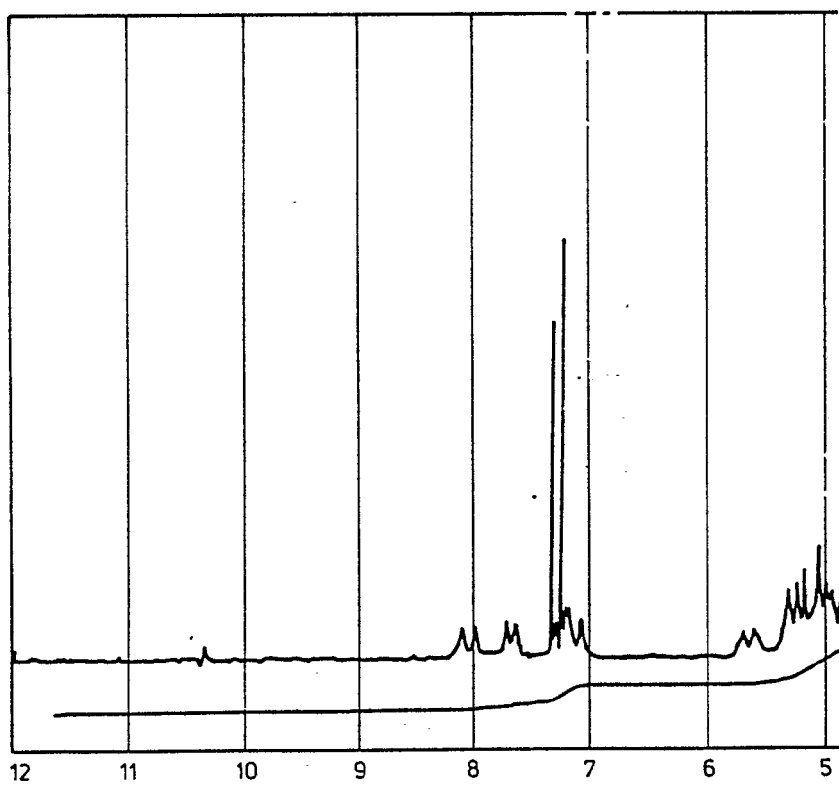


FIG. 1

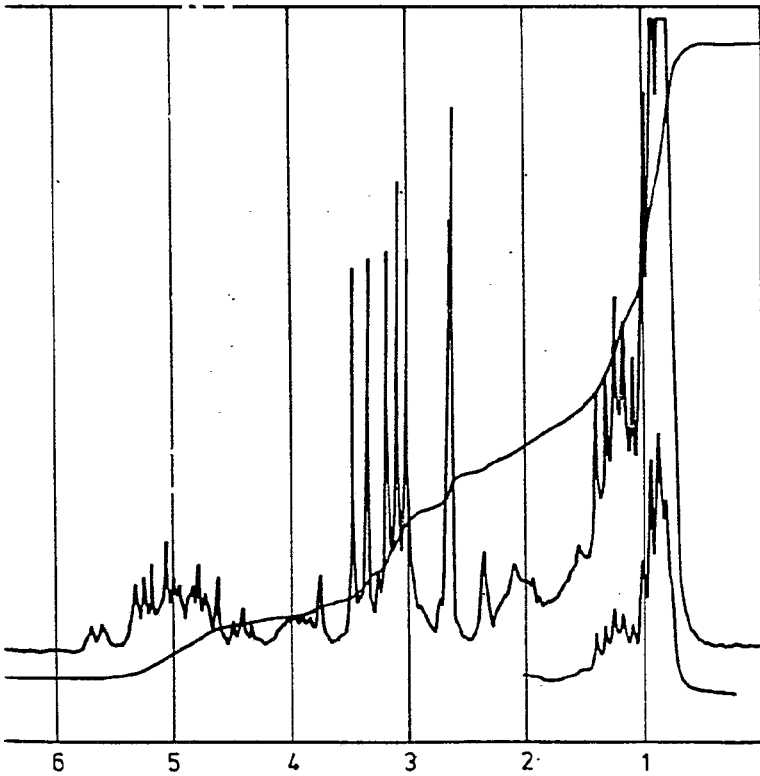


Madrid
22 NOV 1977
J.M. GONZALEZ AGUIAR
p. p. Firmado: J. Suarez Diaz

FIG. 2



2



Madrid ~~27 NOV 1977~~
Dr. Inic. LOINIZ ASEBO Y ROMERO
p. p. Firmado J. Suarez. Ditz