

112. Cyclosporin A, ein immunsuppressiv wirksamer Peptidmetabolit aus *Trichoderma polysporum* (LINK ex PERS.) Rifai

VON Artur Rügger, Max Kuhn, Heinz Lichti, Hans-Rudolf Loosli, René Huguenin, Charles Quiquerez und Albert von Wartburg

Sandoz AG, Pharma Departement, Chemische Forschung, 4002 Basel, Schweiz

(2. III. 76)

Cyclosporin A, a Peptide Metabolite from *Trichoderma polysporum* (LINK ex PERS.) Rifai, with a remarkable immunosuppressive activity. – Summary. Two antifungal metabolites, cyclosporins A and C, were isolated from a strain of *Trichoderma polysporum* (LINK ex PERS.) Rifai. Cyclosporin A, the main component, has the molecular formula $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ as deduced by NMR. and mass spectra. Hydrolytic cleavage of cyclosporin A furnished 11 amino acids as fragments, among them an artefact of a new C_9 -amino acid. The amino acid sequence was determined by Edman degradation of iso-cyclosporin A, a basic rearrangement product formed from cyclosporin A by *N,O*-acyl migration. In an independent investigation an X-ray analysis of the iodo derivative **10** was performed (see the following paper). On the basis of the chemical, spectroscopic and crystallographic evidence the complete structure of cyclosporin A was elucidated as the neutral cyclic oligopeptide **1**. Cyclosporin A and C show remarkable immunosuppressive and antiphlogistic activities in several pharmacological models.

Aus Kulturen eines neuen Stammes der Gattung *Trichoderma* (*fungi imperfecti*) wurde ein Gemisch von Metaboliten isoliert, die durch antifungische Aktivitäten auffielen. Der neue Pilzstamm, der aus einer bei Hardanger, Norwegen, gesammelten Bodenprobe erhalten wurde, liess sich aufgrund seiner wesentlichen morphologischen Merkmale und des Wachstums auf verschiedenen Nährböden als *Trichoderma polysporum* (LINK ex PERS.) Rifai bestimmen¹⁾2). Zur Isolierung der aktiven Stoffwechselprodukte wurden Kulturbrühen des Pilzes mit *n*-Butylacetat ausgerührt und der Extrakt durch Verteilen zwischen 90proz. Methanol und Petroläther entfettet. Chromatographie des rohen Gemisches an Kieselgel führte zu einem angereicherten Wirkstoffkomplex. Weitere Chromatographien an Sephadex LH-20 und an neutralem Aluminiumoxid lieferten schliesslich zwei einheitliche Komponenten, die als Cyclosporin A und C bezeichnet wurden³⁾. Die zwei Metaboliten scheinen strukturell nahe verwandt zu sein; sie lassen sich mittels Dünnschichtchromatographie auf «Polygram Sil G» gut voneinander unterscheiden. Zur Reinheitsprüfung ist auch die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie («Reversed-phase»-Methodik) geeignet.

1) Eine Kultur des neuen Stammes wurde beim United States Department of Agriculture (Northern Research and Development Division), Peoria, Ill., USA, unter der Nummer NRRL 8044 deponiert.

2) Isolierung, Züchtung und Taxonomie des neuen Stammes sowie mikrobiologische Tests der Cyclosporine werden an anderer Stelle publiziert [1].

3) Cyclosporin B wurde erstmals neben Cyclosporin A aus *Cylindrocarpum lucidum* BOOTH isoliert. Über diese Untersuchungen sowie über die Strukturermittlung von Cyclosporin C werden wir später berichten.

Die beiden Metaboliten zeigen eine spezifische antifungische Wirkung gegen gewisse Hefen und Pilze²). Überraschenderweise bewirken Cyclosporin A und C in verschiedenen pharmakologischen Versuchsanordnungen auch eine starke Hemmung sowohl der humoralen als auch der zellulären Immunität [2]. Ferner wirken beide Stoffe am Modell der *Freund-Adjuvans*-Arthritis entzündungshemmend [2].

Im folgenden berichten wir über die Strukturermittlung des Hauptmetaboliten, Cyclosporin A.

1. Orientierende Untersuchungen. – Cyclosporin A kristallisiert aus Aceton in Form weisser Nadeln vom Smp. 148–151°; $[\alpha]_D^{20} = -244^\circ$ (Chloroform) und $[\alpha]_D^{20} = -189^\circ$ (Methanol). Der Metabolit ist in den meisten organischen Lösungsmitteln gut, in Wasser und Petroläther dagegen nur schwach löslich. Titration und Verhalten bei der Papier-Elektrophorese zeigen, dass Cyclosporin A weder basische noch saure Gruppen aufweist. Reagentien zum Nachweis von Peptiden und Alkaloiden wie Cl_2 /Benzidin bzw. 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidin, *Dragendorff*-Reagens usw. erzeugen mit Cyclosporin A keine oder nur schwache Färbungen. Die Elementaranalysen liefern folgende Durchschnittswerte: C 61,8, H 9,5, N 12,6 und O 15,8%. Das UV-Spektrum zeigt lediglich Endabsorption gegen 200 nm; das IR.-Spektrum ist im Bereich von 1700–1800 cm^{-1} leer, bei 1630–1670 cm^{-1} tritt eine intensive breite Amid-Carbonylbande auf (Fig. 1).

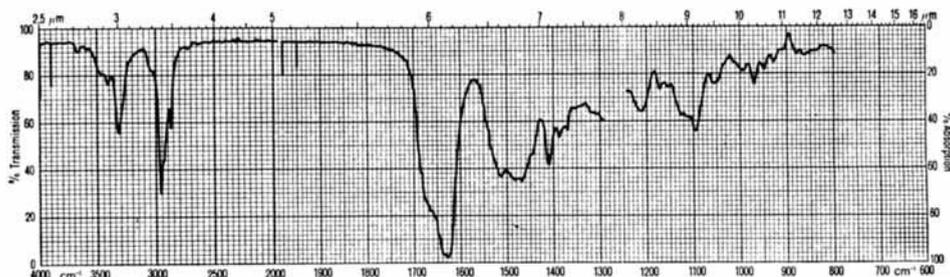


Fig. 1. IR.-Spektrum von Cyclosporin A in CH_2Cl_2

Die NMR.-Spektren, deren Interpretation später diskutiert wird, lassen auf das Vorliegen eines Peptids mit vermutlich 11 z.T. *N*-methylierten Aminosäuren sowie einer OH-Gruppe und einer (C=C)-Doppelbindung schliessen. Die OH-Gruppe ist reaktionsträge und lässt sich nur schwer acylieren. Die Doppelbindung ist leicht hydrierbar, wobei Cyclosporin A (**1**) unter Aufnahme von 1 mol H_2 in Dihydrocyclosporin A (**2**) übergeht.

Erste Informationen über die Aminosäure-Komponenten des Cyclosporins A brachten orientierende Hydrolyseversuche. Das durch Einwirkung von 6*N* HCl bei 115° erhaltene Gemisch der Spaltprodukte wurde nach *Moore & Stein* [3] analysiert, wobei folgende essentielle Aminosäuren identifiziert wurden (Tab. 1).

Unter den angewandten Analysebedingungen wurden *N*-methylierte Aminosäuren mit Ausnahme des Sarkosins nicht erfasst, da sie mit Ninhydrin zu schwache Farbreaktionen gaben. Aus diesen Voruntersuchungen geht hervor, dass Cyclosporin A

Tabelle 1. *Analyse der Hydrolyseprodukte nach Moore & Stein*

Aminosäure	μ mole/mg	Verhältnis
Sarkosin	0,95	1,07
Alanin	1,83	2,07
α -Aminobuttersäure	0,72	0,81
Valin	0,93	1,05

ein aus 11 Aminosäuren aufgebautes, vermutlich cyclisches Oligopeptid darstellen könnte.

2. Massenspektren und Bruttoformel von Cyclosporin A. – Das Massenspektrum des Cyclosporins A zeigt im ersten Moment der Aufnahme deutliche Pike bis m/e 1201. Der höchste Massenpik verliert jedoch rasch an Intensität und ist in wenigen Minuten verschwunden, gleichzeitig gewinnt der Fragment-Pik bei m/e 1183 an Intensität, und das Spektrum bleibt stabil. Die Molmasse des Cyclosporins A beträgt demnach 1201; das Auftreten der Ionen bei m/e 1183 ist durch die Eliminierung von H_2O zu erklären. Die exakten Massen konnten mit Hilfe des «Peak-Matching»-Verfahrens zu $1183,831 \pm 0,003$ und zu $1201,842 \pm 0,003$ bestimmt werden. Aus letzterer lässt sich für Cyclosporin A die Bruttoformel $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ (physikalische Molmasse 1201,841) ableiten. Diese Summenformel steht mit den Analysendaten und den NMR.-Befunden in Übereinstimmung. Eine unabhängige Bestimmung der Molmasse erfolgte durch die Felddesorptions-Massenspektren von Cyclosporin A und seinem Dihydroderivat⁴). Die Masse der Molekular-Ionen wurde zu 1201,8 bzw. 1203,6 ermittelt, wobei der Fehler nicht mehr als *ca.* 0,4 Masseneinheiten betragen dürfte.

3. Diskussion der NMR.-Spektren. – Aus dem komplexen 1H -NMR.-Spektrum bei 90 MHz (Fig. 2) lassen sich folgende Informationen gewinnen: Das Integral zeigt das Vorliegen von 118 ± 10 Wasserstoffatomen an. Zwischen 7 und 8 ppm treten vier Signale von schwer austauschbaren Amidprotonen auf, mit Kopplungen $J(NH-CH)$ von 7–10 Hz. Im Gebiet von 4–6 ppm sind 13 Signale zu erkennen, von denen zwei als Vinylwasserstoffatome interpretiert werden⁵). Die restlichen 11 Signale werden $H(\alpha)$ -Atomen von Aminosäuren zugeordnet. Bei 3,7 ppm erscheint ein Hydroxylsignal sowie das Triplett einer Methingruppe, das möglicherweise von der Sequenz $-CH-CHOH-CH-$ stammt. Zwischen 2,5 und 3,5 ppm erkennt man sieben Methylsignale, die vermutlich von *N*-methylierten Aminosäurekomponenten herrühren. Ein breites Methylsignal bei 1,6 ppm ($\nu_{1/2}$ *ca.* 8 Hz) entspricht wahrscheinlich der Teilstruktur $CH_3-CH=CH-$. Schliesslich erkennt man im Gebiet von 0,5–1,5 ppm Signale von ungefähr 16 aliphatisch gebundenen Methylgruppen.

Das ^{13}C -NMR.-Spektrum zeigt 58 Signale. Aufgrund der relativen Intensitäten kann angenommen werden, dass Cyclosporin A, entsprechend der im MS. gefundenen Bruttoformel, 62 Kohlenstoffatome enthält. Deutlich zu erkennen sind die beiden sp^2 -Kohlenstoffatom-Signale der Vinylgruppe bei 125,6 ppm und 129,2 ppm. 11 Car-

4) Wir danken der Firma *Varian* MAT GmbH., Bremen, für die Aufnahme der Felddesorptions-Massenspektren.

5) Im 1H -NMR.-Spektrum von Dihydrocyclosporin A sind diese Signale nicht vorhanden.

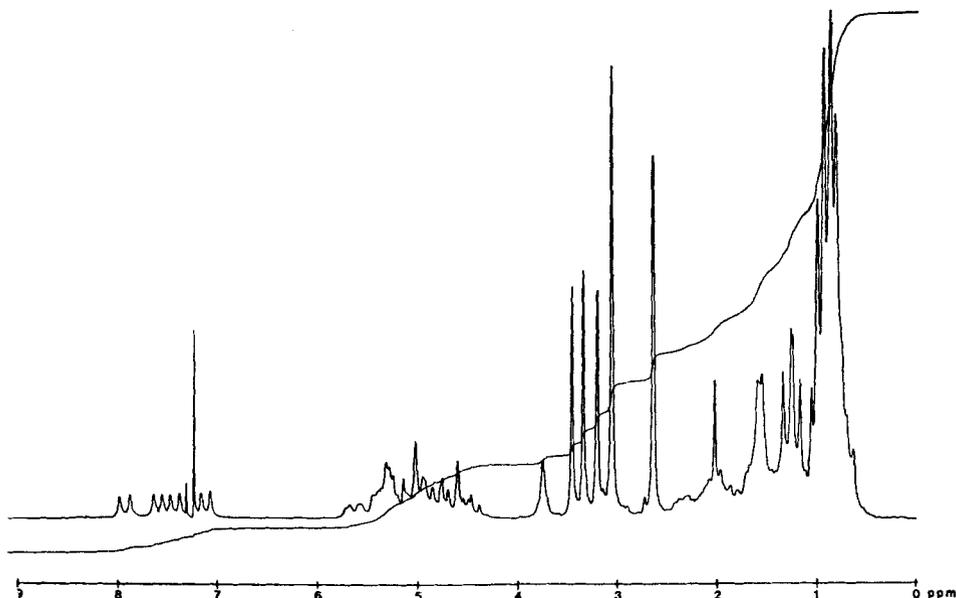


Fig. 2. ^1H -NMR.-Spektrum von Cyclosporin A bei 90 MHz in CDCl_3 , TMS = 0 ppm

bonylkohlenstoffatom-Signale zwischen 169 ppm und 173 ppm bilden ein weiteres Indiz für das Vorliegen von 11 Aminosäure-Einheiten.

4. Qualitative und quantitative Baustein-Analyse. – Die Peptidstruktur des Cyclosporins A wurde durch eine erschöpfende Analyse der am Aufbau beteiligten Aminosäuren bewiesen.

4.1 *Bestimmung der Aminosäuren als Trifluoracetyl-methylester.* Die nach vollständiger Hydrolyse von Cyclosporin A (**1**) und seinem Dihydroderivat **2** gewonnenen Spaltprodukte wurden nach Darbre & Islam [4] mit Methanol verestert und mit Trifluoressigsäure-anhydrid acyliert. Das Gemisch der flüchtigen Produkte wurde gas-chromatographisch getrennt und die Aminosäure-Derivate durch Retentionsindex [5] und Massenspektrum identifiziert. Die präparative Trennung erfolgte analog, wobei jede Fraktion isoliert und mittels NMR.-Spektrum charakterisiert wurde (Tab. 2).

Wie Tab. 2 illustriert, wurden neben den bereits nachgewiesenen Sarkosin, Alanin (2 Molekeln), α -Aminobuttersäure und Valin zusätzlich noch *N*-Methylvalin und 4 Molekeln *N*-Methylleucin gefunden. Damit sind 10 bekannte Aminosäuren als Bauelemente des Cyclosporins A identifiziert. Der noch fehlende Aminosäure-Baustein **5** konnte unter den angewandten Hydrolysebedingungen nicht gefasst werden, hingegen gelang es, aus Dihydrocyclosporin A (**2**) in geringer Ausbeute ein trifluoracetyliertes Dihydroderivat **4** als Abbauprodukt zu isolieren. Die neue Aminosäure, die eine *N*-Methylgruppe enthält, wurde aufgrund des C-Gerüsts als C_9 -Aminosäure bezeichnet (Konstitution siehe unter 4.3.).

4.2. *Präparative Isolierung der freien Aminosäuren.* Zur Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren und zur Isolierung der unbekanntenen C_9 -Aminosäure wurde das

Tabelle 2. Trennung der Trifluoracetyl-aminosäure-methylester(TFA/OMe)-Derivate

Retentions- index auf OV 17	Mol. Gew. (MS.) als (TFA/OMe)- Derivat	Identifizierung (MS./NMR.)	Molare Verhältnisse bei		Ber.
			1	2	
10,5	199	Ala	1,92	1,96	2
11,2	213	Abu	0,92	0,89	1
11,4	227	Val	0,98	0,96	1
11,8	199	Sar	0,98	0,99	1
12,5	241	MeVal	0,71	0,71 ^{a)}	1
13,4	255	MeLeu	4,20	4,20	4
15,2	409	4 ^{b)}	–	(0,3)	1

a) Unvollständige Hydrolyse und Veresterung.

b) Unbekannte Dihydro-C₉-aminosäure.

nach Hydrolyse von Cyclosporin A mit 6N HCl entstandene Gemisch der Hydrochloride zunächst mittels «Dowex AG 3-X4» in die freien Aminosäuren übergeführt und anschliessend durch Chromatographie an Cellulose in folgende Komponenten aufgetrennt: ein Artefakt der C₉-Aminosäure, nämlich **6**, *N*-Methyl-L-leucin, *N*-Methyl-L-valin, L-Valin, L- α -Aminobuttersäure, D,L-Alanin und Sarkosin. Alanin wurde als Racemat erhalten, offenbar liegen von den zwei nachgewiesenen Einheiten je ein D- und L-Isomeres vor; die übrigen optisch aktiven Aminosäuren gehören zur L-Reihe.

Die gesuchte, neue C₉-Aminosäure **5** wurde nicht in der ursprünglich im Cyclosporin A vorliegenden Form, sondern als Cyclisierungsprodukt **6** erhalten (s. 4.3.).

4.3. *Konstitution der C₉-Aminosäure 5*. Wie aus allen verfügbaren Informationen hervorgeht, enthält die neue C₉-Aminosäure die im Cyclosporin A nachgewiesene (C=C)-Doppelbindung und die OH-Funktion als spezifische Strukturelemente. Zu ihrer Konstitutionsermittlung wurde der aus Dihydrocyclosporin A erhaltene, trifluoracetylierte Dihydro-aminosäure-methylester **4** herangezogen. Dieses Derivat weist im NMR.-Spektrum 21 Protonen auf, darunter vier Methylsignale, die einer *O*-Methyl-, einer *N*-Methyl- und zwei Methylgruppen an C-Atomen zugeordnet werden. Im Massenspektrum erscheint der Molekularpik bei *m/e* 409, entsprechend der Bruttoformel C₁₅H₂₁F₆NO₅. Unter den zahlreichen Fragmenten sind besonders die Massenspikete bei *m/e* 198 und *m/e* 211 aufschlussreich, da sie ungefähr je einer Hälfte der Molekel entsprechen (Tab. 3).

Aufgrund dieser Resultate besitzt das *N,O*-Bis(trifluoracetyl)-Derivat des Dihydro-C₉-aminosäure-methylesters die Formel **4**; der freien Dihydro-C₉-aminosäure kommt folglich Formel **3** zu.

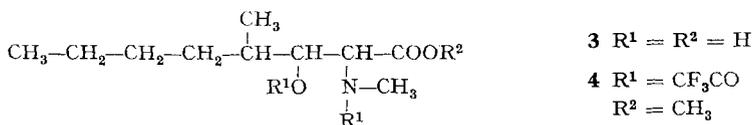
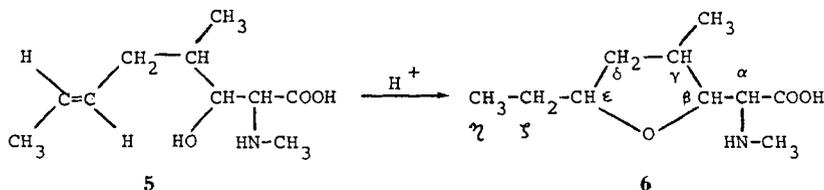


Tabelle 3. Massenspektrum des Bis(trifluoracetyl)-dihydro-C₉-aminosäure-methylesters 4^{a)}

<i>m/e</i>	Masse des abgespaltenen Radikals	Struktur
394	15	CH ₃
378	31	CH ₃ O
350	59	COOCH ₃
340	69	CF ₃
324	85	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -CH-CH ₃
312	97	CF ₃ CO
296	113	CF ₃ COO
283	129	CF ₃ CO-N-CH ₃
211	198	CF ₃ CO-N(CH ₃)-CH-COOCH ₃
198	211	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -CH(CH ₃)-CH-O-COCF ₃

^{a)} Molekularpik bei *m/e* 409 (C₁₅H₂₁F₆NO₅).

Die Lokalisierung der Doppelbindung in der genuine C₉-Aminosäure erfolgte aufgrund der in den NMR.-Spektren des Cyclosporin A erkennbaren Partialstruktur CH₃-CH=CH-. Danach besitzt die neue C₉-Aminosäure die Konstitution **5**. Auf die vorweggenommene (*E*)-Konfiguration der Doppelbindung werden wir noch zurückkommen.

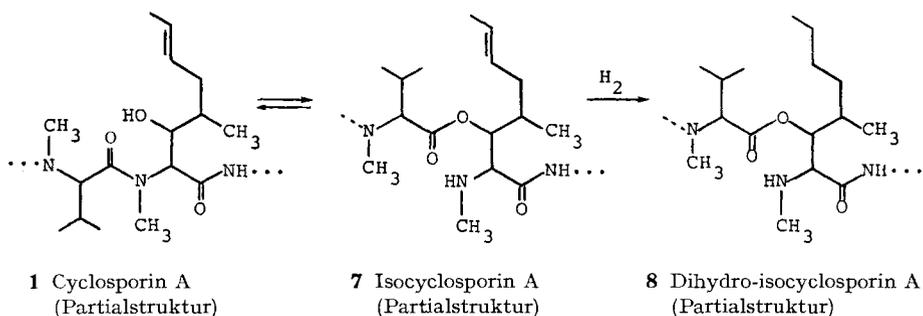


Die Formulierung von **5** als ungesättigte β -Hydroxysäure erklärt auch die Bildung des Cyclisierungsproduktes **6**: Unter den stark sauren Hydrolysebedingungen kann ein intramolekularer Angriff der Hydroxylgruppe auf die protonierte Doppelbindung erfolgen, wobei Cyclisierung zu einem Tetrahydrofuranring eintritt. Molekularpik (*m/e* 201) und Elementaranalysen entsprechen der Bruttoformel C₁₀H₁₉NO₃, d.h. der Artefakt **6** ist zur genuine C₉-Aminosäure isomer. Das NMR.-Spektrum zeigt 19 Wasserstoffatome; Signale für Vinylprotonen und freie OH-Gruppe sind nicht vorhanden. Aus dem Spektrum ist ferner ersichtlich, dass **6** ein Gemisch der an C(ϵ) isomeren Tetrahydrofuranerivate darstellt, d.h. die Cyclisierung erfolgt nicht stereospezifisch.

Mit der Charakterisierung der neuen C₉-Aminosäure und der Identifizierung der übrigen am Aufbau des Cyclosporin A beteiligten Bausteine ist eine unabhängige Überprüfung der Bruttoformel von **1** möglich geworden: Das Zusammenfügen der 11 Aminosäure-Einheiten zu einem neutralen cyclischen Peptid liefert ebenfalls die Summenformel C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₂.

5. Isocyclosporin A (7). – Da Cyclosporin A keine freie Aminogruppe aufweist, die eine klassische Sequenzanalyse ermöglicht, wurde zunächst versucht, eine eventuell labile Peptidbindung selektiv zu öffnen. Spaltungsreaktionen mit wasserfreier Trifluoressigsäure, die z.B. beim cyclischen Tetrapeptid Chlamydocin erfolgreich verliefen [6], führten beim Cyclosporin A (**1**) auch unter sehr milden Bedingungen zu keinem einheitlichen, linearen Folgeprodukt; es entstanden vielmehr zahlreiche Ninhydrin-positive Peptidfragmente unterschiedlicher Zusammensetzung. Eine Auftrennung an Sephadex LH-20 gelang nur unvollkommen und erlaubte keine Rückschlüsse auf die Sequenz der Aminosäuren.

Versuche zur selektiven Öffnung von **1** durch Methanolyse nahmen einen unerwarteten Verlauf. So führte die Einwirkung von Methansulfonsäure auf Cyclosporin A in Methanol bei 50° zu einem kristallinen Umlagerungsprodukt, dem Isocyclosporin A (**7**)⁶. Aus Elementaranalysen und Massenspektrum (*m/e* 1201) ergab sich dafür die Bruttoformel C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₂; **7** ist also zu Cyclosporin A isomer. Isocyclosporin A zeigt im UV. ebenfalls nur Endabsorption; im IR.-Spektrum ist neben der Amidbande deutlich eine Esterbande bei 1736 cm⁻¹ sichtbar, die im Cyclosporin A nicht auftritt. Isocyclosporin A (**7**) erweist sich bei der Elektrophorese als Base, die in Methylcellosolve/Wasser 8:2 mit 0,1N HCl titrierbar ist (*pK_{MCS}* = 4,90). Das Vorliegen einer freien (sekundären) Aminogruppe lässt sich auch aus Acylierungsversuchen ermitteln: Isocyclosporin A bildet ein *N*-Acetat und ein *N*-Benzoat. Die im Cyclosporin A vorliegende (C=C)-Doppelbindung ist im Isocyclosporin A (**7**) intakt geblieben, wie aus dem NMR.-Spektrum und der Hydrierung zu Dihydro-isocyclosporin A (**8**) hervorgeht. Die Isomerisierungsreaktion ist reversibel, in siedendem Dioxan ging Isocyclosporin A (**7**) wieder in das genuine Peptid **1** über. Diese Befunde legen die Annahme einer *N,O*-Acylwanderung in der C₉-Aminosäure nahe. Dabei wandert der Acylrest der vorangehenden Aminosäure (*N*-Methyl-L-valin) von der *N*-Methylaminogruppe unter Ringerweiterung an die sekundäre OH-Funktion.



6. Sequenzanalyse mit Isocyclosporin A (7). – Mit Isocyclosporin A (**7**) verfügen wir über ein zu **1** isomeres Peptid mit freigelegter Aminofunktion, die einen *Edman*-Abbau ermöglicht. Das Isomere ist zwar auch cyclisch gebaut, doch war

⁶) Wie sich später zeigte, erfolgte die Umlagerung mit Methansulfonsäure auch in Dioxan.

anzunehmen, dass die neu gebildete Estergruppe unter den Reaktionsbedingungen gespalten würde.

Die klassische Ausführungsform des *Edman*-Abbaus [7] musste in wesentlichen Punkten modifiziert werden, da sich vor allem drei Eigenschaften des Isocyclosporins A als hinderlich erwiesen: a) das Peptid enthält sieben *N*-methylierte Aminosäure-Einheiten (der *Edman*-Abbau *N*-methylierter Peptide ist unseres Wissens noch nicht beschrieben worden); b) bei der Ablösung der Thiazolinonreste erfolgten jeweils unerwünschte Spaltungen weiterer Peptidbindungen; c) der lipophile Charakter von Isocyclosporin A und seinen Abbauprodukten erschwerte die selektive Extraktion der abgespaltenen Thiazolinon-Einheiten.

Da *Beyerman et al.* [8] am Beispiel des Sarkosins gezeigt haben, dass die Einwirkung von Phenylisothiocyanat auf *N*-Methylaminosäuren zu unerwünschten Nebenprodukten führt, verwendeten wir beim Abbau des Isocyclosporins A Methylisothiocyanat. Die gebildeten *N*-Methylthiohydantoine sind bei der Gas-Chromatographie etwas flüchtiger als die Phenylthiohydantoine, und der Überschuss an Reagens kann im Hochvakuum leicht entfernt werden.

Erste Abbauprobe zeigte, dass speziell die Peptidbindungen an der *N*-methylierten Aminogruppe des MeLeu gegen Trifluoressigsäure sehr empfindlich sind und unkontrollierbare Spaltungen zu Peptidfragmenten erfolgen können. Zur Unterdrückung dieser störenden Nebenreaktionen verwendeten wir deshalb zur Abspaltung der Thiazolinone wasserfreie Trifluoressigsäure in 1-Chlorbutan bei 10–15°. Ferner wurde die Umsetzung des Peptids mit Methylisothiocyanat in wasserfreiem Pyridin und Triäthylamin anstelle der üblichen Pufferlösung durchgeführt, womit das Auftreten von Nebenreaktionen durch die Anwesenheit von Wasser bei der Abspaltung des Thiazolinons ausgeschaltet wurde. Da der Überschuss an Reagens und Lösungsmittel rasch im Hochvakuum entfernt werden konnte, war die Durchführung eines Abbaucyklus innerhalb von 1 $\frac{1}{4}$ Std. möglich. Trotzdem liessen sich Nebenspalungen nie völlig vermeiden. So wurde z.B. das Methylthiohydantoin aus MeLeu von der 3. Stufe an in jeder weiteren Stufe aufgefunden. Das Spaltprodukt wurde jedoch nur dann als repräsentativ erachtet, wenn es in wesentlich grösserer Menge als in der vorhergehenden Stufe vorhanden war.

Isocyclosporin A und seine Abbauprodukte sind derart lipophil, dass sie von den üblichen Lösungsmitteln (1-Chlorbutan, 1,2-Dichloräthan) zusammen mit den Thiazolinonen extrahiert wurden. Immerhin gelang es, durch Ausnützung der Löslichkeitsunterschiede im Gemisch Essigester/Petroläther 1:9 eine vernünftige Abtrennung der Thiazolinone zu erreichen.

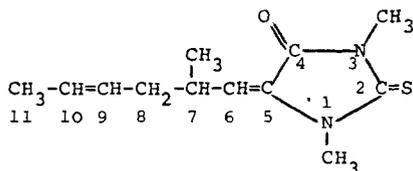
In Tabelle 4 sind die Abbauresultate zusammengestellt. Der *Edman*-Abbau lieferte erwartungsgemäss zuerst die C₉-Aminosäure, und zwar als Methylthiohydantoin (MTH) eines Anhydroproduktes, dem aufgrund der NMR.-Spektren und des MS. (*m/e* 238) Formel **9** zukommt. Das hauptsächlich in der 3. und 4. Abbaustufe gebildete Sar-MTH sowie Val-MTH waren schwer zu extrahieren. Die Stufen 9 und 10 wiesen gleich grosse Mengen von MeLeu-MTH und Ala-MTH auf. Da im Cyclosporin A bzw. der Isoverbindung nur zwei Alaninreste, hingegen vier MeLeu vorliegen, wurde für beide Stufen MeLeu als Hauptprodukt betrachtet. Das in Stufe 11 gebildete MeVal-MTH wurde zwar nur in sehr kleiner Ausbeute isoliert, war aber

Tabelle 4. Edman-Abbau des Isocyclosporin A (7)

Aminosäure	Abbaustufe a)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
C ₉ -AS (5)	87	0,8										
Abu		89										
Sar			43	46 ^{b)}	6	3	1					
MeLeu			7	90	16	60	16	2,7	4,0	2,1	0,38	
Val				5	34	22 ^{b)}	5					
Ala						4	20	11,3	4,4	2,0		
MeVal												0,25

a) Ausbeuten der jeweiligen Methylthiohydantoine (MTH) in mol-%, bezogen auf eingesetztes Isocyclosporin A.

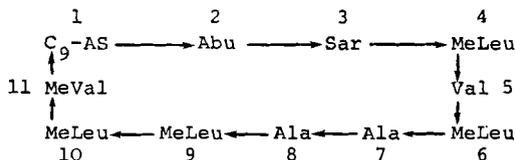
b) Diese Restwerte können reduziert werden, wenn in der vorangehenden Stufe grössere Mengen Extraktionsmittel eingesetzt werden, allerdings unter Verlust von partiell abgebautem Peptid.



9

deutlich erkennbar (DC./GC.). Zur Sicherheit wurde noch eine 12. Abbaustufe durchgeführt, die jedoch lediglich nichtsignifikante Spuren von MeLeu-MTH und MeVal-MTH lieferte.

Der Edman-Abbau ergab somit für die 11 Aminosäuren des Isocyclosporins A bzw. des Cyclosporins A folgende Sequenz:



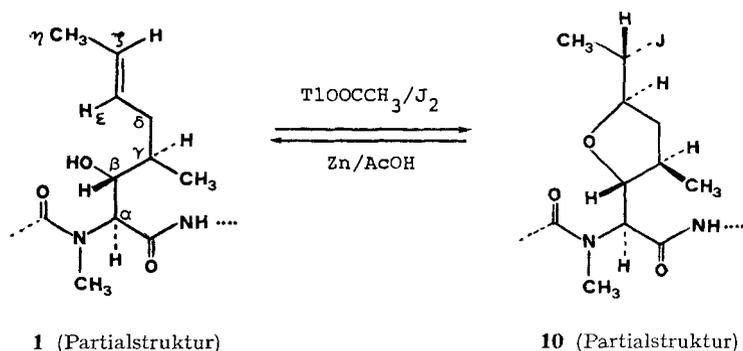
Noch offen bleibt die Frage, in welcher Reihenfolge die beiden Antipoden des Alanins auftreten (s. Kap. 7). Ferner sind die Konfiguration der C₉-Aminosäure und die Geometrie ihrer Doppelbindung noch nicht bestimmt (s. Kap. 8.).

7. Jodderivat 10 von Cyclosporin A. – Im Hinblick auf die vollständige und unabhängige Strukturaufklärung des Cyclosporins A wurde ein zur Röntgenstrukturanalyse geeignetes Derivat mit Schweratom hergestellt. Cyclosporin A (1) enthält nach den bisherigen Erkenntnissen nur zwei Strukturelemente, die zur Herstellung

von Derivaten günstig sein dürften, nämlich die sekundäre OH-Gruppe und die (C=C)-Doppelbindung in der C₉-Aminosäure. Da sich die OH-Gruppe, offenbar wegen sterischer Hinderung, als reaktionsträge erwies, konzentrierten wir uns auf Additionsreaktionen an der Doppelbindung. Nachdem Oxymyrierungsreaktionen zu keinem kristallinen Derivat geführt hatten, wandten wir die von *R. C. Cambie et al.* [9] kürzlich publizierte Umsetzung einer Doppelbindung mit J₂ und Thallium(I)-acetat an. Diese Additionsreaktion sollte zu einem (Jod-acetoxy)-Derivat führen, verlief aber beim Cyclosporin A nicht wie erwartet. Wir erhielten zwar ein schön kristallisierendes, jodhaltiges Präparat **10**, das im NMR.-Spektrum keine Vinylprotonen mehr aufweist, aber auch keine Acetylsignale zeigt. Auch Thallium(I)-Salze anderer Carbonsäuren, z.B. Tl-benzoat, lieferten mit J₂ dasselbe Derivat, d.h. das Carboxylat-ion wurde nicht addiert.

Die Addition von Jod am Cyclosporin A verlief offenbar selektiv und ohne Änderung der sterischen Verhältnisse an den nichtbeteiligten Zentren der Molekel. **10** ging nämlich mit Zinkstaub in Eisessig leicht wieder unter *trans*-Eliminierung in das genuine Cyclosporin A über. Elementaranalyse und Molekularpik (*m/e* 1327) des Jodderivats **10** entsprechen der Summenformel C₆₂H₁₁₀JN₁₁O₁₂. Fragmentpik bei *m/e* 1199 (1327–128) und 1089 (1327–238) sind auf Abspaltung von HJ bzw. des gesamten jodhaltigen C₇-Fragments der cyclisierten C₉-Aminosäure zurückzuführen.

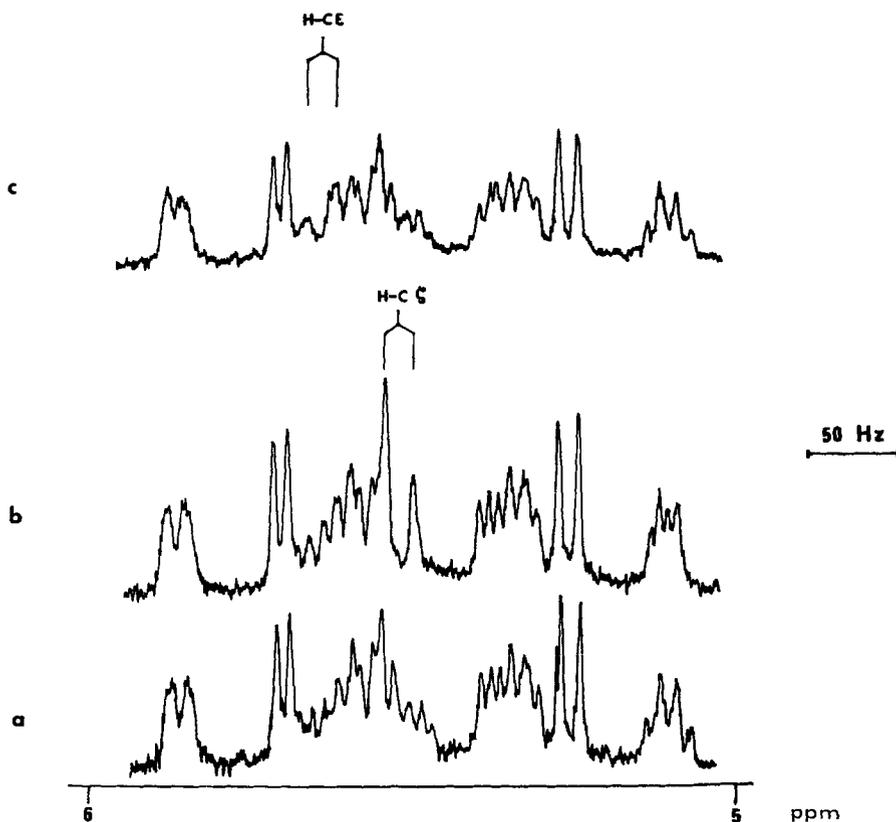
In Anlehnung an die bei der sauren Hydrolyse postulierte Tetrahydrofuranstruktur des Artefakts **6** nahmen wir bei der Additionsreaktion eine ähnliche Cyclisierung unter Beteiligung der Hydroxylgruppe an. Damit kommt der jodierten C₉-Aminosäure Formel **10** zu.



Die Röntgenstrukturanalyse [10] bestätigte die Konstitution von **10** und erlaubte die Ableitung der relativen Konfiguration von **1**. Die für Cyclosporin A in Kap. 8 angegebene absolute Konfiguration ist direkt noch nicht bestimmt worden, sondern basiert auf dem experimentellen Nachweis von acht L-Aminosäurebausteinen. Die in freier Form bisher nicht isolierte C₉-Aminosäure **5** gehört ebenfalls zur L-Reihe und ist als (2*S*, 3*R*, 4*R*)-2-Methylamino-3-hydroxy-4-methyl-oct-6-en-1-säure zu bezeichnen. Mit der Röntgenstrukturanalyse ist auch die Reihenfolge der beiden enantiomeren Alanin-Einheiten festgelegt.

8. Konfiguration der (C=C)-Doppelbindung in Cyclosporin A. – Die Geometrie der Doppelbindung in der C₉-Aminosäure-Einheit **5** ist aufgrund der ¹H-NMR.-Spektren bei 90 MHz wegen ungenügender Auflösung nicht zu ermitteln, obwohl die Signale der Vinylprotonen bei ca. 5,3 ppm deutlich sichtbar sind. ¹H-NMR.-Spektren von Cyclosporin A bei 84,56 kG (≈ 360 MHz) in CDCl₃ erlauben eine weitgehende Zuordnung der Wasserstoffatome an C(α) der Aminosäuren und liefern eine weitere Bestätigung der β-Hydroxysäure-Struktur der C₉-Aminosäure, geben jedoch keine weiteren Aufschlüsse bezüglich der Doppelbindung. In Deuteriobenzol hingegen sind die beiden Vinylprotonensignale (H–C(ε) und H–C(ζ) der Partialformel **1**) deutlich getrennt (Fig. 3). Durch Entkopplung der Methylenprotonen an C(δ) bzw. der Methylprotonen an C(η) ist jeweils die *vicinale* Kopplung $J(\epsilon, \zeta) = 16$ Hz messbar. Damit ist die (*E*)-Konfiguration der Doppelbindung in Cyclosporin A bewiesen.

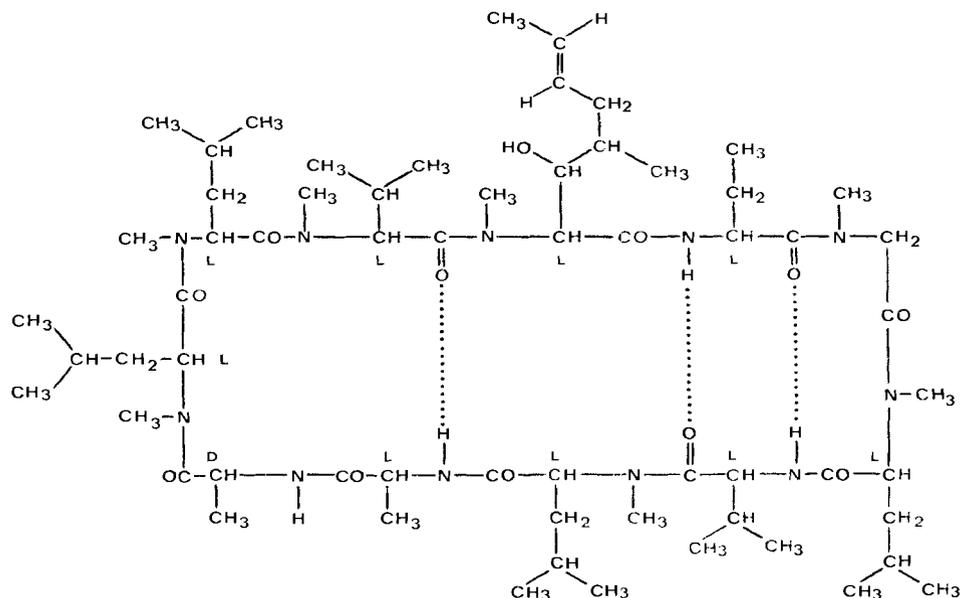
Mit den präsentierten experimentellen Befunden und sich daraus ergebenden Ableitungen ist die Struktur des Cyclosporins A als 33gliedriges Cyclopeptid der Formel **1** aufgeklärt. Nach der Röntgenanalyse des Jodderivates **10** lässt sich die molekulare



- a) Unentkoppeltes Spektrum.
 b) Doppelresonanzspektrum unter Bestrahlung von H–C(η) der C₉-AS.
 c) Doppelresonanzspektrum unter Bestrahlung von H–C(δ) der C₉-AS.

Fig. 3. Ausschnitt aus ¹H-NMR.-Spektrum von Cyclosporin A bei 360 MHz in C₆D₆

Konformation von Cyclosporin A am besten als β -Faltblattstruktur (AS. Nr. 11, 1–6, 7) mit einer Schlinge (gebildet durch AS. Nr. 7–11) beschreiben, die durch drei strebenartige Wasserstoffbrücken stabilisiert wird [10].



Cyclosporin A (1)

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Die Schmelzpunkte sind auf einem *Kofler*-Block bestimmt und nicht korrigiert. Zur Chromatographie diente Kieselgel (*Merck*, Korngrösse 0,06–0,2 mm). UV.-Spektren (Angaben von λ_{\max} in nm und $\log \epsilon$) wurden in Methanol auf einem *Beckmann*-Spektralphotometer Mod. DK 2 aufgenommen. IR.-Spektren (Angaben in cm^{-1}) wurden, soweit nichts anderes angegeben, in CH_2Cl_2 auf einem *Perkin-Elmer* IR.-Spektrophotometer, Mod. 21 mit Filter, bestimmt. Die Aufnahme der NMR.-Spektren erfolgte in CDCl_3 auf einem *Bruker* HX-90-E sowie auf einem *Bruker* HX-360, interner Standard Tetramethylsilan (= 0 ppm), chemische Verschiebung in ppm (Signalform, Anzahl Protonen, Zuordnung); Signalform: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quadruplett, *m* = Multipllett. Die Elektronenstoss-Massenspektren (MS.) wurden auf einem CEC-Massenspektrometer 21-110 B aufgenommen (Elektronenenergie 70 eV, Beschleunigungsspannung 4, 6 bzw. 8 kV, Quelltemperatur 280–300°, Druck *ca.* 10^{-5} – 10^{-6} Torr, Angaben in Massenzahlen). Für die Felddesorptions-Massenspektren diente ein Massenspektrometer MAT 711 (Beschleunigungs- und Ziehspannung je 6 kV, Quelltemperatur 90°, Verstärkungsfaktor des Multipliers 10^6 , Scan-Geschwindigkeit 48 sec./Dekade).

Isolierung der Hauptmetaboliten [1]. – Die durch aerobe Submerszuchtung von *Trichoderma polysporum* (LINK ex PERS.) *Rifai* (NRRL 8044) erhaltene Kulturbrühe (400 l) wurde mit 400 l *n*-Butylacetat ausgerührt. Nach Auftrennung in einem *Westfalia*-Separator wurde die organische Phase i. V. konzentriert, und der Rohextrakt (446 g) durch 3stufige Verteilung zwischen 90proz. Methanol und Petroläther entfettet. Das anfallende Material (152 g) löste man in Chloroform und chromatographierte an 4,5 kg Kieselgel 60 (*Merck*, 0,2–0,5 mm), wobei Chloroform mit steigenden Anteilen Methanol als Eluierungsmittel diente. Die mit Chloroform/Methanol 98,5:1,5 erhaltenen Fraktionen enthielten vorwiegend Cyclosporin A, die späteren, mit Chloroform/Methanol 97:3 eluierten Anteile vorwiegend Cyclosporin C.

Die Cyclosporin-A-haltigen Fraktionen wurden zusammen an Sephadex LH-20 mit Methanol chromatographiert. Die Spitzenfraktionen (total 35,5 g) wurden in Toluol gelöst und an 1,8 kg Aluminiumoxid (*Brockmann* Akt. I, *Camag*, Typ 507-C) mit Toluol und steigenden Anteilen Essigester nachchromatographiert. Die einheitlichen Fraktionen (DC.) wurden zusammen in abs. Alkohol gelöst und einer Kohlebehandlung unterworfen. Aus der filtrierten Lösung resultierten nach dem Eindampfen 29,4 g reines Cyclosporin A in Form eines weissen, amorphen Pulvers.

Die bei der Chromatographie des entfetteten Rohextraktes an Kieselgel gewonnenen Cyclosporin-C-haltigen Eluate wurden vereinigt und eingedampft. Den Rückstand (45 g) chromatographierte man zunächst mit Methanol an Sephadex LH-20. Die vereinigten Spitzenfraktionen (35 g) wurden in 130 ml Diäthyläther aufgenommen. Diese Lösung wurde zu 1080 ml *n*-Hexan getropft, wobei das Rohprodukt (29 g) ausfiel. Es wurde schliesslich an 1,45 kg Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 nachchromatographiert. Ausbeute: 16,5 g einheitliches Cyclosporin C als weisses, amorphes Pulver.

Cyclosporin A (**1**). Amorphes Cyclosporin A kristallisierte aus der 2–3fachen Menge Aceton bei -15° in weissen prismatischen Nadeln vom Smp. $148-151^{\circ}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -244^{\circ}$ ($c = 0,6$, Chloroform) und $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -189^{\circ}$ ($c = 0,5$, Methanol). **1** ist gut löslich in Methanol, Äthanol, Aceton, Äther, Chloroform und sehr wenig löslich in Wasser und gesättigten Kohlenwasserstoffen. DC. auf Polygram Sil G-Folien mit Chloroform/Methanol 96:4 (Detektion mit Joddampf): $R_f = 0,52$. – UV.: Endabsorption gegen 200 nm. – IR.: 1630–1670 (Amid), siehe Fig. 1. – $^1\text{H-NMR}$. (Fig. 2): 7,9 (*d*, 1 H, NH); 7,6 (*d*, 1 H, NH); 7,4 (*d*, 1 H, NH); 7,1 (*d*, 1 H, NH); 4,2 bis 5,8 (*m*, ca. 13 H, H–C(α) von AS. 1 bis 11, H–C(ϵ) und H–C(ζ) von C₉–AS.); 3,7 (*s*, 2 H, OH, H–C(β) von C₉–AS.); 3,45 (*s*, 3 H,

Tabelle 5. $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von *Cyclosporin A* (**1**) bei 22,63 MHz in CDCl_3 , TMS = 0 ppm

δ (ppm)	rel. Intensität (geschätzt)	Aufspaltung off-resonance	δ (ppm)	rel. Intensität (geschätzt)	Aufspaltung off-resonance
173,07	1	<i>s</i>	36,0	1	
173,04	1	<i>s</i>	35,8	1	
172,87	1	<i>s</i>	35,3	1	
172,85	1	<i>s</i>	33,8	1	
170,87	1	<i>s</i>	31,4	1	
170,50	1	<i>s</i>	31,2	1	
170,44	1	<i>s</i>	31,1	1	
169,75	1	<i>s</i>	29,8	1	
169,65	1	<i>s</i>	29,6	1	
169,41	1	<i>s</i>	29,5	1	
169,35	1	<i>s</i>	28,9	1	
129,2	1	<i>d</i>	25,2	1	
125,6	1	<i>d</i>	24,8	2	
74,3	1	<i>d</i>	24,6	2	
58,6	1	<i>d</i>	23,8	2	
57,7	1	<i>d</i>	23,4	1	
57,4	1	<i>d</i>	23,2	2	
55,2	1	<i>d</i>	21,8	1	
55,1	1	<i>d</i>	21,7	1	
55,0	1	<i>d</i>	21,1	1	
50,1	1	<i>t</i>	20,1	1	
48,7	1	<i>d</i>	19,7	1	
48,5	1	<i>d</i>	18,6	1	
48,2	1	<i>d</i>	18,3	1	
44,9	1	<i>d</i>	18,1	1	
40,6	1		17,8	1	
39,2	1		16,8	1	
38,9	1		15,8	1	<i>q</i>
37,3	1		9,8	1	<i>q</i>

NCH₃); 3,3 (*s*, 3 H, NCH₃); 3,15 (*s*, 3 H, NCH₃); 3,05 (*s*, 6 H, NCH₃); 2,6 (*s*, 6 H, NCH₃); 0,5 bis 2,6 (*m*, *ca.* 75 H); 1,6 (*d*, 3 H, H–C(η) von C₉–AS.); 1,3 (*s*, 3 H, H–C(β) von Ala); 1,2 (*d*, 3 H, H–C(β) von Ala). – ¹³C-NMR.: Tabelle 5. – MS.: 1201 (*M*⁺), 1183 (*M*⁺–H₂O).

C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	Ber. C 61,9	H 9,3	N 12,8	O 16,0%
(1202,635)	Gef. „ 61,8	„ 9,5	„ 12,6	„ 15,8%

Cyclosporin C. Aus 2facher Menge Aceton bei –15° farblose prismatische Nadeln vom Smp. 152–155°, [α]_D²⁰ = –255° (*c* = 0,5, Chloroform) und [α]_D²⁰ = –182° (*c* = 0,5, Methanol). Löslichkeiten: gleich wie bei Cyclosporin A. DC. auf Polygram Sil G-Folien mit Chloroform/Methanol 94:6 (Detektion mit Jod oder *Dragendorff*-Reagens): Rf = 0,23. – UV.: Endabsorption gegen 200 nm. – IR.: 1630–1670 (Amid). – MS.: 1217 (*M*⁺), 1199 (*M*⁺–H₂O).

C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₃	Ber. C 61,1	H 9,2	N 12,6	O 17,1%
(1218,634)	Gef. „ 60,9	„ 9,4	„ 12,9	„ 17,4%

Dihydrocyclosporin A (2). – Zu einer Suspension von 250 mg vorhydriertem Pd/C in 20 ml Äthanol gab man die Lösung von 4,81 g Cyclosporin A (1) in 60 ml Äthanol und hydrierte bis zur beendeten Wasserstoffaufnahme. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde die Lösung eingedampft und der Rückstand an 500 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol 98:2 eluierten Fraktionen lieferten 4,21 g einheitliches, amorphes 2 vom Smp. 150–153°, [α]_D²⁰ = –235° (*c* = 0,5, Chloroform) und [α]_D²⁰ = –178° (*c* = 0,5, Methanol). Rf-Werte (DC.-Fertigplatten, Kieselgel 60, F-254 *Merck*): 0,49 (Chloroform/Methanol 96:4), 0,65 (Aceton), 0,59 (Tetrahydrofuran). – UV.: Endabsorption gegen 200 nm. – IR.: 1630–1670 (Amid). – MS.: 1203 (*M*⁺) und 1185 (*M*⁺–H₂O).

C ₆₂ H ₁₁₃ N ₁₁ O ₁₂	Ber. C 61,8	H 9,5	N 12,8	O 15,9%
(1204,651)	Gef. „ 61,8	„ 9,5	„ 12,6	„ 16,0%

Hydrolyseversuche. – *Orientierende Aminosäureanalyse*. Die Hydrolyse von Cyclosporin A wurde während 48 Std. in 6*N* HCl bei 115° in evakuierten Ampullen durchgeführt. Die Aminosäureanalysen erfolgten nach *Moore & Stein* [3] auf einem Aminosäure-Analyser BC 200 (*BioCal*, München).

Analytische und präparative gas-chromatographische Trennung der Aminosäuren als Trifluoracetyl-methylester. 92,5 mg Cyclosporin A (1) oder Dihydrocyclosporin A (2) wurden 48 Std. in 6*N* HCl hydrolysiert. Nach Eindampfen wurde der Rückstand 16 Std. i. HV. bei 40° getrocknet und dann nach [4] in das Gemisch der TFA-methylester übergeführt. Nach Abdampfen wurde der Rückstand in 0,5 ml Methylenchlorid gelöst und die Komponenten durch Gas-Chromatographie analytisch und präparativ getrennt.

Die analytische Bestimmung erfolgte mit 1 μ l Methylenchlorid-Lösung auf *Varian Acrograph* 1200 (Glassäule 300 \times 0,2 cm mit 5% OV 17 auf Chromosorb W H. P. (80–100 mesh); Temp. Inj. 230°; Temp./Programm von 60°–280° mit 6°/min; Temp. Det. 250° FID; Trägergas: Helium). Die einzelnen Fraktionen wurden direkt in die Ionenquelle des Massenspektrographen eingeführt (Bedingungen siehe unter Allgemeines).

Zur quantitativen Bestimmung der Molverhältnisse dienten *n*-Tetradekan als interner Standard und ein Referenzgemisch aus Alanin, α -Aminobuttersäure, Valin, Sarkosin, *N*-Methylvalin und *N*-Methylleucin im Verhältnis 2:1:1:1:1:4, das unter denselben Bedingungen nach [4] verestert und acyliert worden war (Ergebnisse Tab. 2).

TFA-Alanin-methylester. – MS.: 199.

TFA- α -Aminobuttersäure-methylester. – MS.: 213. – NMR.: 6,8 (*d*, 1H, NH); 4,5 (*q*, 1H, H–C(α)); 3,7 (*s*, 3H, COOCH₃); 1,8 (*m*, 2H, H–C(β)); 0,9 (*t*, 3H, H–C(γ)).

TFA-Valin-methylester. – MS.: 227.

TFA-Sarkosin-methylester. – MS.: 199. – NMR.: 4,2 (*s*, 2H, H–C(α)); 3,75 (*s*, 3H, COOCH₃); 3,2 (*q*, 3H, NCH₃).

TFA-*N*-Methylvalin-methylester. – MS.: 241. – NMR.: 4,75 (*d*, 1H, H–C(α)); 3,75 (*s*, 3H, COOCH₃); 3,1 (*q*, 3H, NCH₃); 2,25 (*m*, 1H, H–C(β)); 1,0 und 0,9 (*d*, 6H, H–C(γ)).

TFA-*N*-Methylleucin. – MS.: 255.

TFA-Dihydro-C₉-aminosäure-methylester 4 (C₁₅H₂₁F₆NO₅): MS.: 409, Fragmente siehe Tab. 3. – NMR.: 5,6 (*m*, 2H, H–C(α), H–C(β)); 3,75 (*s*, 3H, COOCH₃); 3,2 (*q*, 3H, NCH₃); 1,0–2,0 (*m*, 7H, H–C(γ), H–C(δ), H–C(ϵ), H–C(ζ)); 0,95 (*d*, 3H, H₃C–C(γ)); 0,9 (*t*, 3H, H–C(η)).

Präparative Isolierung der freien Aminosäuren. 5 g Cyclosporin A (**1**) wurden in 150 ml 6*N* HCl während 20 Std. unter Rückfluss gekocht. Den nach Eindampfen erhaltenen, in wenig Wasser gelösten Rückstand gab man auf eine Säule (1,5 × 32 cm) aus schwach basischem Ionenaustauscher Dowex AG 3-X4 (in der Acetatform) und wusch solange mit Wasser nach, bis das Filtrat Ninhydrin-negativ war. Das Eluat wurde eingedampft und i. HV. getrocknet: 5,4 g Aminosäuregemisch. Die Auftrennung erfolgte an 1,2 kg Cellulosepulver (Avicel, *FMC-Corporation*, New Ark, Penn.) mit zu 95% wassergesättigtem 2-Butanol, wobei 35 Fraktionen à 600 ml aufgefangen wurden. Die Analysen erfolgten mittels DC. (Fertigplatten «Polygram Cel 400», Propanol/Wasser 4:1, Ninhydrin-Spray); die einzelnen Aminosäuren wurden kristallisiert und durch Vergleich mit authentischen Präparaten identifiziert (Smp., opt. Drehung, IR.- und NMR.-Spektren). Resultat: Fr. 1-8: verworfen; Fr. 9-11: 470 mg Artefakt **6** (siehe unten); Fr. 12-13: 2,349 g *N*-Methyl-L-leucin; Fr. 14-15: 171 mg Gemisch aus *N*-Methyl-L-leucin und *N*-Methyl-L-valin; Fr. 16-17: 394 mg *N*-Methyl-L-valin; Fr. 18-19: 463 mg L-Valin; Fr. 20: 24 mg Gemisch aus L-Valin und α -Aminobuttersäure; Fr. 21-23: 280 mg L- α -Aminobuttersäure; Fr. 24: 62 mg Gemisch aus L- α -Aminobuttersäure und Alanin; Fr. 25-35: 1,040 g Gemisch aus Alanin und Sarkosin; Nachchromatographie an 800 g Silicagel mit Alkohol/Wasser 7:3 ergab 638 mg D,L-Alanin und 337 mg Sarkosin.

Cyclischer Artefakt 6. Umkristallisation der Fraktionen 9-11 aus Äthanol/Wasser 9:1, dann aus Wasser lieferte farblose Nadeln vom Smp. 270° (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -24,5^\circ$ ($c = 1$, Wasser). - UV.: Endabsorption. - IR. (Nujol): 3050, 1620, 1420, 1403, 1350, 1335, 1266, 1150, 1040. - NMR. (D_2O): 3,3-4,2 (*m*, 3H, H-C(α), H-C(β), H-C(ϵ)); 2,7 (*s*, 3H, NCH₃); 2,3 (*m*, 1,5H, H-C(γ)); 1,0-2,0 (*m*, 3,5H, H-C(δ), H-C(ζ)); 1,0 (*d*, 3H, *J* = 6, H₃C-C(γ)); 0,9 (*t*, *J* = 7, 3H, H-C(η)). Aus der Integrationskurve kann auf das Vorliegen eines Gemisches der C(ϵ)-Isomeren (*ca.* 1:1) geschlossen werden. - MS.: 201 (*M*⁺).

C ₁₀ H ₁₉ NO ₃	Ber. C 59,7	H 9,5	N 7,0	O 23,8%
(201,27)	Gef. „ 59,6	„ 9,6	„ 6,9	„ 23,6%

Isocyclosporin A (7). - Eine Lösung von 14,4 g (12 mmol) Cyclosporin A (**1**) in 100 ml Methanol wurde mit 2,88 g (30 mmol) Methansulfonsäure in 50 ml Methanol versetzt und das Gemisch unter Feuchtigkeitsausschluss auf 50° erwärmt. Die Bildung von **7** wurde mittels DC. verfolgt (Polygram Sil G-Folien, Chloroform/Methanol/Essigsäure 90:6:4; Detektion mit Joddampf). Nach *ca.* 17 Std. wurde auf 20° abgekühlt, 2,7 g Natriumacetat zugegeben und das abgeschiedene Salz abfiltriert. Das farblose Filtrat dampfte man bei 40° ein, nahm den Rückstand in Chloroform auf, filtrierte und dampfte die Lösung ein. Das Rohprodukt (16 g) wurde an 1,5 kg Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 chromatographiert. Die nach DC. praktisch einheitlichen Fraktionen von Isocyclosporin A (10,3 g) ergaben aus Äther Kristalle vom Smp. 142-144°, $[\alpha]_D^{20} = -199^\circ$ ($c = 0,5$, Chloroform) und $[\alpha]_D^{20} = -129^\circ$ ($c = 0,5$, Methanol). - UV.: Endabsorption. - IR.: 1736 (Ester). - MS.: 1201 (*M*⁺).

C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	Ber. 61,9	H 9,3	N 12,8	O 16,0%
(1202,635)	Gef. 61,8	„ 9,2	„ 12,8	„ 16,3%

N-Acetyl-isocyclosporin A. 7,21 g (6 mmol) Isocyclosporin A (**7**) wurden mit 36 ml Acetanhydrid/abs. Pyridin 1:1 während 23 Std. bei RT. umgesetzt. Chromatographie des Eindampfrückstandes an 600 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 ergab einheitliche Spitzenfraktionen, welche aus Cyclohexan in Form eines amorphen, weissen Pulvers (6,32 g) ausfielen: Smp. 145° (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -214^\circ$ ($c = 0,5$, Chloroform) und $[\alpha]_D^{20} = -152^\circ$ ($c = 0,5$, Methanol). - IR.: 1735 (Ester), 1630-1670 (Amid).

C ₆₄ H ₁₁₃ N ₁₁ O ₁₃	Ber. C 61,8	H 9,2	N 12,4	O 16,7%
(1244,67)	Gef. „ 61,9	„ 9,4	„ 12,1	„ 16,7%

N-Benzoyl-isocyclosporin A. 7,21 g (6 mmol) Isocyclosporin A (**7**) wurden mit 5,42 g (24 mmol) Benzoesäure-anhydrid in 60 ml abs. Pyridin während 17 Std. bei 60° umgesetzt. Nach Zugabe von Wasser wurde mit Äther extrahiert und das Rohprodukt durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt. Aus Cyclohexan 6,07 g amorphes, weisses Pulver vom Smp. 130-140° (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -167^\circ$ ($c = 0,5$, Chloroform). - IR.: 1735 (Ester), 1630-1670 (Amid). - NMR.: 7,4 (*s*, 5H, C₆H₅).

C ₆₉ H ₁₁₅ N ₁₁ O ₁₃	Ber. C 63,4	H 8,9	N 11,8	O 15,9%
(1306,74)	Gef. „ 63,3	„ 9,0	„ 11,5	„ 15,9%

Dihydro-isocyclosporin A (8). 9,62 g Isocyclosporin A (7) in 100 ml Äthanol wurden zu 0,45 g Pd/C (vorhydriert) in 30 ml Äthanol gegeben und bei 22° bis zur beendeten Wasserstoffaufnahme hydriert. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wurde eingedampft und der Rückstand an 1 kg Kieselgel chromatographiert. Die mit Chloroform/Methanol 98:2 eluierten Spitzenfraktionen wurden aus Äther kristallisiert. Ausbeute 8 g weisse Nadeln vom Smp. 145–147°, $[\alpha]_D^{20} = -200^\circ$ ($c = 0,5$, Chloroform) und $[\alpha]_D^{20} = -134^\circ$ ($c = 0,5$, Methanol). – UV.: Endabsorption. – IR.: 1736 (Ester).

Cyclosporin A (1) aus *Isocyclosporin A* (7). 2,4 g (2 mmol) Isocyclosporin A (7) wurden in 100 ml Dioxan während 10 Std. unter Rückfluss erhitzt. Das nach Eindampfen erhaltene Rohprodukt wurde an 250 g Kieselgel chromatographiert. Die mit Chloroform/Methanol/Essigsäure 90:6:4 eluierten Spitzenfraktionen (1,49 g) wurden an 150 g Aluminiumoxid nachchromatographiert. Elution mit Toluol/Essigester 1:1 lieferte 1,10 g einheitliches Cyclosporin A (1), das aus Aceton in weissen Nadeln kristallisierte: Smp. 147–151°, $[\alpha]_D^{20} = -237^\circ$ ($c = 0,5$, Chloroform) und $[\alpha]_D^{20} = -185^\circ$ ($c = 0,5$, Methanol). Das Präparat stimmte in den Rf-Werten (Chloroform/Aceton 1:1, Chloroform/Methanol/Essigsäure 94:3:3 und Chloroform/Methanol 96:4, Polygram Sil G-Folien), im IR.- und NMR.-Spektrum sowie in den biologischen Eigenschaften mit einem authentischen Vergleichspräparat überein.

$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	Ber. C 61,9	H 9,3	N 12,8	O 16,0%
(1202,64)	Gef. „ 61,5	„ 9,4	„ 12,7	„ 16,0%

Sequenzanalyse von Isocyclosporin A (7). – *Allgemeines.* Der modifizierte Abbau nach *Edman* [7] wurde manuell ausgeführt und beanspruchte für die 11 Stufen rund 2 Tage. Die abgespaltenen Methylthiohydantoin (MTH) der einzelnen Aminosäuren wurden mittels DC. und Gas-Chromatographie identifiziert. Für die quantitativen Analysen wurde ein entsprechendes Gemisch der synthetisch hergestellten MTH-Aminosäuren eingesetzt. Als interner Standard diente Leucin-MTH. *N*-Methyl-L-leucin und *N*-Methyl-L-valin wurden nach *Quitt et al.* [11], die MTH von Sarkosin, Alanin, Valin, Leucin und *N*-Methyl-valin nach *Stepanov et al.* [12] hergestellt. Für *N*-Methyl-leucin-MTH, α -Aminobuttersäure-MTH und Anhydro-C₉-Aminosäure-MTH, siehe unten.

Abbauzyklus. 10 mg Isocyclosporin A (7) wurden in ein spitzen Zentrifugenglas abgewogen und in 0,5 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 25 μ l Triäthylamin und 25 μ l *N*-Methylthiocyanat wurde die Lösung unter N₂ 10 Min. bei 55° stehengelassen und dann mit weiteren 10 μ l *N*-Methylthiocyanat versetzt. Nach weiteren 10 Min. bei 55° wurde die Lösung bei 25° i. HV. eingedampft. Den Rückstand nahm man in 0,5 ml Trifluoressigsäure/1-Chlorbutan 1:9 auf und liess 20 Min. bei 10–15° unter N₂ reagieren. Nach Abdampfen unter einem N₂-Strom und Trocknen i. HV. bei 25° wurde der Rückstand in 0,2 ml Essigester gelöst, mit 1,8 ml tiefsiedendem Petroläther vermischt und der Niederschlag abzentrifugiert. Der Rückstand wurde noch 2mal analog mit Essigester und Petroläther behandelt und dann i. HV. 5 Min. bei 25° getrocknet und sofort dem nächsten Abbauzyklus unterworfen. Sämtliche beim Zentrifugieren anfallenden, überstehenden Lösungen wurden vereinigt, unter N₂ bei 25° eingedampft und der Rückstand mit 0,5 ml 1N Salzsäure versetzt. Nach 10 Min. Erwärmen auf 80° wurde 3mal mit je 1 ml Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde unter N₂ bei 25° eingedampft und das gebildete Methylthiohydantoin in 100 μ l⁷⁾ Essigester gelöst. 2 μ l dieser Lösung wurden für die DC.-Analyse entnommen, der verbleibende Teil mit 100 μ l⁷⁾ internem Standard (10 μ mol/ml) versetzt und mit 2 μ l des Gemisches die Gas-Chromatographie ausgeführt. Der Rest der Lösung wurde bei –18° aufbewahrt.

Dünnschichtchromatographie (Tab. 6). Die DC. erfolgte auf Fertigfolien Polygram Sil G/UV₂₅₄ (*Macherey, Nagel & Co.*) mit Heptan/Benzol/Essigester 4:3:2. Detektion: UV.-Licht bei 254 nm. Sar-MTH und Ala-MTH wurden durch zweidimensionale Chromatographie mit Chloroform als Fliessmittel getrennt (Rf 0,26 bzw. 0,10), analog wurde der interne Standard Leu-MTH von MeVal-MTH getrennt (Rf 0,22 bzw. 0,40).

7) Bei den folgenden Abbauzyklen wurden diese Volumina schrittweise den Ausbeuten an Aminosäure-MTH angepasst.

Gas-Chromatographie (Tab. 7). Die GC. erfolgte auf einem *Varian Aerograph 1200* an Chromosorb W AW DMCS, 100–120 mesh, mit 10% DC 560 nach *Pisano & Bronzert* [13] vorbereitet. Säulentemp. 175°, FID. MeVal-MTH und Abu-MTH liessen sich erst nach Überführung des Abu-MTH in das entsprechende Trimethylsilylderivat trennen (bei gleichzeitiger Einspritzung des Gemisches mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid reagierte nur Abu-MTH zum Silylderivat). Für das Anhydro-C₉-aminosäure-MTH wurde als Referenzwert die grösste bei den Vorversuchen erhaltene Pikfläche pro nmol genommen.

Tabelle 6. *Dünnschichtchromatographische Trennung der Aminosäuren-MTH*

AS.-MTH	Rf-Werte	
	mit Heptan/Benzol/Essigester 4:3:2	mit Chloroform
C ₉ -AS.	0,67	
MeLeu	0,36	
MeVal	0,32	0,40
Leu	0,32	0,22
Val	0,22	
Abu	0,16	
Sar	0,10	0,26
Ala	0,10	0,10

Tabelle 7. *Gas-chromatographische Trennung der Aminosäure-MTH*

Aminosäure-MTH	Rel. Retentionszeit ^{a)} auf DC 560	Rel. Retentionszeit des Trimethylsilylderivates
Sar	0,39	
Ala	0,45	
MeVal	0,57	
Abu	0,57	0,73
Val	0,64	
MeLeu	0,84	
Leu	1,00	
C ₉ -Aminosäure	2,63	

^{a)} bezogen auf die Retentionszeit von Leu-MTH.

N-Methylthiohydantoin von *N*-Methylleucin. Die Substanz wurde wie *N*-Methylvalin-MTH nach *Stepanov et al.* [12] hergestellt. Farblose Kristalle vom Smp. 54°.

C₉H₁₆N₂OS Ber. C 54,0 H 8,1 N 14,0 O 8,0 S 16,0%
(200,30) Gef. „ 53,8 „ 8,0 „ 13,9 „ 8,0 „ 16,2%

N-Methylhydantoin von *D,L*- α -Aminobuttersäure. Das Derivat wurde analog [12] gewonnen. Farblose Kristalle vom Smp. 138°.

C₆H₁₀N₂OS Ber. C 45,5 H 6,4 N 17,7 O 10,1 S 20,3%
(158,22) Gef. „ 45,8 „ 6,4 „ 17,8 „ 10,1 „ 20,3%

Methylthiohydantoin der Anhydro-C₉-Aminosäure (9). 5 g Isocyclosporin A (7) wurden für den 1. Abbauzyklus eingesetzt und das zunächst gebildete Thiazolinon in Dioxan/4*N* HCl 3:1 durch 10 Min. Erwärmen auf 80° in das Methylthiohydantoin übergeführt. Das Rohprodukt wurde mit Essigester extrahiert, die Lösung eingedampft und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert. Die mit Methylenchlorid eluierten Spitzenfraktionen lieferten 9 als amorphes Produkt. – MS.:

238 (M^+). – NMR.: 5,2–5,6 (m , 3H, H–C(6), H–C(9), H–C(10)); 3,7 (m , 1H, H–C(7)); 3,4 (s , 3H, NCH₃); 3,3 (s , 3H, NCH₃); 2,1 (m , 2H, H–C(8)); 1,65 (d , 3H, H–C(11)); 1,1 (d , 3H, H₃C–C(7)).

C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₅	Ber. C 60,5	H 7,6	N 11,8	O 6,7	S 13,5%
(238,35)	Gef. ,, 61,0	,, 7,7	,, 11,7	,, 7,1	,, 13,6%

Jodderivat 10 von Cyclosporin A (1). – Zu einer Lösung von 601 mg (0,5 mmol) **1** und 158 mg (0,6 mmol) Thallium(I)-acetat in 8 ml Chloroform wurden unter Rühren 127 mg (1 mmol) Jod in 8 ml Chloroform getropft. Der zunächst entstehende dunkelgrüne Niederschlag ging nach 3–4 Std. Rühren bei RT. in hellgelbes Thallium(I)-jodid über. Man filtrierte und dampfte das Filtrat ein. Der Rückstand (720 mg) wurde an Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 als Eluierungsmittel chromatographiert. Die DC.-einheitlichen Fraktionen (Polygram Sil-G, Chloroform/Methanol 96:4, Reagens *Dragendorff-Munier*) wurden vereinigt (515 mg) und aus Cyclohexan/Heptan 9:4 kristallisiert: farblose Stäbchen vom Smp. ca. 150° (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -229^\circ$ ($c = 0,8$, Chloroform). – IR.: sehr ähnlich wie Fig. 1; es fehlt die schwache Bande bei 970 (CH=CH (E)). – NMR.: Abwesenheit der Vinylprotonen; 1,9 (d , $J = 7$, 3H, H₃C–CHJ–). – MS.: 1327 (M^+), 1199 ($M^+ - HJ$), 1089 ($M^+ - C_7H_{11}JO$).

C ₆₂ H ₁₁₀ N ₁₁ O ₁₂	Ber. C 56,1	H 8,3	J 9,6	N 11,6	O 14,5%
(1328,53)	Gef. ,, 56,0	,, 8,6	,, 9,8	,, 11,5	,, 14,5%

Regenerierung von Cyclosporin A (1) aus dem Jodderivat 10. 1,328 g (1 mmol) Jodderivat **10** und 640 mg Zink (10 Äq.) wurden in 20 ml Essigsäure während 4 Std. bei RT. gerührt. Das Gemisch wurde mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert. Eindampfen der Ätherlösung lieferte 1,165 g amorphes Produkt, das aus Aceton 850 mg kristallisierte Cyclosporin A (**1**) ergab: Smp. 148–151°, $[\alpha]_D^{20} = -245^\circ$ ($c = 0,5$, Chloroform) und $[\alpha]_D^{20} = -189^\circ$ ($c = 0,5$, Methanol). Rf-Werte im DC., IR.- und NMR.-Spektrum sowie die biologischen Aktivitäten stimmten mit den entsprechenden Parametern eines Vergleichspräparates überein.

C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	Ber. C 61,9	H 9,3	N 12,8	O 16,0%
(1202,64)	Gef. ,, 62,1	,, 9,5	,, 13,1	,, 15,8%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *M. Dreyfuss, E. Hävri, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pache & H. Tschertter*, Europ. J. appl. Microbiology 1976 (im Druck).
- [2] *J. F. Borel, C. Feurer, H. U. Gubler & H. Stähelin*, Agents and Actions 6, Heft 4, im Druck (1976).
- [3] *S. Moore & W. H. Stein*, J. biol. Chemistry 192, 663 (1951).
- [4] *A. Darbre & A. Islam*, Biochem. J. 106, 923 (1968).
- [5] *A. Wehrli & E. Kovats*, Helv. 42, 2709 (1959).
- [6] *A. Closse & R. Huguenin*, Helv. 57, 553 (1974).
- [7] *P. Edman & A. Henschen*, Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Vol. 8, Protein Sequence Determination pp. 232, Springer Verlag, 1975.
- [8] *H. C. Beyerman, L. Maat, A. Sinnemar & A. von Veen*, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 87, 11 (1968).
- [9] *R. C. Cambie, R. C. Hayward, J. L. Roberts & P. S. Rulledge*, J. chem. Soc. Perkin I 1974, 1120, 1858.
- [10] *T. J. Petcher, H. P. Weber & A. Rügger*, Helv. 59 (1976), in print.
- [11] *P. Quitt, J. Hellerbach & K. Vogler*, Helv. 46, 327 (1963).
- [12] *V. M. Stepanov & V. F. Kriotsov*, Z. Obšč. Chim. 35, 53 (1965); *idem*, *ibid.* 35, 556 (1965).
- [13] *J. J. Pisano & T. L. Bronzert*, Analyt. Biochemistry 45, 43 (1972).