

## 158. Neue Cyclopeptide aus *Trichoderma polysporum* (LINK EX PERS.) RIFAI: die Cyclosporine B, D und E

von René Traber, Max Kuhn, Hans-Rudolf Loosli, Walter Pache und Albert von Wartburg

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

Herrn Prof. T. Reichstein zum 80. Geburtstag gewidmet

(3.V.77)

---

New Cyclopeptides from *Trichoderma polysporum* (LINK EX PERS.) RIFAI: Cyclosporins B, D and E

### Summary

Cyclosporins represent a new group of biologically active metabolites produced by *Trichoderma polysporum* (LINK EX PERS.) RIFAI and other fungi imperfecti. The structures of the main components, cyclosporins A (1) and C (3) have been determined as neutral cyclic oligopeptides composed of 11 amino acids, among them a new C<sub>9</sub>-amino acid [2-4]. In addition, three minor metabolites, cyclosporins B, D and E, have now been isolated and characterized. Chemical investigation, spectroscopic evidence and X-ray analysis led to the structural formulae of cyclosporins B (2) and D (4). Both compounds have the same sequence of amino acids as cyclosporin A (1), with the exception of L- $\alpha$ -aminobutyric acid, replaced in cyclosporin B (2) by L-alanine and in cyclosporin D (4) by L-valine, respectively. Cyclosporins undergo a characteristic intramolecular N,O-acyl migration to furnish the corresponding basic isocompounds. The antifungal activities of cyclosporins are reported.

---

**1. Einleitung.** - Die Cyclosporine bilden eine neue Gruppe biologisch aktiver Stoffwechselprodukte, die aus niederen Pilzen (*fungi imperfecti*), wie *Trichoderma polysporum* (LINK EX PERS.) RIFAI und *Cylindrocarpon lucidum* BOOTH, isoliert wurden [1] [2]. Strukturell handelt es sich bei diesen Metaboliten um cyclische Polypeptide aus 11 z.T. N-methylierten Aminosäuren, darunter eine charakteristische, ungesättigte C<sub>9</sub>-Aminosäure. Konstitution und Absolutkonfiguration der beiden Hauptkomponenten Cyclosporin A und C wurden kürzlich durch chemischen Abbau und mit Hilfe spektroskopischer und kristallographischer Methoden aufgeklärt [2-4].

Zur Gewinnung der Cyclosporine werden Kulturbrühen von *T. polysporum* mit Butylacetat ausgerührt und der erhaltene Rohextrakt chromatographisch zerlegt. Neben den Cyclosporinen A, B und C konnten wir nun aus dem Antibiotika-Komplex zwei weitere Metabolite, die Cyclosporine D und E isolieren. Die Kontrolle der Trennprozesse und die Reinheitsprüfung der einzelnen Komponenten erfolgten

mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten, die eine sichere Identifizierung der fünf Cyclosporine ermöglicht (siehe *Tabelle 1*).

In den folgenden Untersuchungen werden die Nebenmetabolite B, D und E charakterisiert; für die Cyclosporine B und D liessen sich zudem Strukturvorschläge ableiten, die sich später bei der Röntgenstrukturanalyse jodhaltiger Derivate als richtig erwiesen.

**2. Charakterisierung der Cyclosporine B, D und E.** - Die neuen Cyclosporine D (**4**) und E (**5**) kristallisieren aus Aceton bzw. Äther; Cyclosporin B (**2**) wurde bis jetzt nur in amorpher Form erhalten. Die Schmelzpunkte und Drehwerte sind in *Tabelle 1* angegeben. Die Löslichkeit der drei Metabolite ist in Wasser und gesättigten Kohlenwasserstoffen gering, gut dagegen in Alkoholen, Äther, Aceton und chlorierten Kohlenwasserstoffen. Basische oder saure Gruppen liegen in keiner Komponente vor (Mikrotitration, Elektrophorese). Die UV.-Spektren in Methanol weisen lediglich Endabsorption gegen 200 nm auf. In der IR.-Absorption stimmen **2** und **4** weitgehend überein (*Fig. 1 und 2*); beide Spektren werden von einer breiten und intensiven Amidbande bei 1630–1670  $\text{cm}^{-1}$  dominiert. Beim Cyclosporin E (**5**) hingegen zeigt die Amidbande signifikante Unterschiede<sup>1)</sup>.

Die <sup>1</sup>H-NMR.-Spektren der Cyclosporine B und D (*Fig. 3 und 4*) zeigen Signale von 4 CONH- (7,1–8,1 ppm) und 7 CONCH<sub>3</sub>-Gruppen (2,7–3,6 ppm). Im Bereich von 4,3–5,8 ppm sind die H( $\alpha$ )-Atome von 11 Aminosäuren und zwei Protonen einer olefinischen Doppelbindung zu erkennen. Das Signal eines mit D<sub>2</sub>O austauschbaren Protons bei 3,8–3,9 ppm entspricht einer OH-Gruppe.

Die in den beiden Metaboliten nachgewiesene C,C-Doppelbindung, der aufgrund der signifikanten IR.-Bande bei 970  $\text{cm}^{-1}$  (*Fig. 1 und 2*) die (*E*)-Konfiguration zukommen dürfte, ist leicht hydrierbar: unter Aufnahme von 1 mol H<sub>2</sub> geht **2** in Dihydrocyclosporin B (**6**) und **4** in Dihydrocyclosporin D (**7**) über. Im Massenspektrum von Cyclosporin B (**2**) erscheint der Molekularpik bei *m/e* 1187 und ein aus-

Tabelle 1. *Rf*-Werte, Schmelzpunkte und optische Drehungen der Cyclosporine<sup>a)</sup>

Metabolit	<i>Rf</i> -Werte <sup>b)</sup>	Smp.	$[\alpha]_D^{20}$ in CH <sub>3</sub> OH	$[\alpha]_D^{20}$ in CHCl <sub>3</sub>
Cyclosporin A ( <b>1</b> ) C <sub>62</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	0,42	148–151°	– 189°	– 244°
Cyclosporin B ( <b>2</b> ) C <sub>61</sub> H <sub>109</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	0,25	149–152°	– 168°	– 238°
Cyclosporin C ( <b>3</b> ) C <sub>62</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub>	0,16	152–155°	– 182°	– 255°
Cyclosporin D ( <b>4</b> ) C <sub>63</sub> H <sub>113</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	0,59	148–151°	– 211°	– 245°
Cyclosporin E ( <b>5</b> ) C <sub>61</sub> H <sub>109</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	0,32	149–152°	– 186°	– 179°

a) Für Einzelheiten siehe exper. Teil.

b) Kieselgel-Fertigplatten «Merck». Flm.: 3mal mit Essigsäureäthylester chromatographiert.  
Det.: Joddampf.

1) Über die Strukturermittlung von Cyclosporin E werden wir später berichten.

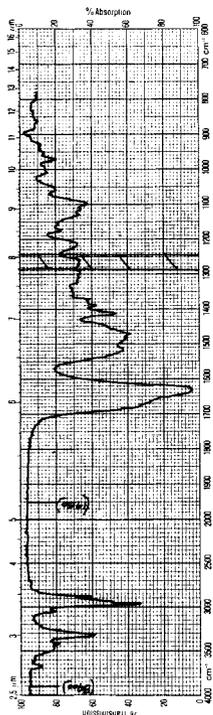


Fig. 2. IR.-Spektrum von Cyclosporin D in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

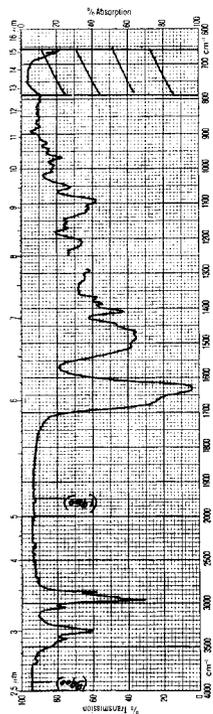


Fig. 1. IR.-Spektrum von Cyclosporin B in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

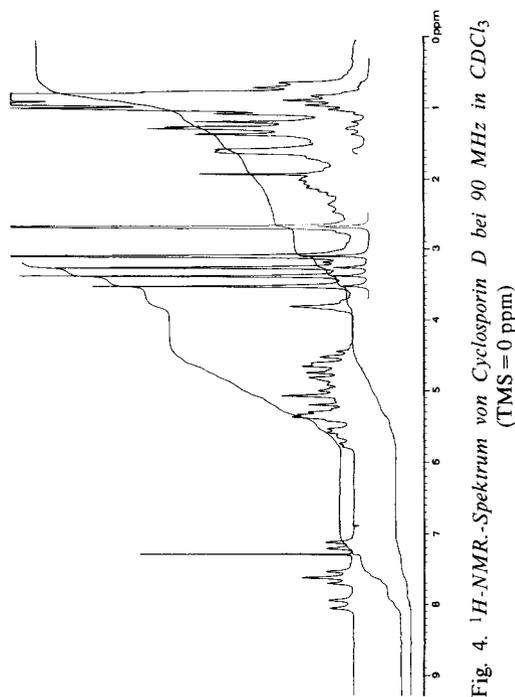


Fig. 4.  $^1\text{H}$ -NMR.-Spektrum von Cyclosporin D bei 90 MHz in  $\text{CDCl}_3$  (TMS = 0 ppm)

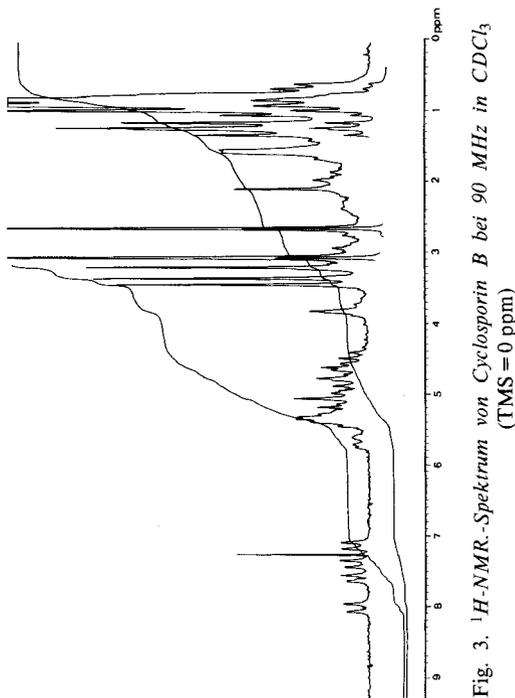


Fig. 3.  $^1\text{H}$ -NMR.-Spektrum von Cyclosporin B bei 90 MHz in  $\text{CDCl}_3$  (TMS = 0 ppm)

geprägter Fragmentpik bei  $m/e$  1169, der durch Eliminierung von Wasser bedingt ist; bei Cyclosporin D (**4**) tritt der Molekularpik bei  $m/e$  1215 auf, ebenfalls begleitet von einem durch Wasserabspaltung entstandenen Fragmentpik ( $m/e$  1197). Aus den resultierenden Bruttoformeln (Tab. 1), die mit den Elementaranalysen in Einklang stehen, geht hervor, dass Cyclosporin B (**2**) eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe weniger enthält als Cyclosporin A (**1**), Cyclosporin D (**4**) dagegen eine  $\text{CH}_2$ -Einheit mehr. Die Fragmentierungsmuster der beiden Nebenmetabolite B (**2**) und D (**4**) stimmen weitgehend mit dem MS. von Cyclosporin A (**1**) überein, wobei das Auftreten von entsprechenden, homologen Fragmenten (Massendifferenz  $\pm 14$ ) die nahe strukturelle Verwandtschaft der Cyclosporine A (**1**), B (**2**) und D (**4**) unterstreicht.

**3. Orientierende Aminosäureanalysen.** - Die Cyclosporine B (**2**) und D (**4**) wurden mit 6N HCl bei  $115^\circ$  hydrolysiert. Die unter den Spaltprodukten identifizierten Aminosäuren sind (in molaren Verhältnissen) in Tab. 2 angegeben:

Tabelle 2. Analyse der Hydrolyseprodukte nach Moore &amp; Stein [5]

Aminosäure	Cyclosporin B ( <b>2</b> )		Cyclosporin D ( <b>4</b> )		Cyclosporin A ( <b>1</b> )	
	gef.	theor.	gef.	theor.	gef.	theor.
Sarkosin	0,64	1	0,39	1	0,46	1
Alanin	2,99	3	1,99	2	2,07	2
$\alpha$ -Aminobuttersäure	-	-	-	-	0,81	1
Valin	1,04	1	2,01	2	1,05	1

*N*-methylierte Aminosäuren werden wegen ihrer schwachen Farbreaktion mit Ninhydrin nicht erfasst mit Ausnahme von Sarkosin, das aber erfahrungsgemäss schwankende Werte liefert.

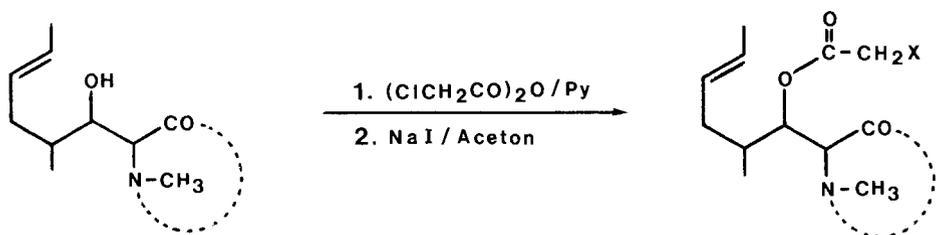
Aus den Resultaten der Aminosäureanalyse gehen folgende strukturelle Unterschiede zwischen den drei Metaboliten hervor: Im Cyclosporin B (**2**) ist die im Cyclosporin A (**1**) vorliegende  $\alpha$ -Aminobuttersäure durch Alanin, im Cyclosporin D (**4**) durch Valin ersetzt. Die Ähnlichkeit der Fragmentierungsmuster der Massenspektren und die Unterschiede in den Summenformeln um je eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe passen zu diesem Befund.

**4.  $^{13}\text{C}$ -NMR.-Spektren.** - Die  $^{13}\text{C}$ -NMR.-Spektren der Cyclosporine A und B zeigen nur bei drei Signalen von  $\text{sp}^3$ -Kohlenstoffatomen Unterschiede. Im Spektrum von Cyclosporin B fehlt das Signal bei 9,8 ppm, das in Cyclosporin A dem terminalen C-Atom ( $\text{C}_\gamma$ ) der  $\alpha$ -Aminobuttersäure zugeordnet wurde [4]. Die Verschiebung der  $\text{C}_\beta$ - und  $\text{C}_\alpha$ -Signale von 24,8 nach 17,7 ppm bzw. von 48,5 (oder 48,7) nach 42,9 ppm ist mit dem Verlust des  $\gamma$ -Kohlenstoffatoms zu erklären.

Die im Spektrum von Cyclosporin D auftretenden zwei neuen Signale bei 18,1 und 19,2 ppm (anstelle des fehlenden Signals bei 9,8 ppm) und die Verschiebung der  $\text{C}_\beta$ - und  $\text{C}_\alpha$ -Signale von 24,8 nach 29,7 bzw. von 48,5 (oder 48,7) nach 53,8 ppm entsprechen dem Ersatz der  $\alpha$ -Aminobuttersäure durch Valin (vgl. [6]). Die restlichen Resonanzen in den Spektren von **2** und **4** weisen gegenüber den entsprechenden Signalen von **1** nur sehr geringfügige Abweichungen auf (s. exper. Teil).

**5. Derivate zur Röntgenstrukturanalyse.** - Obwohl die bis jetzt erhaltenen experimentellen Unterlagen Strukturvorschläge für die Cyclosporine B und D erlauben, fehlen eine sichere Identifizierung der vorliegenden N-methylierten Aminosäuren und der Beweis für die jeweils postulierten Sequenzen und Konfigurationen. Die chemische Verknüpfung mit Cyclosporin A (**1**), wie im Falle des Cyclosporins C (**3**) [4], erscheint bei den Cyclosporinen B und D schwer realisierbar; als Alternativen bleiben der aufwendige, modifizierte *Edman*-Abbau [2] der noch zu besprechenden Isoverbindungen **13** und **15** oder die im folgenden beschriebene Herstellung von Derivaten mit Schweratom für die Röntgenstrukturanalyse.

5.1. *Cyclosporin-B-jodacetat (10)*. Die Cyclosporine A und C enthalten eine ungesättigte, hydroxylierte C<sub>9</sub>-Aminosäure [2-4], die aufgrund der spektralanalytischen Daten auch in den Cyclosporinen B (**2**) und D (**4**) vorkommt. Die sterisch gehinderte, sekundäre OH-Gruppe dieser Aminosäure kann mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von 4-Dimethylaminopyridin [4] acetyliert werden; **2** liefert das kristallisierte *O*-Acetylcyclosporin B (**8**). Die Umsetzung von **2** mit Chloressigsäureanhydrid in Pyridin führt (ohne Zusatz von 4-Dimethylaminopyridin) in guter Ausbeute zum Chloracetat **9**, das sich mit NaI in Aceton leicht in Cyclosporin-B-jodacetat (**10**) umwandeln lässt.



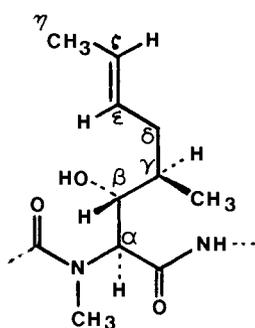
Cyclosporin B (**2**)  
(Partialstruktur)

X = H: Cyclosporin-B-acetat (**8**)  
X = Cl: Cyclosporin-B-chloracetat (**9**)  
X = I: Cyclosporin-B-jodacetat (**10**)

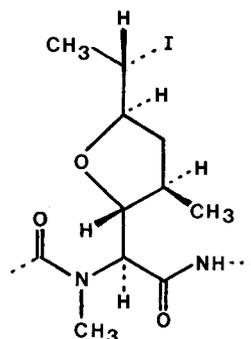
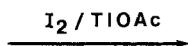
Die Jodacetylgruppe ist im IR.-Spektrum durch die Bande bei 1735 cm<sup>-1</sup> und im <sup>1</sup>H-NMR.-Spektrum durch ein Singulett bei 3,6 ppm (2H) erkennbar. Im Massenspektrum von **10** tritt kein Molekularpik auf; der höchste Pik von *m/e* 1169 entsteht nach Abspaltung von Jodessigsäure, die als Fragmente *m/e* 186 [ICH<sub>2</sub>COOH]<sup>+</sup> 128 [HI]<sup>+</sup> und 127 [I]<sup>+</sup> sichtbar wird. Cyclosporin-B-jodacetat (**10**) kristallisiert aus Äther/Petroläther in Form gut ausgebildeter, rechteckiger Platten. Die Röntgenstrukturanalyse von **10**, über die an anderer Stelle referiert wird [7], erbrachte den Beweis für die postulierte Struktur von **2**: Cyclosporin B enthält anstelle der *L*-a-Aminobuttersäure von **1** *L*-Alanin; die restlichen Aminosäuren und ihre Sequenz sind gleich wie in Cyclosporin A (**1**). Im Jodderivat **10** konnte auch erstmals die ungesättigte C<sub>9</sub>-Aminosäure kristallographisch bestimmt und als (*E*)-(2*S*, 3*R*, 4*R*)-2-Methylamino-3-hydroxy-4-methyl-oct-6-ensäure bestätigt werden.

5.2. *Cyclisches Jodderivat 11 von Cyclosporin D*. Die Synthese eines jodierten Derivats von **4** erfolgte durch Umsatz mit Jod und Thallium(I)-acetat [2]. In einer

regio- und stereoselektiv verlaufenden Addition/Cyclisierungsreaktion entsteht aus **4** das jodhaltige Tetrahydrofuran-derivat **11**, dessen spektralanalytische Daten und Elementaranalyse mit der erwarteten Struktur in Einklang stehen.

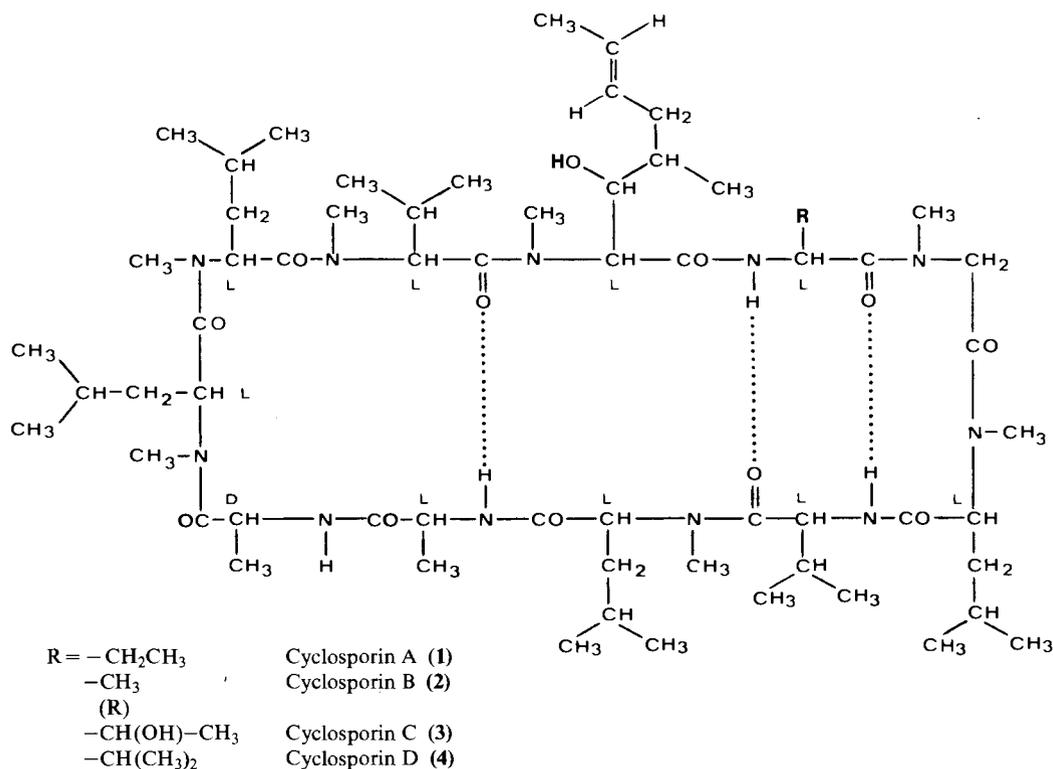


**4** (Partialstruktur)



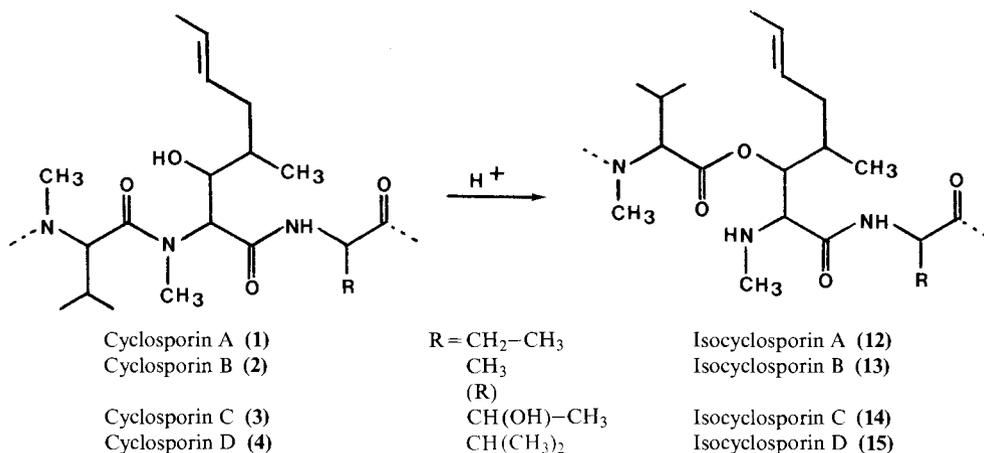
**11** (Partialstruktur)

Das cyclische Jodderivat **11** kristallisiert aus Cyclohexan/Heptan in Form feiner Nadeln. Die Röntgenstrukturanalyse [7] bestätigt die vermutete Struktur **4**: Zum Unterschied von **1** enthält Cyclosporin D (**4**) L-Valin anstelle der L-*a*-Aminobuttersäure.



Zusammenfassend zeigen die experimentellen Befunde, dass die vier Cyclosporine A, B, C und D in ihrem Aufbau weitgehend konform sind und sich nur in der Variation einer Aminosäure voneinander unterscheiden. Auch die molekulare Konformation, die am besten als  $\beta$ -Faltblattstruktur mit einer Schlinge, stabilisiert durch strebenartige Wasserstoffbrücken, beschrieben wird, trifft aufgrund der kristallographischen Messungen auf alle vier Komponenten zu.

**6. Die Isocyclosporine B (13) und D (15).** - Die Cyclosporine A (1) und C (3) erleiden beim Erwärmen mit Methansulfonsäure in Dioxan eine unter Ringerweiterung verlaufende, intramolekulare Umlagerung zum basischen Isocyclosporin A (12) bzw. C (14). Die Carboxylgruppe des *N*-Methyl-L-valylrests wandert dabei an die Hydroxylgruppe der  $C_9$ -Aminosäure unter Freilegung einer sekundären Aminogruppe [2] [4]. Erwartungsgemäss können auch die neuen Cyclosporine B (2) und D (4), bei denen die gleichen strukturellen Voraussetzungen für eine *N,O*-Acylwanderung bestehen, in ihre basischen Isoverbindungen 13 bzw. 15 umgelagert werden.  $pK$ -Werte, IR.- und  $^1H$ -NMR.-Spektren stehen mit den angegebenen Formeln in Einklang.



**7. Antimikrobielle Aktivität.** - Die Cyclosporine weisen ein sehr enges antimikrobielles Aktivitätsspektrum auf. Sie zeigen keine Wirkung gegen Bakterien und sind auch praktisch inaktiv gegen Hefen. Selbst beim weitaus grössten Teil der sensiti-

Tabelle 3. Minimale Hemmkonzentrationen der Cyclosporine in  $\mu g/ml^2$ )

Organismus	Cyclosporin			
	A	B	C	D
<i>Aspergillus niger</i>	3	3	1	1
<i>Curvularia lunata</i>	1	3	1	3
<i>Neurospora crassa</i>	10	3	10	1
<i>Helminthosporium sp.</i>	10	30	10	10

<sup>2)</sup> Bestimmt in 2% Malzextrakt-Medium bei 27 °C und einer Inoculumdichte von  $10^5$  Konidien/ml.

ven, mycelbildenden Pilze äussert sich die Empfindlichkeit nur in morphologischen Veränderungen des Mycels [1]. Die wenigen Organismen, bei denen eine echte Wachstumshemmung festgestellt wurde, sind in *Tabelle 3* aufgeführt.

### Experimenteller Teil

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

**Isolierung der Cyclosporine B (2), D (4) und E (5).** - Die durch aerobe Submerszüchtung von *Trichoderma polysporum* (LINK EX PERS.) RIFAI (NRRL 8044) gewonnenen Kulturbrühen aus fünf 3000-l-Ansätzen wurden, wie früher beschrieben [1] [2], auf Cyclosporin A und C aufgearbeitet. Bei der chromatographischen Abtrennung der beiden Hauptmetabolite aus dem Antibiotika-Komplex fielen zahlreiche Zwischen- und Randfraktionen an, die aufgrund ihrer Polarität (DC.-Analyse) zu folgenden zwei Mischpräparaten vereinigt wurden:

23,3 g (Gemisch, vorzugsweise D mit wenig A)

92,3 g (Gemisch aus A, B und E).

Zur Gewinnung von Cyclosporin D wurden die 23,3 g einer Kohlebehandlung in Aceton unterworfen und 2mal aus 40 ml Aceton bei  $-17^{\circ}$  kristallisiert: 15,6 g DC.-einheitliches Cyclosporin D (4).

Die 92,3 g Cyclosporin A, B und E-haltigen Fraktionen wurden an 9 kg Kieselgel mit Hexan/Aceton 2:1 chromatographiert, wobei zuerst Cyclosporin A und in den späteren Fraktionen (62,1 g) vorwiegend Cyclosporin B neben wenig E eluiert wurden. Nachchromatographie der Hauptfraktion an 9 kg Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 ergab DC.-einheitliches Cyclosporin B (2) als amorphes, weisses Pulver (34,2 g) und angereichertes Cyclosporin E (7 g). Weitere Chromatographie der E-Fraktion an Kieselgel mit Äther/Methanol 95:5 und Chloroform/Methanol 98:2 lieferte schliesslich DC.-einheitliches, amorphes Cyclosporin E (1,2 g).

Die einzelnen Komponenten liegen im Antibiotika-Komplex in folgender Verteilung vor (DC.- und HPLC.-Analyse):

Cyclosporin A 60–65%	Cyclosporin C 25–30%	Cyclosporin E <1%
Cyclosporin B 5–10%	Cyclosporin D 5–10%	

*Cyclosporin B (2).* Amorphes, weisses Pulver vom Smp. 149–152°;  $[\alpha]_D^{20} = -238^{\circ}$  ( $c = 0,62$ , Chloroform);  $[\alpha]_D^{20} = -168^{\circ}$  ( $c = 0,56$ , Methanol). - DC. siehe *Tabelle 1*. - UV.: Endabsorption gegen 200 nm. - IR. (*Fig. 1*): 1630–1670 (Amid), 970 (CH=CH *trans*). -  $^1\text{H-NMR}$ . (*Fig. 3*): 8,0 (*d*, 1H, CONH); 7,7 (*d*, 1H, CONH); 7,4 (*d*, 1H, CONH); 7,1 (*d*, 1H, CONH); 4,3–5,8 (*m*, ca. 13H, H–C( $\alpha$ ) der AS. 1 bis 11, H–C( $\epsilon$ ) und H–C( $\zeta$ ) der C<sub>9</sub>-AS.); 3,7–4,0 (*m*, 2H, OH und H–C( $\beta$ ) der C<sub>9</sub>-AS.); 3,5 (*s*, 3H, CONCH<sub>3</sub>); 3,4 (*s*, 3H, CONCH<sub>3</sub>); 3,2 (*s*, 3H, CONCH<sub>3</sub>); 3,1 (*s*, 6H, CONCH<sub>3</sub>); 2,7 (*s*, 6H, CONCH<sub>3</sub>); 0,7–2,6 (*m*, ca. 68H); 1,6 (*d*, 3H, H–C( $\eta$ ) der C<sub>9</sub>-AS.). -  $^{13}\text{C-NMR}$ .: *Tabelle 4*. - MS. (*m/e*): 1187 (*M*<sup>+</sup>), 1169 (*M*<sup>+</sup>–H<sub>2</sub>O), 1114 (1169–C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>, aus C<sub>9</sub>-AS.), 1086 (1169–C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, aus C<sub>9</sub>-AS.).

C <sub>61</sub> H <sub>109</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	Ber. C 61,6	H 9,2	N 13,0	O 16,2%
(1188,608)	Gef. ,, 61,6	„ 9,4	„ 13,4	„ 16,2%

*Cyclosporin D (4).* Aus Aceton bei  $-15^{\circ}$  farblose Prismen vom Smp. 148–151°;  $[\alpha]_D^{20} = -245^{\circ}$  ( $c = 0,52$ , Chloroform);  $[\alpha]_D^{20} = -211^{\circ}$  ( $c = 0,51$ , Methanol). - DC.: siehe *Tabelle 1*. - UV.: Endabsorption gegen 200 nm. - IR. (*Fig. 2*): 1630–1670 (Amid), 970 (CH=CH *trans*). -  $^1\text{H-NMR}$ . (*Fig. 4*): 8,0 (*d*, 1H, CONH); 7,7 (*d*, 1H, CONH); 7,6 (*d*, 1H, CONH); 7,2 (*d*, 1H, CONH); 4,4–5,8 (*m*, ca. 13H, H–C( $\alpha$ ) der AS. 1 bis 11, H–C( $\epsilon$ ) und H–C( $\zeta$ ) der C<sub>9</sub>-AS.); 3,7–3,9 (*m*, 2H, OH und H–C( $\beta$ ) der C<sub>9</sub>-AS.); 3,6 (*s*, 3H, CONCH<sub>3</sub>); 3,4 (*s*, 3H, CONCH<sub>3</sub>); 3,3 (*s*, 3H, CONCH<sub>3</sub>); 3,1 (*s*, 6H, CONCH<sub>3</sub>); 2,7 (*s*, 6H, CONCH<sub>3</sub>); 0,7–2,5 (*m*, ca. 72H); 1,65 (*d*, 3H, H–C( $\eta$ ) der C<sub>9</sub>-AS.). -  $^{13}\text{C-NMR}$ .: *Tabelle 5*. - MS. (*m/e*): 1215 (*M*<sup>+</sup>), 1197 (*M*<sup>+</sup>–H<sub>2</sub>O), 1142 (1197–C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>, aus C<sub>9</sub>-AS.).

C <sub>63</sub> H <sub>113</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	Ber. C 62,2	H 9,4	N 12,7	O 15,8%
(1216,662)	Gef. ,, 62,1	„ 9,5	„ 12,9	„ 15,9%

Tab. 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR.-Spektrum von Cyclosporin B (2) (bei 22,63 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ; TMS=0 ppm)

$\delta$ (ppm)	rel. Intensität geschätzt	Aufspaltung off-resonance	$\delta$ (ppm)	rel. Intensität geschätzt	Aufspaltung off-resonance	$\delta$ (ppm)	rel. Intensität geschätzt
173,2	1	s	50,3	1	t	24,9	1
173,0	1	s	48,7	1	d	24,7	2
172,8	1	s	48,3	1	d	23,8	1
172,8	1	s	45,1	1	d	23,7	1
170,9	1	s	42,9	1	d	23,6	1
170,6	1	s	40,8	1		23,4	1
170,4	1	s	39,3	1		23,2	1
169,8	1	s	39,0	1		22,0	1
169,4	1	s	37,4	1		21,9	1
169,4	1	s	36,1	2		21,2	1
169,1	1	s	35,6	1		20,1	1
129,1	1	d	33,8	1		19,7	1
125,8	1	d	31,5	1		18,8	1
74,4	1	d	31,2	2		18,5	1
58,7	1	d	29,8	1		18,2	1
57,9	1	d	29,7	1		17,9	1
57,6	1	d	29,6	1		17,7	1
55,5	1	d	28,9	1		16,7	1
55,3	2	d	25,4	1		16,1	1

Tab. 5.  $^{13}\text{C}$ -NMR.-Spektrum von Cyclosporin D (4) (bei 22,63 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ; TMS=0 ppm)

$\delta$ (ppm)	rel. Intensität geschätzt						
173,21	1	57,7	1	35,6	1	23,7	1
173,08	1	57,5	1	34,1	1	23,6	1
172,90	1	55,5	2	31,4	1	23,3	2
172,68	1	55,2	1	31,3	1	21,8	2
170,81	1	53,8	1	31,0	1	21,1	1
170,45	1	50,4	1	30,1	1	20,3	1
170,33	1	48,5	1	29,7	2	19,9	1
169,98	1	48,2	1	29,6	1	19,2	1
169,58	1	45,0	1	29,3	1	18,6	1
169,29	2	40,6	1	25,3	1	18,3	1
129,3	1	39,5	1	24,8	1	18,1	2
125,7	1	39,0	1	24,6	1	17,8	1
74,8	1	37,4	1	24,5	1	16,8	1
58,9	1	36,0	2	23,9	1	15,8	1

Cyclosporin E (5). Aus Äther bei +7° farblose, prismatische Nadeln vom Smp. 149–152°;  $[\alpha]_D^{20} = -179^\circ$  ( $c=0,54$ , Chloroform);  $[\alpha]_D^{20} = -186^\circ$  ( $c=0,51$ , Methanol). - DC.: siehe Tabelle I. - UV.: Endabsorption gegen 200 nm. - IR.: 1630–1680 (Amid). - MS. ( $m/e$ ): 1187 ( $M^+$ ), 1169 ( $M^+ - \text{H}_2\text{O}$ ).

$\text{C}_{61}\text{H}_{109}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$  Ber. C 61,6 H 9,2 N 13,0 O 16,2%  
(1188,608) Gef. „ 61,5 „ 9,3 „ 13,0 „ 16,5%

*Dihydrocyclosporin B (6)*. Zur Suspension von 400 mg vorhydrierter Pd/C in 15 ml Äthanol wurden 3,09 g **2** in 30 ml Äthanol gegeben und bis zur beendeten Wasserstoffaufnahme hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde die Lösung eingedampft, wobei **6** als amorphes, weisses Pulver vom Smp. 151–154° anfiel (3,06 g);  $[\alpha]_D^{20} = -236^\circ$  ( $c=0,58$ , Chloroform);  $[\alpha]_D^{20} = -165,5^\circ$  ( $c=0,51$ , Methanol). - DC.: Rf=0,26 (Chloroform/Methanol 96:4). - UV.: Endabsorption gegen 200 nm. - IR.: wie **2**, fehlt aber Bande bei 970 (CH=CH). - <sup>1</sup>H-NMR.: Abwesenheit der Signale bei 5,35 (*m*, 2H, H-C( $\epsilon$ )) und H-C( $\zeta$ ) der C<sub>9</sub>-AS.) und 1,6 (*d*, 3H, H-C( $\eta$ )) der C<sub>9</sub>-AS.).

C <sub>61</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	Ber. C 61,5	H 9,4	N 12,9	O 16,1%
(1190,624)	Gef. ,, 61,3	,, 9,5	,, 13,1	,, 15,9%

*Dihydrocyclosporin D (7)*. Aus 3,66 g **4** wurden, wie bei **6** beschrieben, 3,60 g **7** als weisses, amorphes Pulver erhalten. Smp. 153–156°;  $[\alpha]_D^{20} = -237^\circ$  ( $c=0,56$ , Chloroform);  $[\alpha]_D^{20} = -196^\circ$  ( $c=0,58$ , Methanol). - DC.: Rf=0,42 (Chloroform/Methanol 96:4). - UV.: Endabsorption. - IR.: wie **4**, fehlt aber Bande bei 970 (CH=CH). - <sup>1</sup>H-NMR.: Abwesenheit der Signale bei 5,35 (*m*, 2H, H-C( $\epsilon$ )) und H-C( $\zeta$ ) der C<sub>9</sub>-AS.) und 1,6 (*d*, 3H, H-C( $\eta$ )) der C<sub>9</sub>-AS.).

C <sub>63</sub> H <sub>115</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	Ber. C 62,1	H 9,5	N 12,6	O 15,8%
(1218,678)	Gef. ,, 61,8	,, 9,5	,, 12,9	,, 16,0%

*Cyclosporin-B-acetat (8)*. 1,19 g (1 mmol) **2** wurden mit 31 mg (0,25 mmol) 4-Dimethylaminopyridin in 10 ml Acetanhydrid/Pyridin 1:1 17 Std. bei RT. gerührt. Die gelbe Lösung wurde i.V. bei 45° eingeeengt, in Chloroform aufgenommen, mit Wasser gewaschen und der Eindampfrückstand an Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 chromatographiert. Zweimalige Kristallisation der DC.-einheitlichen Fraktionen aus Äther/Petroläther 1:1 ergab 821 mg (67%) **8** als farblose Rhomben; Smp. 210–211°;  $[\alpha]_D^{20} = -313^\circ$  ( $c=0,53$ , Chloroform);  $[\alpha]_D^{20} = -225^\circ$  ( $c=0,53$ , Methanol). - IR.: 1740 und 1235 (Ester). - <sup>1</sup>H-NMR.: 2,0 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>COO).

C <sub>63</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub>	Ber. C 61,5	H 9,1	N 12,5	O 16,9%
(1230,645)	Gef. ,, 61,7	,, 9,4	,, 12,5	,, 17,0%

*Cyclosporin-B-chloracetat (9)*. 11,89 g (10 mmol) **2** wurden in 60 ml abs. Pyridin mit 20,5 g (120 mmol) Chloressigsäureanhydrid 8 Std. bei 23° gerührt. Anschliessend wurde mit Wasser versetzt, mit Äther extrahiert, die Ätherphasen mit Wasser gewaschen und das Rohprodukt (13,3 g) an 1 kg Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98,5:1,5 chromatographiert. Die DC.-einheitlichen Fraktionen wurden aus Äther/Petroläther kristallisiert: 10,3 g (82%) **9** als farblose Polyeder vom Smp. 208–209°;  $[\alpha]_D^{20} = -296^\circ$  ( $c=0,56$ , Chloroform);  $[\alpha]_D^{20} = -214^\circ$  ( $c=0,51$ , Methanol). - IR.: 1760 (Ester). - <sup>1</sup>H-NMR.: 3,95 und 4,2 (AB-System, *J* = 14 Hz, 2H, ClCH<sub>2</sub>COO). - MS. (*m/e*): kein M<sup>+</sup>, 1169 (M<sup>+</sup>–ClCH<sub>2</sub>COOH).

C <sub>63</sub> H <sub>110</sub> ClN <sub>11</sub> O <sub>13</sub>	Ber. C 59,8	H 8,8	Cl 2,8	N 12,2	O 16,4%
(1265,090)	Gef. ,, 59,9	,, 9,0	,, 2,8	,, 12,2	,, 16,7%

*Cyclosporin-B-jodacetat (10)*. 6,33 g (5 mmol) **9** wurden in 50 ml Aceton mit 7,5 g (50 mmol) NaI 9 Std. unter Rückfluss erwärmt. Anschliessend wurde vom abgeschiedenen Salz abfiltriert, das Filtrat zur Trockne eingeeengt und zwischen Äther und Wasser verteilt. Die Ätherphasen wurden eingedampft und an Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98,5:1,5 gereinigt. Kristallisation der DC.-einheitlichen Fraktionen aus Äther/Petroläther 1:1 ergab 6,03 g (89%) **10** als farblose rechteckige Platten vom Smp. 226–227°;  $[\alpha]_D^{20} = -285^\circ$  ( $c=0,50$ , Chloroform);  $[\alpha]_D^{20} = -210^\circ$  ( $c=0,53$ , Methanol). - IR.: 1735 (Ester). - <sup>1</sup>H-NMR.: 3,6 (*s*, 2H, ICH<sub>2</sub>COO). - MS. (*m/e*): kein M<sup>+</sup>, 1169 (M<sup>+</sup>–ICH<sub>2</sub>COOH), 186 (ICH<sub>2</sub>COOH<sup>+</sup>), 128 (HI<sup>+</sup>), 127 (I<sup>+</sup>).

C <sub>63</sub> H <sub>110</sub> IN <sub>11</sub> O <sub>13</sub>	Ber. C 55,8	H 8,2	I 9,4	N 11,4	O 15,3%
(1356,541)	Gef. ,, 56,0	,, 8,3	,, 9,5	,, 11,5	,, 15,7%

*Cyclisches Jodderivat (11) von Cyclosporin D*. Zu 6,09 g (5 mmol) **4** und 1,58 g (6 mmol) Thallium(I)-acetat in 80 ml Chloroform wurden unter Rühren 1,27 g (10 mmol) Jod in 80 ml Chloroform getropft. Der zunächst entstehende dunkelgrüne Niederschlag ging nach 4 Std. Rühren bei RT. in hellgelbes Thallium(I)-jodid über, das abfiltriert wurde. Der Eindampfrückstand des Filtrates wurde an Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 chromatographiert, die DC.-einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt (6,01 g; 90%) und aus Cyclohexan/Heptan 9:4 kristallisiert: 3,63 g (54%) **11** als feine Nadeln; Smp.

183–185° (Zers.);  $[\alpha]_D^{20} = -235^\circ$  ( $c = 0,49$ , Chloroform). - IR.: sehr ähnlich wie **4**; schwache Bande bei 970 (CH=CH) fehlt. - <sup>1</sup>H-NMR.: 1,9 (*d*, 3H, CH<sub>3</sub>-CHI-); Abwesenheit der Vinylprotonen. - MS. (*m/e*): kein *M*<sup>+</sup>, 1213 (*M*<sup>+</sup>-HI), 1103 (*M*<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>IO).

C <sub>63</sub> H <sub>112</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	Ber. C 56,4	H 8,4	J 9,5	N 11,5	O 14,3%
(1342,558)	Gef. „ 56,4	„ 8,5	„ 9,7	„ 11,6	„ 14,3%

*Isocyclosporin B* (**13**), 2,38 g (2 mmol) **2** wurden mit 0,48 g (5 mmol) Methansulfonsäure in 24 ml Dioxan 17 Std. auf 50° erwärmt. Nach Abkühlen auf RT. und Zugabe von 0,45 g Natriumacetat wurde vom abgeschiedenen Salz abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand an 200 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol 98:2 chromatographiert. Die DC.-einheitlichen Fraktionen (Chloroform/Methanol/Essigsäure 90:6:4) ergaben nach zweimaliger Kristallisation aus Äther 1,09 g (46%) **13** als farblose Prismen vom Smp. 142–144°;  $[\alpha]_D^{20} = -189^\circ$  ( $c = 0,65$ , Chloroform);  $[\alpha]_D^{20} = -131^\circ$  ( $c = 0,53$ , Methanol). - DC.: Rf = 0,28 (Chloroform/Methanol/Essigsäure 90:6:4). - UV.: Endabsorption. - IR.: 1735 (Ester), 1630–1670 (Amid). - <sup>1</sup>H-NMR.: 6,5–8,4 (*m*, 4H, 4 CONH); 2,7–3,2 (*m*, 18H, 6 CONCH<sub>3</sub>); 2,3 (*m*, 3H, NCH<sub>3</sub>).

C <sub>61</sub> H <sub>109</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	Ber. C 61,6	H 9,2	N 13,0	O 16,2%
(1188,608)	Gef. „ 61,5	„ 9,5	„ 13,2	„ 16,2%

*Isocyclosporin D* (**15**). Die Herstellung erfolgte wie bei **13**. Aus 1,83 g (1,5 mmol) **4** wurden nach zweimaliger Kristallisation aus Äther 990 mg (54%) **15** als farblose Prismen vom Smp. 142–144° erhalten;  $[\alpha]_D^{20} = -205,5^\circ$  ( $c = 0,51$ , Chloroform);  $[\alpha]_D^{20} = -144^\circ$  ( $c = 0,64$ , Methanol). - DC.: Rf = 0,31 (Chloroform/Methanol/Essigsäure 90:6:4). - UV.: Endabsorption. - IR.: 1735 (Ester), 1630–1670 (Amid). - <sup>1</sup>H-NMR.: 6,4–8,0 (*m*, 4H, 4 CONH); 2,7–3,2 (*m*, 18H, 6 CONCH<sub>3</sub>); 2,3 (*m*, 3H, NCH<sub>3</sub>).

C <sub>63</sub> H <sub>113</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	Ber. C 62,2	H 9,4	N 12,7	O 15,8%
(1216,662)	Gef. „ 62,0	„ 9,4	„ 12,7	„ 16,3%

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Dreyfuss, E. Hürri, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pache & H. Tschertler, 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] T. J. Peicher, H. P. Weber & A. Rügger, Helv. 59, 1480 (1976).
- [4] R. Traber, M. Kuhn, A. Rügger, H. Lichti, H. R. Loosli & A. von Wartburg, Helv. 60, 1247 (1977).
- [5] S. Moore & H. W. Stein, J. biol. Chemistry 192, 663 (1951).
- [6] T. Clerc, E. Pretsch & S. Sternhell, Methoden der Analyse in der Chemie, Bd. 16 Akadem. Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1973.
- [7] T. J. Peicher & H. P. Weber, Veröffentlichung in Vorbereitung.