

122. Die Struktur von Cyclosporin C

von René Traber, Max Kuhn, Artur Rügger, Heinz Lichti,
Hans-Rudolf Loosli und Albert von Wartburg

Sandoz AG, Pharma Departement, Chemische Forschung, CH-4002 Basel

Herrn Prof. C. A. Grob zum 60. Geburtstag gewidmet

(23. III. 77)

The Structure of Cyclosporin C

Summary

The structure of cyclosporin C (**2**), a minor antifungal metabolite from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) RIFAI has been elucidated. Hydrolytic cleavage and spectroscopic evidence show that cyclosporin C is a neutral oligopeptide of 11 amino acids linked together in a 33-membered ring. Cyclosporin C (**2**) differs from the main metabolite cyclosporin A (**1**) [2] [4] only by containing L-threonine in the place of L- α -aminobutyric acid as has been shown by the conversion of **2** into **1**. ^{13}C -NMR. spectra and study of molecular models suggest that cyclosporin C (**2**) has the same molecular conformation as **1**, which is best described as a twisted β -pleated sheet held together in a conformationally stable form by intramolecular hydrogen bonding.

1. Einleitung. – Submerskulturen von *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) RIFAI produzieren ein Gemisch von antifungisch aktiven Metaboliten, aus denen sich die zwei Hauptkomponenten, Cyclosporin A und C, in einheitlicher, kristallisierter Form isolieren lassen [1] [2]. Die beiden chemisch nahe verwandten Stoffe bewirken in verschiedenen pharmakologischen Modellen eine starke Immunsuppression und erweisen sich bei der Freund-Adjuvans-Arthritis als entzündungshemmend [3]. Die Struktur des Cyclosporin A (**1**) konnte kürzlich durch spektroskopische und kristallographische Methoden sowie durch chemischen Abbau aufgeklärt werden. Der Metabolit stellt ein 33-gliedriges, neutrales Ringpeptid dar, das aus 11 z. T. N-methylierten Aminosäuren aufgebaut ist [2] [4]. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Strukturermittlung von Cyclosporin C.

2. Charakterisierung von Cyclosporin C (2**).** – Cyclosporin C kristallisiert aus Aceton in weissen prismatischen Nadeln vom Smp. 152–155°; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -182^\circ$ ($c=0,5$, Methanol). Der Metabolit ist gut löslich in Alkoholen, Äther, Aceton und chlorierten Kohlenwasserstoffen, hingegen nur wenig in Wasser und gesättigten Kohlenwasserstoffen. Cyclosporin C enthält weder basische noch saure Gruppen (Titration,

Elektrophorese). Im UV.-Spektrum ist Endabsorption gegen 200 nm festzustellen, im IR.-Spektrum dominiert eine breite und intensive Amidbande bei 1630–1670 cm^{-1} (Figur 1).

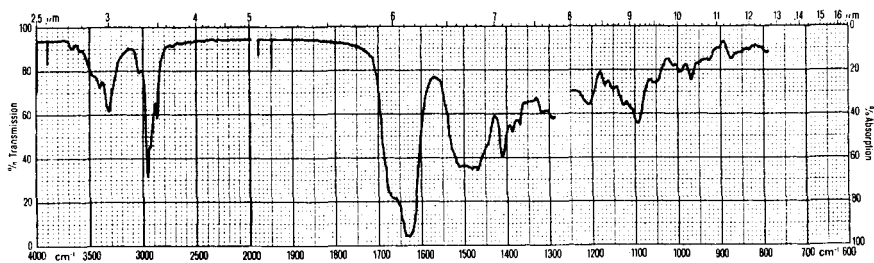


Fig. 1. IR.-Spektrum von Cyclosporin C in CH_2Cl_2

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Figur 2) sind Signale von vier CONH- (7,1–8,1 ppm) und sieben CONCH_3 -Gruppen (2,6–3,4 ppm) zu erkennen. Im Gebiet von 4,2–5,8 ppm treten die α -H-Atome von 11 Aminosäuren und die Protonen einer olefinischen Doppelbindung auf. Zwei mit D_2O austauschbare Signale bei 3,7 und 2,6 ppm entsprechen vermutlich zwei OH-Gruppen. Auf die Interpretation des $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrums wird in Abschnitt 5 eingegangen.

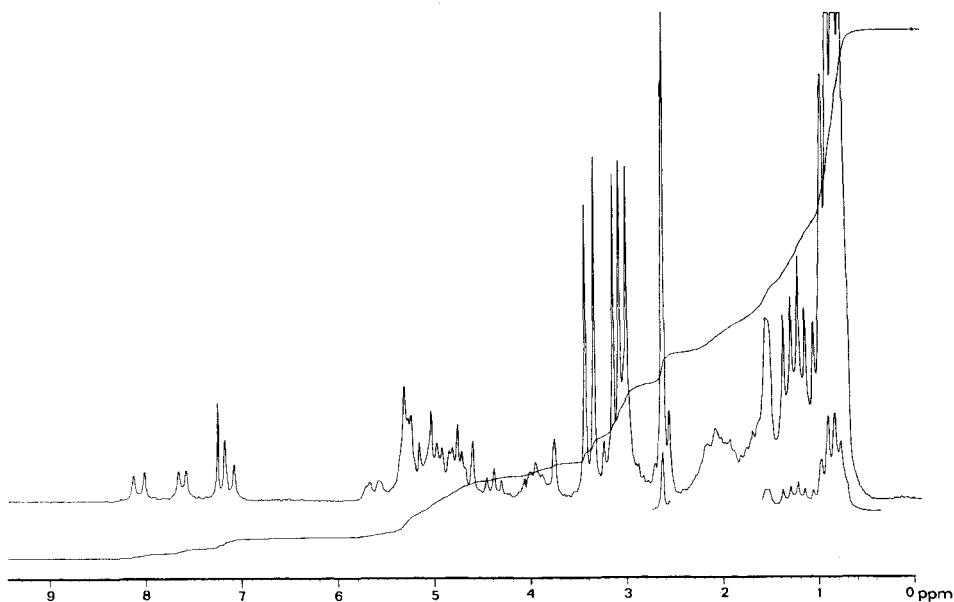


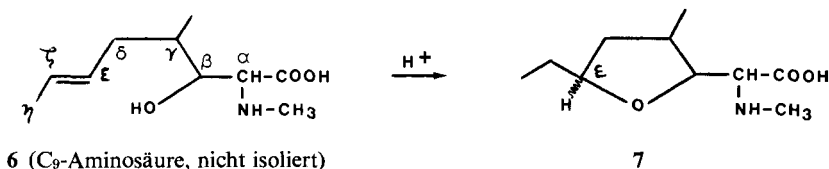
Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin C bei 90 MHz in CDCl_3 (TMS = 0 ppm)

Die olefinische Doppelbindung in **2** kann leicht hydriert werden, wobei unter Aufnahme von 1 mol H_2 die entsprechende Dihydroverbindung **3** entsteht. Für die Geometrie an der $\text{C}=\text{C}$ -Bindung ergeben sich aus dem IR.-Spektrum (Fig. 1) erste Anhaltspunkte: Die schwache, aber signifikante Bande bei 970 cm^{-1} deutet auf

(*E*)-Konfiguration. Von den beiden Hydroxylgruppen ist die eine leicht, die andere schwer acylierbar. So erhält man mit Acetanhydrid in Pyridin das Monoacetat **4**, mit Acetanhydrid und 4-Dimethylaminopyridin das Diacetat **5**.

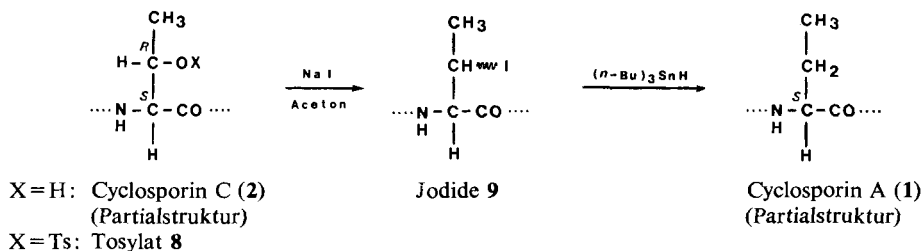
Im Massenspektrum von **2** erscheint der höchste Pik bei *m/e* 1217, d. h. 16 Einheiten höher als beim Cyclosporin A. Für Cyclosporin C ergibt sich folglich, in guter Übereinstimmung mit den Elementaranalysen, die um ein Sauerstoffatom reichere Bruttoformel $C_{62}H_{111}N_{11}O_{13}$. Ein weiterer charakteristischer Pik bei *m/e* 1173 (1217-44) entspricht der Abspaltung eines CH_3CHO -Fragmentes und könnte auf das Vorliegen einer Threonin-Einheit hindeuten.

3. Präparative Baustein-Analyse. – Cyclosporin C wird mit 6*N* HCl hydrolysiert und das Gemisch der erhaltenen Hydrochloride mittels eines schwach basischen Ionenaustauschers in die freien Aminosäuren übergeführt; Chromatographie an Cellulose ergibt folgende Bausteine: Gemisch der Aminosäuren **7**, *N*-Methyl-L-leucin (4 mol), *N*-Methyl-L-valin, L-Valin und eine Mischfraktion, die bei der Nachchromatographie an Kieselgel L-Threonin, D,L-Alanin (2 mol) und Sarkosin liefert. Bei den Aminosäuren **7** handelt es sich, wie früher beschrieben [2], um isomere Tetrahydrofuran-derivate, die durch säurekatalysierte Cyclisierung aus der ungesättigten C_9 -Aminosäure **6** entstehen.



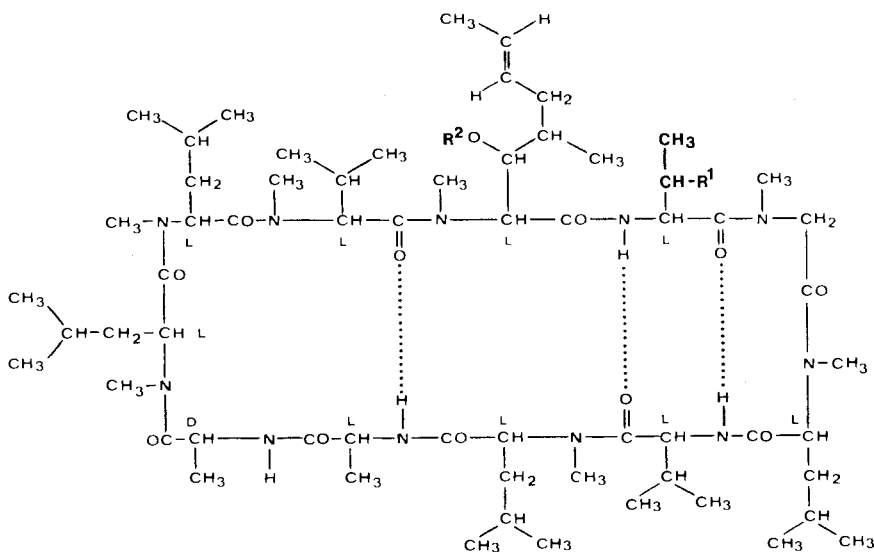
Die Hydrolyse bestätigt den aus den Spektren abgeleiteten Aufbau des Cyclosporin C aus 11 Aminosäureeinheiten und ermöglicht eine unabhängige Kontrolle der postulierten Bruttoformel. Cyclosporin C (**2**) unterscheidet sich demnach in seiner AS-Zusammensetzung von Cyclosporin A (**1**) nur durch das Vorliegen von L-Threonin anstelle von *L*- α -Aminobuttersäure. Die Vermutung, dass Cyclosporin C bis auf den abweichenden Baustein die gleiche Aminosäuresequenz wie Cyclosporin A aufweisen könnte, liegt nahe und wird durch chemische Verknüpfung der beiden Metabolite verifiziert.

4. Überführung von Cyclosporin C (2**) in Cyclosporin A (**1**).** – Die Umwandlung des in **2** vorliegenden L-Threonins in eine *L*- α -Aminobuttersäureeinheit erfolgt über die untenstehenden Reaktionsschritte:



Acylierung von Cyclosporin C mit Tosylchlorid in Pyridin führt zum Monotosylat **8**; die sterisch gehinderte OH-Gruppe der C₉-Aminosäure reagiert unter diesen Bedingungen nicht. Der Austausch der Tosylatgruppe von **8** wird mit Natriumjodid in Aceton vorgenommen. In mässiger Ausbeute entsteht dabei das Jodid **9** als Epimerengemisch, wie das ¹H-NMR.-Spektrum zeigt¹⁾. Die reduktive Entfernung des Jodatoms gelingt mit Tri-*n*-butylzinnhydrid in Benzol und liefert in *ca.* 40proz. Ausbeute einheitliches, aus Aceton kristallisierbares Cyclosporin A (**1**). Die Identifizierung erfolgt durch direkten Vergleich der physikalischen Daten und der biologischen Aktivitäten mit den entsprechenden Parametern des authentischen Metaboliten.

Mit der Verknüpfung der beiden Metabolite ist für Cyclosporin C Struktur **2** bewiesen.



- | | | |
|----------|--|--|
| 1 | R ¹ =R ² =H: | Cyclosporin A |
| 2 | R ¹ =OH; R ² =H: | Cyclosporin C |
| 4 | R ¹ =OAc; R ² =H: | (Cyclosporin C)-mono- <i>O</i> -acetat |
| 5 | R ¹ =OAc; R ² =Ac: | (Cyclosporin C)-di- <i>O</i> -acetat |

Aufgrund von Modellbetrachtungen dürfte der Ersatz der *L*- α -Aminobuttersäure durch *L*-Threonin beim Cyclosporin C (**2**) keine tiefgreifenden Konformationsänderungen bewirken. Die molekulare Konformation von **2** kann deshalb in Analogie zum Cyclosporin A (**1**) ebenfalls als β -Faltblattstruktur [4] wiedergegeben werden, die durch die eingezeichneten Protonenbrücken stabilisiert wird.

5. Vergleich der ¹³C-NMR.-Spektren von Cyclosporin C und Cyclosporin A. – Die ¹³C-NMR.-Spektren der Cyclosporine A (**1**) und C (**2**) differieren im wesentlichen durch die unterschiedliche Lage dreier *sp*³-Signale: Im Spektrum von **1** treten nämlich

¹⁾ Das Methylsignal der CH₃-CHJ-Gruppe erscheint als *d* × *d*. Bei kurzer Reaktionsdauer und niedriger Temperatur entsteht praktisch nur ein Isomeres. Nach längerer Reaktion bei höherer Temperatur bilden sich beide Diastereoisomeren im Verhältnis von *ca.* 1:1.

drei Resonanzen auf, die bei **2** fehlen und die demnach den α -, β - und γ -C-Atomen der L- α -Aminobuttersäure zuzuordnen sind (Tab. I). Basierend auf diese Zuordnung lassen sich die Lagen der Threonin-Kohlenstoffatome in Cyclosporin C mit Hilfe der Additivitätsregel für ^{13}C -chemische Verschiebungen von aliphatischen Verbindungen [5] abschätzen. Die resultierenden Werte stimmen mit den im Spektrum von Cyclosporin C bei tieferen Feldern auftretenden drei neuen Signalen gut überein (Tab. I).

Tabelle 1. ^{13}C -chemische Verschiebungen der α -Aminobuttersäure (α -Abu) in Cyclosporin A und des Threonins (Thr) in Cyclosporin C (22,63 MHz; CDCl_3 ; TMS=0 ppm)

C	Cyclosporin A α -Abu	Cyclosporin C Thr	Schätzung für Thr von Cyclosporin C
α	48,5 oder 48,7	51,3	ca. 52,9
β	24,8 oder 25,2	67,1	ca. 67,0
γ	9,8	17,6	ca. 18,8

Die restlichen Resonanzen im Spektrum von **2** sind gegenüber den entsprechenden Signalen bei **1** nur wenig beeinflusst. Die maximalen Abweichungen in den chemischen Verschiebungen betragen +1,4 ppm bzw. -0,33 ppm (Mittel 0 bis 0,3 ppm). Diese Feststellung bildet einen zusätzlichen Hinweis, dass die übrigen Strukturelemente des Cyclosporin C und ihre Sequenz mit den entsprechenden Merkmalen des Cyclosporin A übereinstimmen.

6. Isocyclosporin C (10). – Bei der chemischen Strukturermittlung von Cyclosporin A (**1**) bildet die charakteristische Umlagerungsreaktion zum basischen Isocyclosporin A die Voraussetzung für den *Edman*-Abbau [2]. Cyclosporin C (**2**) geht beim Erwärmen in Dioxan mit Methansulfonsäure ebenfalls in ein basisches, isomeres Produkt (**10**) über (MS. *m/e* 1217). Im UV.-Spektrum von **10** ist nur Endabsorption zu beobachten; im IR.-Spektrum erscheint neben der dominierenden Amidbande bei 1630 bis 1670 cm^{-1} eine neue Bande bei 1735 cm^{-1} , die einer Estergruppe zuzuordnen ist.

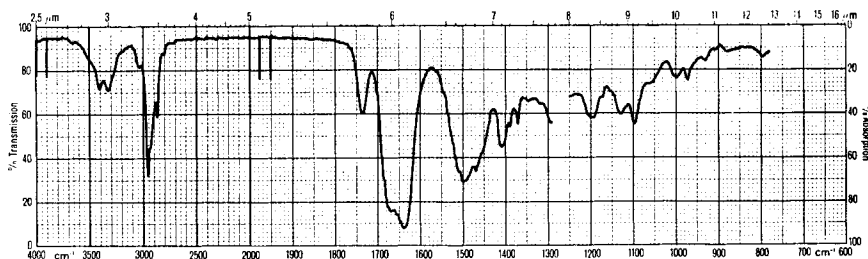
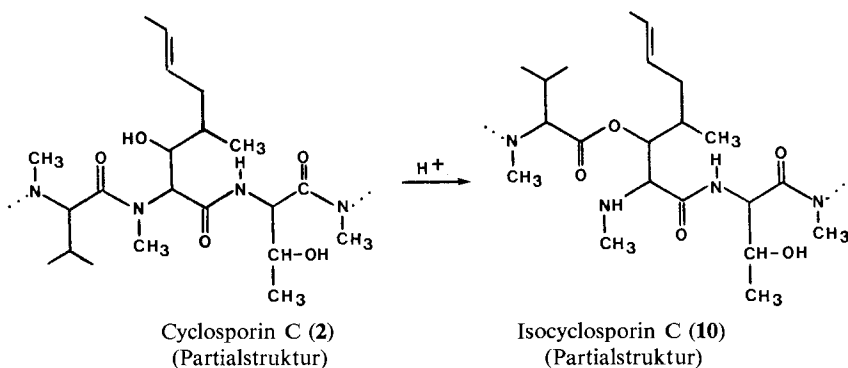


Fig. 3. IR.-Spektrum von Isocyclosporin C (**10**) in CH_2Cl_2

Im ^1H -NMR.-Spektrum von **10** sind bei 2,3 ppm das Multiplett einer NHCH_3 -Gruppe und zwischen 2,7 und 3,2 ppm die Signale von 6 CO-NCH_3 -Gruppen zu erkennen. Das Signal des intakten Strukturelements $\text{CH}_3\text{-CH=CH-}$ erscheint als Dublett bei 1,6 ppm.

Der basische Charakter der Isoverbindung **10** geht sowohl aus der Mikrotitration ($\text{p}K_{\text{MCS}} = 5,01$) als auch aus dem Verhalten bei der Elektrophorese hervor. Diese

Befunde sprechen für eine analoge *N,O*-Acylwanderung wie beim Cyclosporin A, d.h. der *N*-Methyl-L-valylrest in **2** wandert von der Methylaminogruppe unter Ring-erweiterung an die benachbarte sekundäre OH-Gruppe der C₉-Aminosäure.



Gegen eine denkbare Wanderung des C₉-Aminosäurerests an die OH-Gruppe des Threonins spricht der im Massenspektrum von **10** auftretende Pik bei *m/e* 1173 (1217-44). Die Abspaltung des Fragments 44 (CH₃CHO) deutet auf das Vorliegen einer intakten Threonin-Einheit²⁾.

Experimenteller Teil

Allgemeines: Siehe [2]. Zur Säulenchromatographie diente Kieselgel (Merck, Korngrösse 0,063 bis 0,2 mm). Dünnschichtchromatographie erfolgte, wenn nicht anders angegeben, auf Polygram Sil G-Folien (Macherey-Nagel & Co.); Detektion mit Jod oder Dragendorff-Reagens.

Cyclosporin C (2). Die Isolierung von amorphem Cyclosporin C erfolgte wie in [2] beschrieben; aus Aceton bei -15° farblose, prismatische Nadeln vom Smp. $152-155^\circ$; $[\alpha]_D^{20} = -255^\circ$ ($c=0,5$, Chloroform); $[\alpha]_D^{20} = -182^\circ$ ($c=0,5$, Methanol). – DC.: Rf-Werte: 0,23 (Chloroform/Methanol 94:6), 0,49 (Chloroform/Methanol/Essigsäure 90:6:4). – UV.: Endabsorption gegen 200 nm. – IR. (Fig. 1): 1630–1670 (Amid), 970 (CH=CH *trans*). – ¹H-NMR. (Fig. 2): 8,1 (*d*, 1 H, CONH); 7,6 (*d*, 1 H, CONH); 7,2 (*d*, 1 H, CONH); 7,1 (*d*, 1 H, CONH); 4,2–5,8 (*m*, ca. 13 H, H-C(α) der AS. 1 bis 11, H-C(ϵ) und H-C(ζ) der C₉-AS.); 3,8–4,1 (*m*, 2 H, H-C(β) von Thr, H-C(β) der C₉-AS.); 3,7 (*s*, 1 H, OH der C₉-AS.); 3,4 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,3 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,15 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,1 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,0 (*s*, 3 H, CONCH₃); 2,6 (*s*, 6 H, CONCH₃); 2,58 (*s*, 1 H, OH von Thr); 0,6–2,6 (*m*, ca. 70H); 1,55 (*m*, 3 H, H-C(η) der C₉-AS.); 1,35 (*d*, 3 H, H-C(β) von Ala); 1,2 (*d*, 3 H, H-C(β) von Ala). – ¹³C-NMR. s. Tabelle 2. – MS. (*m/e*): 1217 (*M*⁺), 1199 (*M*⁺–H₂O), 1181 (*M*⁺–2 H₂O), 1173 (*M*⁺–44, CH₃CHO aus Thr).

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 C (3). Zu einer Suspension von 30 mg vorhydriertem Pd/C in 3 ml abs. Äthanol wurden 610 mg (0,5 mmol) Cyclosporin C (**2**) in 10 ml Äthanol gegeben und bis zur beendeten Wasserstoffaufnahme hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde die Lösung eingedampft und der Rückstand an 100 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 chromatographiert: 530 mg einheitliches amorphes **3**; aus der 2,5fachen Menge Aceton bei -15° feine Nadelchen vom Smp. $160-163^\circ$; $[\alpha]_D^{20} = -246^\circ$ ($c=0,52$, Chloroform); $[\alpha]_D^{20} = -173^\circ$ ($c=0,61$, Methanol). – DC.: Rf = 0,23

²⁾ Im Massenspektrum des Mono-*O*-acetyl-cyclosporin C (**4**) tritt dieses Fragment nicht auf, hingegen ist durch den Pik bei *m/e* 1181 die Eliminierung von Essigsäure sichtbar.

Tabelle 2. ^{13}C -NMR.-Spektrum von Cyclosporin C (2) bei 22,63 MHz in CDCl_3 ; TMS=0 ppm

δ (ppm)	rel. Intensität geschätzt	Aufspaltung off-resonance	δ (ppm)	rel. Intensität geschätzt
173,22	1	s	40,6	1
172,96	1	s	39,1	2
172,84	1	s	37,2	1
172,60	1	s	35,9	1
170,69	1	s	35,1	1
170,59	1	s	34,7	1
170,14	1	s	33,2	1
170,01	1	s	31,7	1
169,98	1	s	31,2	1
169,62	1	s	31,0	1
169,21	1	s	29,7	2
129,0	1	d	29,5	1
125,9	1	d	28,8	1
73,9	1	d	24,9	1
67,1	1	d	24,7	1
58,8	1	d	24,5	1
57,9	1	d	24,4	1
57,2	1	d	23,6	2
55,1	1	d	23,5	1
54,5	2	d	23,2	2
51,3	1	d	21,6	2
49,8	1	t	21,2	1
48,6	1	d	19,9	1
48,1	1	d	19,0	1
45,0	1	d	18,7	1
			18,5	1
			18,4	1
			17,8	1
			17,6	1
			16,7	1
			15,8	1

(Chloroform/Methanol 94:6), 0,49 (Chloroform/Methanol/Essigsäure 90:6:4). – UV.: Endabsorption gegen 200 nm. – IR.: wie 2, hingegen fehlt Bande bei 970 cm^{-1} ($\text{CH}=\text{CH}$). – ^1H -NMR.: Abwesenheit der Signale bei 5,3 (*m*, 2H, H-C(ϵ)) und H-C(ζ) der C_9 -AS.) und 1,6 (*m*, 3H, H-C(η)) der C_9 -AS.).

$\text{C}_{82}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$ Ber. C 61,0 H 9,3 N 12,6 O 17,0%
 (1220,65) Gef. „ 61,0 „ 9,4 „ 12,7 „ 17,1%

(Cyclosporin C)-monoacetat (4). 1,22 g (1 mmol) 2 wurden mit 409 mg (4 mmol) Acetanhydrid in 10 ml abs. Pyridin während 24 Std. bei RT. gerührt. Anschliessend wurde mit Wasser versetzt, mit Äther extrahiert, die Ätherphase mit 0,5N HCl und Wasser gewaschen und das Rohprodukt an 100 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 chromatographiert. Kristallisation der DC.-einheitlichen Fraktionen (760 mg) aus 4 ml Äther ergab 560 mg 4; Smp. 190 – 192° ; $[\alpha]_D^{20} = -230^\circ$ ($c=0,5$, Chloroform). – IR.: 1735 und 1240 (Acetat). – ^1H -NMR.: 1,85 (*s*, 3H, CH_3COO); 3,8 (*m*, 1H, H-C(β)) der C_9 -AS.); Abwesend: 3,9 (*m*, 1H, H-C(β)) von Thr). – MS. (*m/e*): 1259 (M^+), 1241 ($M^+ - \text{H}_2\text{O}$), 1181 ($M^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$).

$\text{C}_{84}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{14}$ Ber. C 61,0 H 9,0 N 12,2 O 17,8%
 (1260,671) Gef. „ 60,8 „ 9,1 „ 12,4 „ 18,1%

(Cyclosporin C)-diacetat (5). 12,18 g (10 mmol) **2** und 2,93 g (24 mmol) 4-Dimethylaminopyridin wurden in 160 ml Acetanhydrid während 4 Std. bei 22° gerührt. Das nach Aufarbeitung (wie bei **4**) erhaltene Rohprodukt wurde an 1,2 kg Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 gereinigt; anschliessende Chromatographie der Spitzenfraktionen an Kieselgel mit Äther/Methanol 96:4 lieferte 8,26 g (63%) **5** als amorphe, farblose Pulver. Smp. 157–159°; $[\alpha]_D^{20} = -275^\circ$ ($c=0,5$, Chloroform). – IR.: 1735 und 1240 (Acetat). – $^1\text{H-NMR.}$: 1,95 (*s*, 3H, CH_3COO); 2,0 (*s*, 3H, CH_3COO); Abwesend: 3,9 (*m*, 2H, H-C(β) der C_9 -AS. und H-C(β) von Thr). – MS. (*m/e*): 1301 (M^+), 1241 ($M^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$), 1181 ($M^+ - 2\text{CH}_3\text{COOH}$).

$\text{C}_{66}\text{H}_{115}\text{N}_{11}\text{O}_{15}$	Ber. C 60,9	H 8,9	N 11,8	O 18,4%
(1302,708)	Gef. ,, 61,0	,, 9,1	,, 11,7	,, 18,4%

Hydrolyse von 2; Isolierung der freien Aminosäuren. 5,0 g Cyclosporin C (**2**) wurden in 150 ml 6N HCl 20 Std. unter Rückfluss erwärmt. Der nach Eindampfen erhaltene Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst, durch eine schwach basische Ionenaustauschersäule (DOWEX AG 3-X4, in der Acetatform) filtriert und so lange mit Wasser nachgewaschen, bis das Filtrat Ninhydrin-negativ war. Nach Eindampfen des Eluats wurde das rohe Aminosäuregemisch (5,6 g) an 1,2 kg Cellulosepulver (Avice1 PH 101) mit zu 95% wassergesättigtem 2-Butanol chromatographiert (46 Fraktionen zu 300 ml; DC.: Fertigplatten «Polygram Cel 400», Flm.: Propanol/Wasser 4:1, Detektion: Ninhydrin-Spray). Zur Identifizierung wurden die einzelnen Aminosäuren kristallisiert und mit authentischen Präparaten verglichen (Smp., opt. Drehung, IR.- und $^1\text{H-NMR.}$ -Spektren). Resultat: Fr. 1–11: verworfen; Fr. 12–13: 307 mg C_9 -Aminosäure als Artefakt **7** (aus Methanol farblose Nadeln vom Smp. 249–251° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -24,5^\circ$ ($c=1,0$, Wasser), vgl. [2]); Fr. 14–16: 2409 mg *N*-Methyl-L-leucin; Fr. 17: 70 mg Gemisch aus *N*-Methyl-L-leucin und *N*-Methyl-L-valin; Fr. 18–19: 371 mg *N*-Methyl-L-valin; Fr. 20–22: 520 mg L-Valin; Fr. 23–26: 76 mg Gemisch aus L-Valin und Alanin; Fr. 27–46: 1386 mg Gemisch aus L-Threonin, Alanin und Sarkosin.

Die Fraktionen 27–46 wurden an 1 kg Kieselgel mit Aceton/Wasser als Eluierungsmittel nachchromatographiert, wobei 10 Fr. à 500 ml mit Aceton/Wasser 9:1, 20 Fr. mit 8:2 und 10 Fr. mit 7:3 gesammelt wurden. Nach Vereinigen der DC.-einheitlichen Fraktionen (Aceton/Wasser 3:1, Ninhydrin-Spray) wurden erhalten: 335 mg L-Threonin; aus Wasser/Methanol Kristalle vom Smp. 253–255°; $[\alpha]_D^{20} = -27,7^\circ$ ($c=1,0$, Wasser);

$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	Ber. C 40,3	H 7,6	N 11,8	O 40,3%
(119,12)	Gef. ,, 40,2	,, 7,7	,, 11,7	,, 39,6%

626 mg D,L-Alanin ($[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$, $c=2,0$, Wasser) und 218 mg Sarkosin.

Überführung von Cyclosporin C (2) in Cyclosporin A (1). (Cyclosporin C)-tosylat (**8**). 12,20 g (10 mmol) Cyclosporin C (**2**) wurden mit 7,64 g (40 mmol) *p*-Toluolsulfonylchlorid in 100 ml abs. Pyridin 72 Std. bei RT. gerührt. Nach Zugabe von 20 ml Wasser wurde mit Äther extrahiert und das Rohprodukt an 2 kg Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 chromatographiert. Die einheitlichen Fraktionen wurden in 54 ml Äther/Aceton 5:1 gelöst und anschliessend mit Petroläther (35–40°) gefällt: 6,64 g (48%) Tosylat **8** vom Smp. 160–162°; $[\alpha]_D^{20} = -180^\circ$ ($c=0,54$, Chloroform). – IR.: 1180 und 1190 (R-OTs). – $^1\text{H-NMR.}$: 7,7 und 7,2 ($AA'BB'$ -System, 4H, arom.H von Tosylat); 3,9 (*m*, 2H, OH und H-C(β) der C_9 -AS.); 2,35 (*s*, 3H, CH_3 von Tosylat); Abwesend: 3,9 (*m*, 1H, H-C(β) von Thr).

$\text{C}_{69}\text{H}_{117}\text{N}_{11}\text{O}_{15}\text{S}$	Ber. C 60,4	H 8,6	N 11,2	O 17,5	S 2,3%
(1372,821)	Gef. ,, 60,5	,, 8,7	,, 10,9	,, 17,7	,, 2,5%

Gemisch der epimeren Jodide (9). 6,76 g (4,92 mmol) Tosylat **8** wurden mit 7,50 g (50 mmol) Natriumjodid in 60 ml Aceton $3\frac{1}{2}$ Std. unter Rückfluss erwärmt. Nach Versetzen mit Wasser wurde mit Äther extrahiert, die Ätherphase mit 0,001N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gewaschen und der Eindampfrückstand an 1 kg Kieselgel mit Äther/Methanol 95:5 chromatographiert: 1,65 g DC.-einheitliches Produkt, nach Fällung aus Äther/Petroläther 1:7 1,33 g (21%) Jodid **9** (als Epimerengemisch). Smp. 157–160°; $[\alpha]_D^{20} = -204,5^\circ$ ($c=0,60$, Chloroform). – $^1\text{H-NMR.}$: 1,8 und 1,9 (je *d*, 3H, $\text{CH}_3\text{-CHJ}$). – MS. (*m/e*): Höchster Pik 1181 = 1327-146 (Eliminierung von H_2O und HJ), 128 (HJ⁺), 127 (J⁺).

$\text{C}_{62}\text{H}_{110}\text{JN}_{11}\text{O}_{12}$	Ber. C 56,1	H 8,3	J 9,6	N 11,6	O 14,5%
(1328,531)	Gef. ,, 56,0	,, 8,4	,, 9,3	,, 11,6	,, 14,4%

Reduktion des Jodids 9. 665 mg (0,5 mmol) Jodid **9** und 0,60 ml (2,0 mmol) Tri-*n*-butylzinnhydrid wurden in 10 ml abs. Benzol unter trockenem Stickstoff 2½ Std. bei RT. gerührt. Die farblose Lösung wurde mit Wasser versetzt, mit Äther extrahiert und der nach Eindampfen erhaltene Rückstand an 120 g Kieselgel gereinigt. Eluierung mit Essigester/Methanol 98:2 lieferte 240 mg (40%) DC.-einheitliches Cyclosporin A (**1**); nach Kristallisation aus Aceton 171 mg (29%) farblose Prismen vom Smp. 148–151° (Misch-Smp.: keine Depression); $[\alpha]_D^{20} = -245^\circ$ ($c=0,51$, Chloroform); $[\alpha]_D^{20} = -189^\circ$ ($c=0,52$, Methanol). Das Präparat stimmte in den Rf-Werten (Chloroform/Methanol 96:4, Chloroform/Aceton 1:1, Aceton/Hexan 1:1, Äther/Methanol 9:1, Essigester/Methanol 96:4), im IR.- und ¹H-NMR.-Spektrum sowie in der antimikrobiellen Aktivität [1] mit den entsprechenden Daten eines authentischen Vergleichspräparates überein.

C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	Ber. C 61,9	H 9,3	N 12,8	O 16,0%
(1202,635)	Gef. „ 61,6	„ 9,5	„ 13,0	„ 16,1%

Isocyclosporin C (10). 30,48 g (25 mmol) Cyclosporin C (**2**) und 6,00 g (62,5 mmol) Methansulfonsäure wurden in 300 ml abs. Dioxan 16 Std. unter Feuchtigkeitsausschluss auf 50° erwärmt. Nach Abkühlen auf 20° wurde 5,64 g Natriumacetat zugegeben, das abgeschiedene Salz abfiltriert und das farblose Filtrat eingedampft. Das Rohprodukt (34,1 g) wurde an 3 kg Kieselgel mit Chloroform/Methanol 97,5:2,5 chromatographiert. Die DC.-einheitlichen Fraktionen (Chloroform/Methanol/Essigsäure 90:6:4) ergaben nach Fällung aus 75 ml Äther/450 ml Petroläther 15,0 g (49%) Isocyclosporin C (**10**); Smp. 152–155°; $[\alpha]_D^{20} = -178^\circ$ ($c=0,52$, Chloroform). – DC.: Rf: 0,16 (Chloroform/Methanol/Essigsäure 90:6:4). – UV.: Endabsorption. – IR. (Fig. 3): 1735 (Ester), 1630–1670 (Amid). – ¹H-NMR.: 6,5–8,2 (*m*, 4H, 4CONH); 2,7–3,2 (*m*, 18H, 6CONCH₃) 2,3 (*m*, 3H, N–CH₃); 1,6 (*d*, 3H, H–C(η) der C₉–AS.). – MS. (*m/e*): 1217 (*M*⁺), 1199 (*M*⁺–H₂O), 1173 (*M*⁺–44, CH₃CHO aus Threonin).

C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₃	Ber. C 61,1	H 9,2	N 12,6	O 17,1%
(1218,63)	Gef. „ 60,9	„ 9,1	„ 12,3	„ 17,2%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Dreyfuss, E. Härri, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pache & H. Tschertter, European J. appl. Microbiol. 3, 125 (1976).
- [2] A. Rügger, M. Kuhn, H. Lichti, H. R. Loosli, R. Huguenin, Ch. Quiquerez & A. von Wartburg, Helv. 59, 1075 (1976).
- [3] J. F. Borel, C. Feurer, H. U. Gubler & H. Stähelin, Agents and Actions 6, 468 (1976).
- [4] T. J. Petcher, H. P. Weber & A. Rügger, Helv. 59, 1480 (1976).
- [5] T. Clerc, E. Pretsch & S. Sternhell, Methoden der Analyse in der Chemie, Bd. 16 (Akadem. Verlagsgesellschaft Frankfurt 1973).