

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

ES

11

21

22

NUMERO	477320
FECHA DE PRESENTACION	31 ENE. 1978

A1

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:	52 FECHA	53 PAIS
51 NUMERO		
5823/77	10 de mayo de 1.977	SUIZA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61K, C07D	469.567

64 TITULO DE LA INVENCION

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE DERIVADOS DE CICLOSPORINA.

71 SOLICITANTE (S)

SANDOZ, AG.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Basilea, Suiza.

72 INVENTOR (ES)

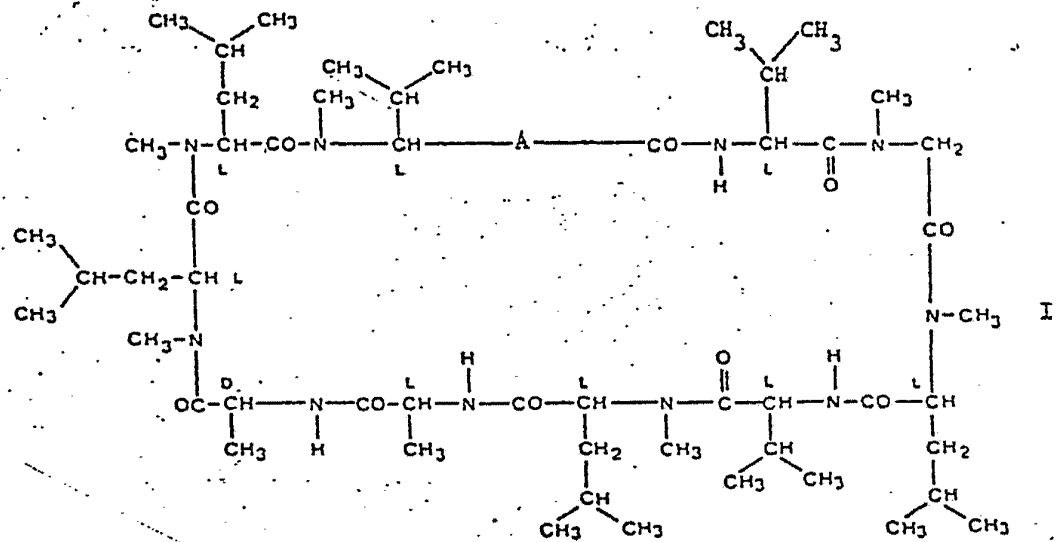
Dr. René P. Traber., Max Kuhn., Hans Hofmann., Dr. Eugen Härrli

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.

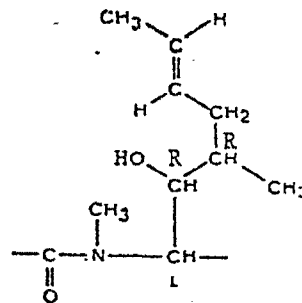
La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar derivados de ciclosporina de fórmula I,



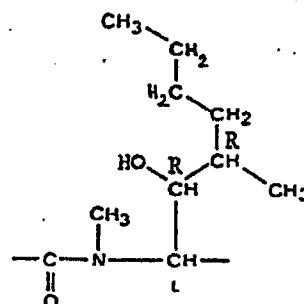
en donde A significa

(en adelante denomi-

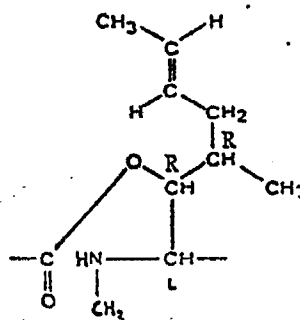
5 nada ciclosporina D),



(en adelante denomi-
nada dihidro-ciclo-
sporina D),



5 (en adelante denomi-
nada iso-ciclosporina
D),



con procedimientos para su producción y preparaciones
farmacéuticas.

10 La presente invención proporciona un pro-
cedimiento para la producción de ciclosporina D,
dihidro-ciclosporina D e iso-ciclosporina D, caracte-
rizado porque

a) se obtiene ciclosporina D mediante el
15 cultivo de una cepa de la especie de hongos
Tolypocladium inflatum Gams, productora de ciclo-
sporina D, en presencia de un medio nutritivo, y

aislamiento de ciclosporina D, o

b) se obtiene dihidro-ciclosporina D mediante hidrogenación de ciclosporina D, o

5 c) se obtiene iso-ciclosporina D sometiendo ciclosporina D a un tratamiento con ácido.

El cultivo de acuerdo con el procedimiento

a) puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos de por sí conocidos para el cultivo de cepas análogas, por ejemplo tal como se describe en el ejemplo 1.

10 Una cepa productora de ciclosporina D preferida es la cepa NRRL 8044 de la especie de hongos *Tolypocladium inflatum* Gams, libremente accesible. Se ha depositado un cultivo de dicha cepa en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Northern Research and Development Division), Peoria, Ill., EE.UU.

15 A. Anteriormente dicha cepa fué clasificada bajo la especie de hongos *Trichoderma polysporum* (Link ex. Pers.) y ha sido descrita, por ejemplo, en la memoria de la patente alemana para publicación 2 455 859.

20 Para la producción de ciclosporina D también pueden usarse otras cepas de la especie de hongos *Tolypocladium inflatum* Gams obtenidas, por ejemplo, mediante selección o mutación de la cepa de hongos

NRRL 8044 por la acción de rayos ultravioleta o rayos X, o por otros medios, por ejemplo mediante tratamiento de cultivos de laboratorio con agentes químicos adecuados.

5 La ciclosporina D puede ser aislada en forma de por sí conocida, por ejemplo tal como se describe en el ejemplo 1. De este modo puede separarse la ciclosporina D de los productos naturales que puedan hallarse presentes al mismo tiempo en grandes cantidades, como por ejemplo la ciclosporina A un poco más polar (también conocida como S 7481/F-1), la ciclosporina B más polar (también conocida como S 7481/F-2) y la ciclosporina aún más polar.

15 El procedimiento b) de la invención puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos de por sí conocidos, por ejemplo mediante hidrogenación catalítica.

Como disolventes se emplean preferentemente los alcoholes alifáticos inferiores, por ejemplo metanol, etanol, isopropanol, o el acetato de etilo.

20 La hidrogenación se efectúa convenientemente en la región neutra, a temperaturas entre 20 y 30°C y a presión atmosférica o a presión ligeramente elevada. Como catalizador se emplea preferentemente el paladio, por

ejemplo paladio sobre carbón.

El tratamiento con ácido de acuerdo con el procedimiento c) puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos de por sí conocidos, por ejemplo con ácido trifluoacético, de preferencia ácido metanosulfónico o ácido p-toluensulfónico.

La cantidad del ácido fuerte, empleada para la isomerización, preferentemente es entre 1 y 4 moléculas-gramo por cada molécula-gramo de ciclosporina D.

Como disolventes pueden emplearse los alcoholes inferiores, por ejemplo metanol, los hidrocarburos halogenados, por ejemplo cloroformo o los éteres, por ej. dioxano.

La temperatura de reacción puede variar de 20 a 65°C, preferentemente de 45 a 55°C.

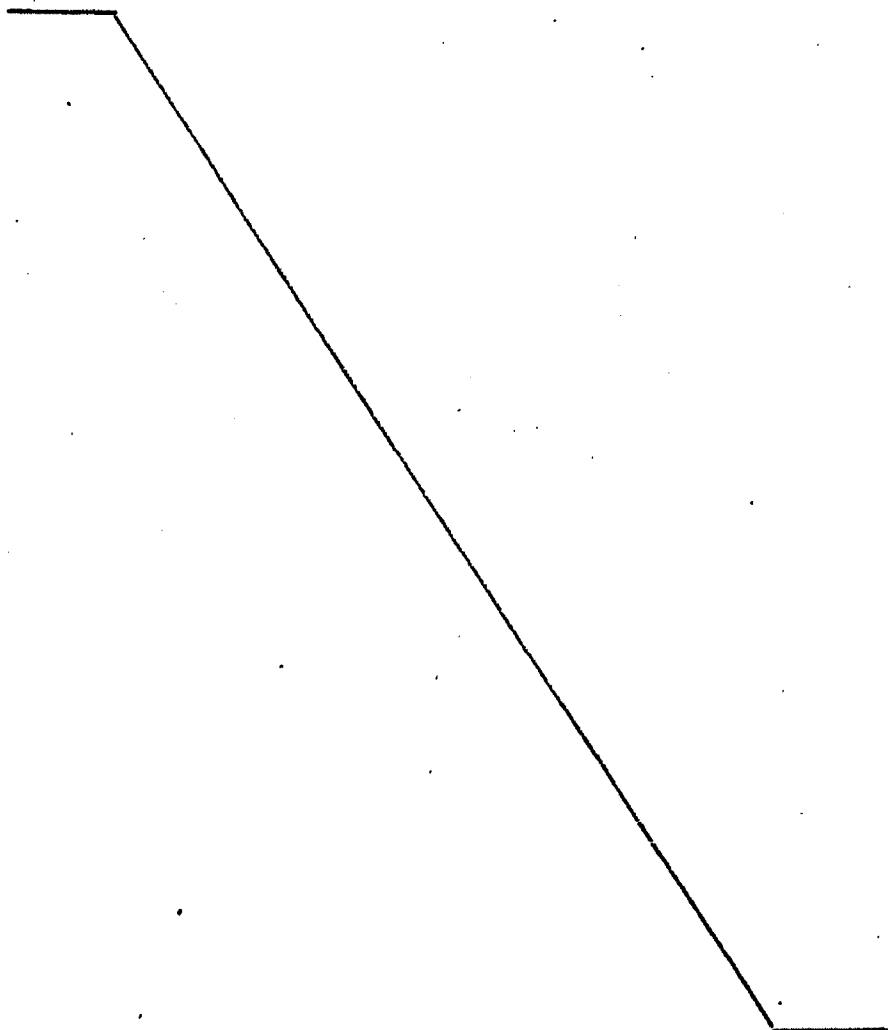
La ciclosporina D, la dihidro-ciclosporina D y la iso-ciclosporina D se caracterizan por propiedades quimioterapéuticas y farmacológicas interesantes y, por lo tanto, pueden ser empleadas como medicamentos.

El uso de la ciclosporina D, la dihidro-ciclosporina D y la iso-ciclosporina D está indicado

como antiartríticos.

La ciclosporina D, la dihidro-ciclo-
sporina D y la iso-ciclosporina D pueden ser adminis-
tradas como medicamentos, ya sea solas o en forma de
5 preparación medicinal adecuada en asociación con
adyuvantes farmacológicamente inertes.

En los siguientes ejemplos no limitativos
todas las temperaturas están indicadas en grados Cel-
sius.



EJEMPLO 1: Ciclosporina D

500 litros de una solución nutritiva,
conteniendo en cada litro:

- 40 g de glucosa,
5 2,0 g de caseinato de sodio,
2,5 g de fosfato de amonio,
5 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
2 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$,
3 g de NO_3Na ,
10 0,5 g de CLK,
0,01 g de SO_4Fe

y agua desmineralizada hasta completar el litro,
se inoculan con 50 litros de un cultivo previo de la
cepa NRRL 8044 y se incuban en un fermentador de acero
con agitación (170 revoluciones por minuto) y aeración
15 (1 litro de aire por minuto por litro de solución nu-
tritiva) a 27° durante 13 días (véase la memoria de la
patente alemana para publicación 2 455 859).

El caldo de cultivo se extrae mediante
20 agitación con una cantidad igual de acetato de n-
butilo, después de la separación de la fase orgánica
se concentra ésta en un vacío, y el extracto bruto se
desengrasa mediante la repartición entre metanol/agua

(9 : 1) en 3 etapas y éter de petróleo. La fase metanólica se separa, se concentra en un vacío, y el producto bruto se precipita mediante la adición de agua. El material obtenido después de la filtración se cromatografía sobre gel de sílice con hexano/acetona (2 : 1) como eluyente, con lo cual las fracciones eluidas en primer término contienen mayormente ciclosporina A y ciclosporina D, las porciones eluidas posteriormente contienen mayormente ciclosporina C. Con los fines de purificación adicional, las fracciones conteniendo ciclosporina A y ciclosporina D se cristalizan a -15° a partir de una cantidad 2 a 2,5 veces mayor de acetona y el producto cristalizado se separa luego adicionalmente cromatografiando dos veces sobre gel de sílice, con lo cual las fracciones eluidas en primer término con acetato de etilo saturado con agua, contienen ciclosporina D en forma fuertemente enriquecida. Dichas fracciones se disuelven en una cantidad dos veces mayor de acetona y se dejan cristalizar a -15° . El producto cristalizado bruto de ciclosporina D resultante se purifica adicionalmente disolviéndolo en una cantidad 10 veces mayor de acetona, añadiendo 2 % por peso de carbón activo y calentando hasta 60° durante 5 minu-

tos. El filtrado claro y casi incoloro, obtenido después de filtrar sobre talco, se concentra hasta un tercio de su volumen y se deja enfriar hasta temperatura ambiente, con lo cual cristaliza espontáneamente la ciclosporina D. Dejando reposar a -17° se completa la cristalización. Los cristales obtenidos mediante filtración se lavan con un poco de acetona fría como el hielo y a continuación se secan en un alto vacío a 80°C durante 2 horas.

10 Caracterización de ciclosporina D:

Cristales prismáticos, incoloros; P.F. $148 - 151^{\circ}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -245^{\circ}$ (c = 0,52 en cloroformo)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -211^{\circ}$ (c = 0,51 en metanol).

EJEMPLO 2: Dihidro-ciclosporina D

15 400 mg de paladio/carbón (10 % de paladio) se prehidrogenan en 15 cc de etanol durante 20 minutos. A esta suspensión del catalizador de paladio se le añade una solución de 3,66 g de ciclosporina D en 30 cc de etanol y a continuación se hidrogena a 24° y a una presión de 736 mm de mercurio hasta que queda finalizada la absorción de hidrógeno. A continuación se sa-

20

para el catalizador mediante filtración y el filtrado se evapora hasta sequedad en un vacío a 20 a 40°. Con esto se obtiene la dihidro-ciclosporina D, homogénea según la cromatografía de capa delgada, en forma de polvo amorfo, incoloro, el que se seca en un alto vacío a 70° durante 4 horas.

Características de dihidro-ciclosporina D:

P.F. 153 - 156°

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

10 $[\alpha]_D^{20} = -196^\circ$ (c = 0,58 en CH_3OH).

EJEMPLO 3: Isociclosporina D

A una solución de 18,25 g de ciclosporina D en 120 cc de dioxano absoluto se le añade una solución de 3,60 g de ácido metanosulfónico en 60 cc de dioxano, y la mezcla se mantiene a 50° en ausencia de humedad. El transcurso de la reacción se observa en el cromatograma de capa delgada (hojas de Polygram SIL G, cloroformo/metanol/ácido acético glacial (90 : 6 : 4), haciéndose visible con vapor de yodo). Después de 17 horas, se enfría hasta temperatura ambiente. Mediante la adición de 3,38 g de acetato de sodio anhidro se

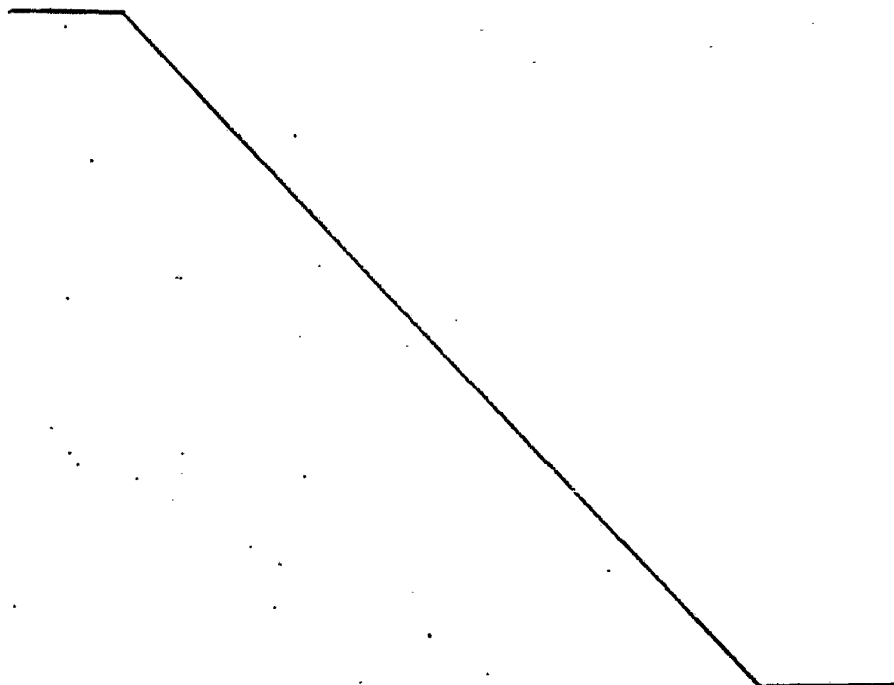
neutraliza el ácido, después de agitar durante 15 minutos se filtra la sal precipitada mediante succión y el filtrado se concentra en un vacío a 45°. Los 21 g de residuo se cromatografían sobre 1,5 kg de gel de sílice, usándose para la elución cloroformo/metanol (98 : 2). Las fracciones, consistiendo prácticamente de iso-ciclosporina D pura, se combinan, se concentran mediante evaporación en un vacío a 50° y el residuo se cristaliza dos o tres veces a partir de éter, con lo cual se obtiene la iso-ciclosporina D.

Características de iso-ciclosporina D:

Prismas incoloros; P.F. 142 - 144°

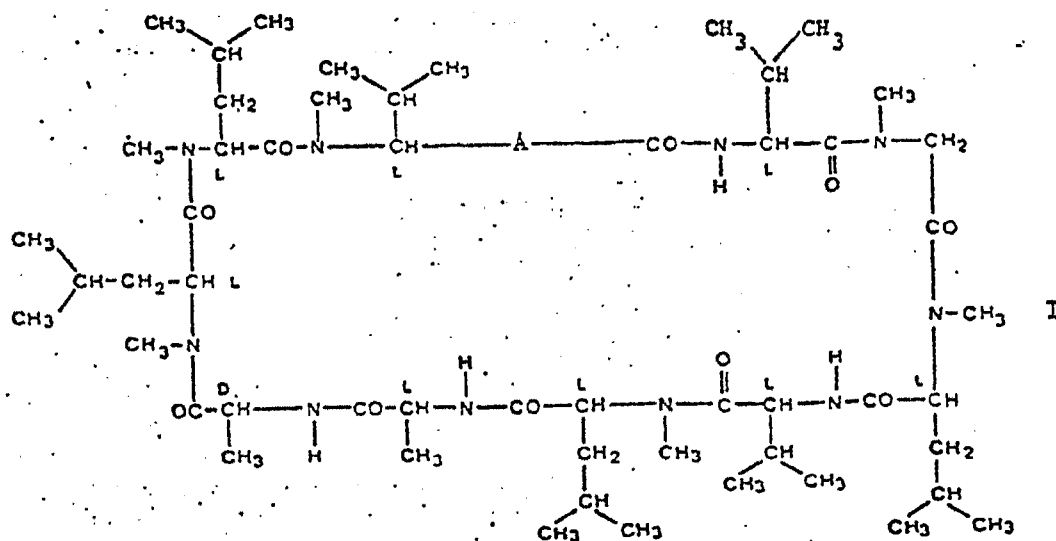
$[\alpha]_D^{20} = -205,5^\circ$ (c = 0,51 en CHCl_3)

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



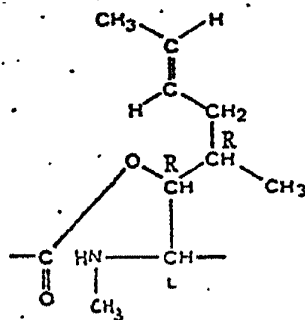
REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la producción de derivados de ciclosporina, de fórmula I,

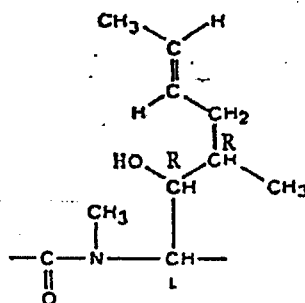


5

en donde A significa iso-ciclosporina D



caracterizado porque se somete un compuesto de fórmula I en donde A significa ciclosporina D:



a tratamiento con ácido, con preferencia en un disolvente,
a temperaturas entre 20 y 65°C.

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

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

Madrid, 31 ENE. 1979

~~SANDOZ, AG.~~

J. M. GOMEZ AGUIRRE Y COMPA
o. p. Firmado: J. Suarez Diaz