

162. Isolierung und Strukturermittlung der neuen Cyclosporine E, F, G, H und I

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

Sandoz AG, Pharma Departement, Mikrobiologische und Präklinische Forschung, CH-4002 Basel

(20. IV. 82)

Isolation and Structure Determination of the New Cyclosporins E, F, G, H and I

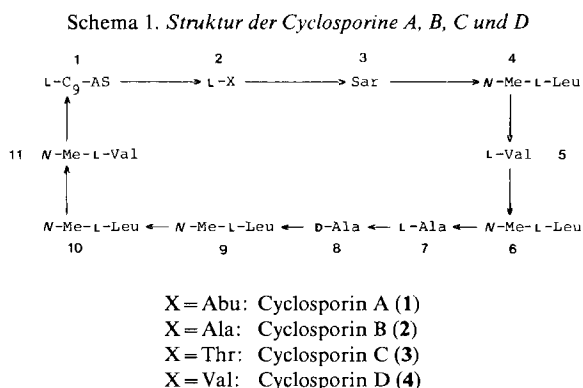
Summary

The cyclosporins, a new group of biologically active metabolites, are produced by the fungus *Tolypocladium inflatum* GAMS (formerly designated as *Trichoderma polysporum* [LINK EX PERS.] RIFAI). They represent neutral cyclic oligopeptides composed of 11 amino acids. In addition to the already described cyclosporins A–D new minor compounds, cyclosporins E–I, have now been isolated from the crude cyclosporin-complex by applying extensive chromatographical separation procedures. The structures of the new compounds have been determined by spectroscopical evidence, hydrolytic cleavage and chemical correlation reactions as well as by X-ray analysis of suitable derivatives. Cyclosporins A, B, C, D and G differ from each other only in the nature of the amino acid no. 2. Cyclosporins E and I are *N*-demethylated congeners of cyclosporins A and D respectively. Cyclosporin F has been recognized as deoxycyclosporin A, whereas cyclosporin H represents an epimeric form of cyclosporin A and contains *N*-methyl-D-valine in position 11.

Die im Rahmen unseres mikrobiologischen *Screening*-Programmes entdeckten Cyclosporine stellen eine neue Gruppe biologisch aktiver Naturstoffe dar, die von niederen Pilzen wie *Tolypocladium inflatum* GAMS¹⁾ und *Cylindrocarpon lucidum* BOOTH als sekundäre Stoffwechselprodukte gebildet werden [1] [2]. Strukturell erweisen sich die Cyclosporine als cyclische Oligopeptide aus 11 z. T. *N*-methylierten Aminosäuren. Als charakteristisches, gemeinsames Strukturelement ist eine ungesättigte, hydroxylhaltige C₉-Aminosäure ((*E*)-(2*S*,3*R*,4*R*)-3-Hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure) bemerkenswert, die eine unter Ringerweiterung verlaufende *N,O*-Acylwanderung zu den Isoverbindungen ermöglicht. Konstitution und Abbaufunktion der Cyclosporine A, B, C und D wurden durch chemische Abbau- und Verknüpfungsreaktionen sowie mittels spektroskopischer und kristallographischer Methoden aufgeklärt [2] [4–6]. Inzwischen ist auch die Totalsynthese des Hauptmetaboliten, des Cyclosporins A, geglückt [7]. Die bis jetzt beschriebenen

¹⁾ Nach unseren neuen taxonomischen Untersuchungen ist der früher als *Trichoderma polysporum* bezeichnete Stamm nach *W. Gams* [3] als *Tolypocladium inflatum* GAMS zu klassifizieren.

Cyclosporine differieren voneinander nur in einer Aminosäure (AS Nr. 2): Die in Cyclosporin A vorliegende L- α -Aminobuttersäure ist im Cyclosporin B durch L-Alanin, im Cyclosporin C durch L-Threonin und im Cyclosporin D durch L-Valin ersetzt [2] [4–6] (s. *Schema 1*).



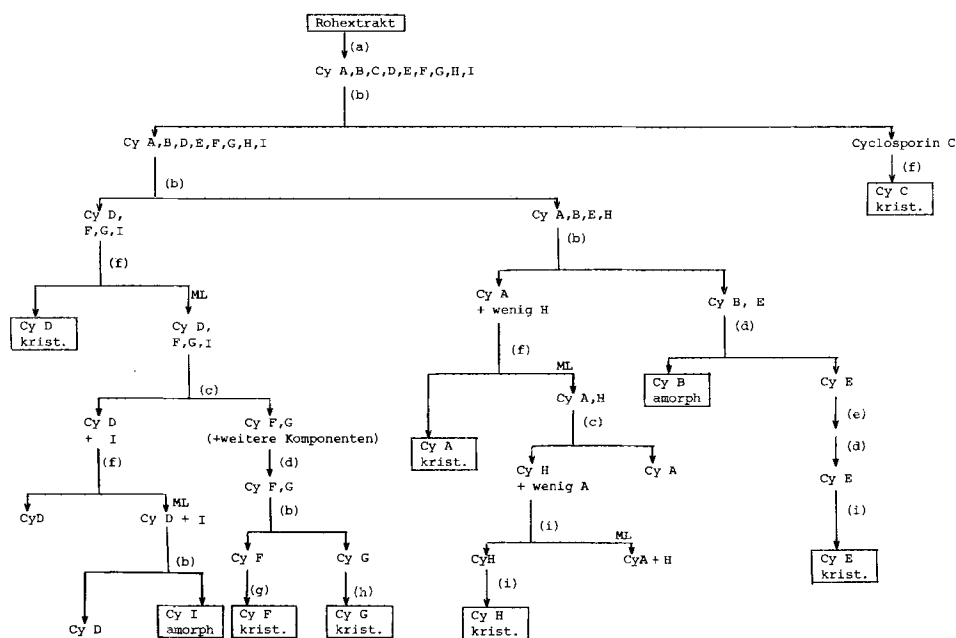
Über die immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung des Cyclosporins A wurde von *Borel et al.* [8], *Wiesinger et al.* [9] und über die klinische Anwendung bei Transplantationen von *Calne et al.* [10] ausführlich berichtet. Im folgenden informieren wir über die Isolierung und Strukturermittlung weiterer Nebenmetabolite, der Cyclosporine E, F, G, H und I.

Tabelle 1. Physikalisch-chemische Daten der Cyclosporine A–I

Metabolit	Bruttoformel	Smp.	$[\alpha]_D^{20}$ in CHCl_3	$[\alpha]_D^{20}$ in CH_3OH
Cyclosporin A	$\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	148–151° (krist. Aceton)	–244°	–189°
Cyclosporin B	$\text{C}_{61}\text{H}_{109}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	149–152° (amorph.)	–238°	–168°
Cyclosporin C	$\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$	152–155° (krist. Aceton)	–255°	–182°
Cyclosporin D	$\text{C}_{63}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	148–151° (krist. Aceton)	–245°	–211°
Cyclosporin E	$\text{C}_{61}\text{H}_{109}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	149–152° (krist. Äther)	–179°	–186°
Cyclosporin F	$\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{11}$	183–184° (krist. Äther/Petroläther 1:4)	–290°	–218°
Cyclosporin G	$\text{C}_{63}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	196–197° (krist. Äther/Petroläther 1:1)	–245°	–191°
Cyclosporin H	$\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	162–165° (krist. Äther)	–177°	–112°
Cyclosporin I	$\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	137–140° (amorph)	–220°	–183°

Isolierung der Cyclosporine. – Durch aerobe Submers-Züchtungen von *T. inflatum* erhaltene Kulturbrühen werden mit Essigsäurebutylester ausgerührt und der Extrakt durch Verteilung zwischen Methanol/H₂O 9:1 und Petroläther entfettet. Die Auftrennung des anfallenden rohen Metabolitengemisches erfolgt durch systematische Chromatographien, zunächst an *Sephadex LH-20* und dann an Kieselgel nach *Schema 2*. Der Verlauf des Isolierprozesses wird analytisch durch DC. oder HPLC. verfolgt. Die R_f-Werte der Reinkomponenten in verschiedenen DC.-Systemen sind im *Experimentellen Teil* angegeben (*Tab. 4*). Neben den bereits bekannten Cyclosporinen A–D konnten die fünf neuen Cyclosporine E–I gewonnen werden. Die wichtigsten physikalisch-chemischen Daten der bis jetzt isolierten Metaboliten sind in *Tabelle 1* zusammengestellt.

Schema 2. Isolierung der Cyclosporine A bis I



- (a) *Sephadex LH-20*, CH₃OH
- (b) Kieselgel Hexan/Aceton 2:1
- (c) Kieselgel Essigester/H₂O ges.
- (d) Kieselgel CHCl₃/CH₃OH 98:2
- (e) Kieselgel Äther/CH₃OH 95:5
- (f) Kristallisation aus Aceton bei –15°
- (g) Kristallisation aus Äther/Petroläther 1:4
- (h) Kristallisation aus Äther/Petroläther 1:1
- (i) Kristallisation aus Äther

Cyclosporin E (5). – Das aus Cyclosporin B-Fractionen abgetrennte Cyclosporin E (5) zeigt einige spektralanalytische Besonderheiten, z. B. eine deutliche Aufspaltung der üblichen breiten Amidbande im IR.-Spektrum bei 1630–1680 cm⁻¹ (*Fig. 1*). Im ¹H-NMR.-Spektrum (*Fig. 2*) erscheinen zwischen 2,8 und 3,5 ppm nur 6 *N*-Methylgruppen, dagegen sind im Gebiet der Amidprotonen 5 CONH-Signale festzustellen. Bei den Cyclosporinen A–D treten vergleichsweise Signale von 7 *N*-Methyl- und 4 CONH-Gruppen auf. Die charakteristische C₉-Aminosäure ist in 5 durch

leicht interpretierbare Signale bei 1,66 ppm (endständige Methylgruppe), 5,3–5,4 ppm (Vinylprotonen) und bei 4,9 ppm (OH-Gruppe) erkennbar. Doppelbindung und OH-Gruppe lassen sich chemisch durch die Bildung einer Dihydroverbindung **10** bzw. durch Acylderivate bestätigen.

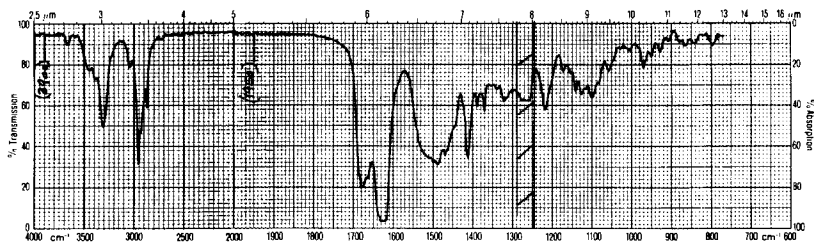


Fig. 1. IR.-Spektrum von Cyclosporin E (**5**) in CH_2Cl_2

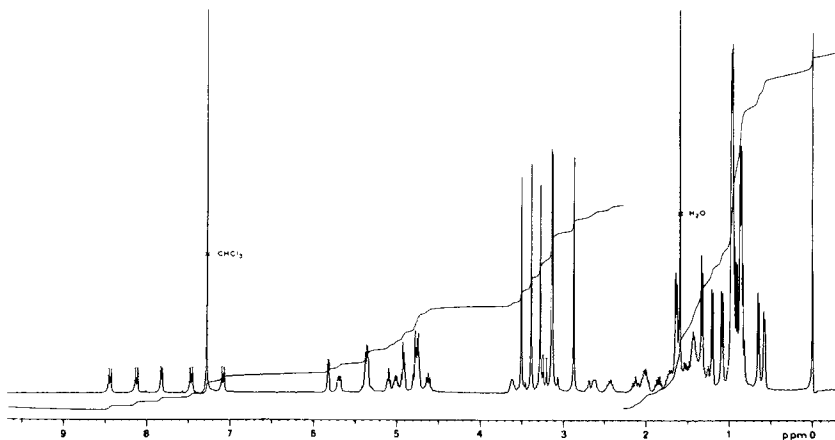
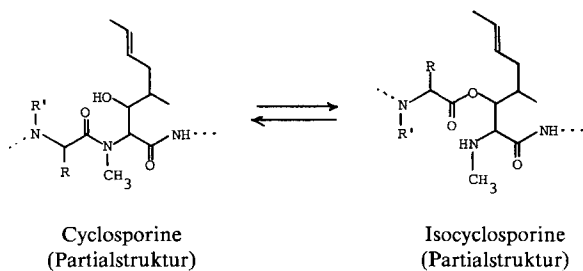


Fig. 2. ^1H -NMR.-Spektrum von Cyclosporin E (**5**) in CDCl_3 (360 MHz, TMS=0 ppm)

Cyclosporin E besitzt die Bruttoformel $\text{C}_{61}\text{H}_{109}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$, die durch Massenspektren (m/z 1187), Elementaranalyse und den Nachweis von 61 C-Atomen im ^{13}C -NMR.-Spektrum (*Exper. Teil, Tab. 5*) gestützt wird.

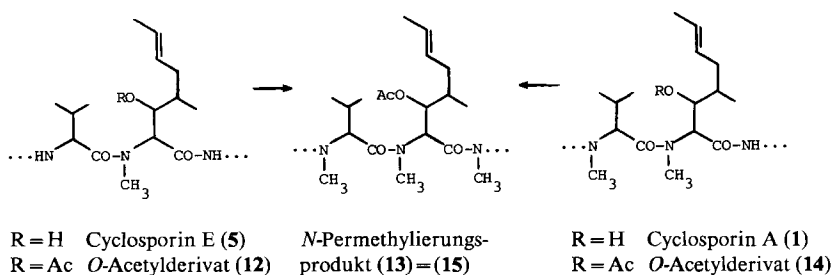
Die Aminosäureanalyse (*Exper. Teil, Tab. 6*) liefert 1 Sarkosin, 2 Alanin, 1 α -Aminobuttersäure und 2 Valin. Im Vergleich zu Cyclosporin A (**1**) enthält **5** eine CH_2 -Gruppe weniger, dagegen ist eine zweite Valineinheit zu verzeichnen.

Schema 3. Umlagerung der Cyclosporine in die Iso-Form



Cyclosporin E erleidet die typische, durch Säuren katalysierte Umlagerung zum Isocyclosporin E (11) (Schema 3). Allerdings verläuft die unter Ringerweiterung erfolgende *N,O*-Acylwanderung auch unter verschärften Bedingungen wesentlich schwerer als bei den Cyclosporinen A–D [2] [5] [6]. Dieses Verhalten beruht offensichtlich auf der spezifischen Struktur der direkt beteiligten Aminosäure Nr. 11 und führt unter Einbezug der bisherigen Befunde zur Annahme, dass es sich bei Cyclosporin E um *N*(11)-Desmethylocyclosporin A handeln könnte.

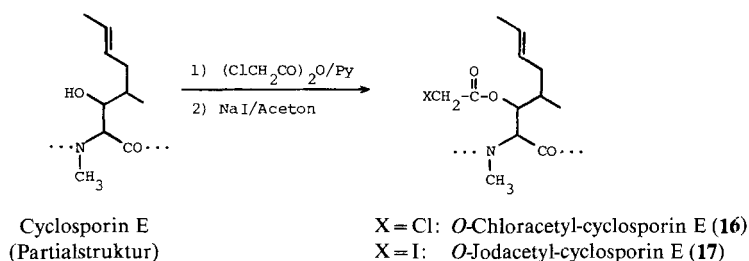
Diese Strukturhypothese ist durch eine direkte Verknüpfung der beiden Metabolite über ein gemeinsames Methylierungsderivat leicht zu überprüfen (Schema 4). Zum Schutz der β -Hydroxygruppe wird aus 5 zunächst das *O*-Acetylderivat 12 hergestellt. Umsatz von 12 mit $\text{CH}_3\text{I}/\text{Ag}_2\text{O}$ liefert das Penta-*N*-methyl-*O*-acetyl-cyclosporin E (13), das sich mit dem entsprechenden Methylierungsprodukt 15 aus *O*-Acetyl-cyclosporin A (14) als identisch erweist (IR., ^1H - und ^{13}C -NMR., MS.).

 Schema 4. Chemische Verknüpfung der Cyclosporine A und E mittels *N*-Permethylierung


Der Aufbau der beiden Cyclosporine ist somit bis auf die AS Nr. 11 gleich; Cyclosporin E enthält an dieser Stelle *L*-Valin, in Cyclosporin A liegt *N*-Methyl-*L*-valin vor (Schema 8).

Zur Bestimmung der molekularen Konformation wird Cyclosporin E nach Schema 5 über das *O*-Chloracetylderivat 16 in das kristallisierte *O*-Jodacetyl-cyclosporin E (17) übergeführt.

Schema 5



Die mit 17 durchgeführte Röntgenstrukturanalyse [11] bestätigt die für Cyclosporin E abgeleitete Struktur 5. Der Vergleich mit den Cyclosporinen A–D zeigt, dass bei 5 in der Schlaufe (AS 6–11) starke konformative Änderungen auftreten, die durch eine zusätzliche H-Brücke vom Amidproton des Valins (AS 11) zur Carbonylgruppe des D-Alanins (AS 8) verursacht werden.

Cyclosporin F. – Cyclosporin F, der apolarste Metabolit der Cyclosporin-Reihe, ist durch die Abwesenheit der sekundären Hydroxylgruppe in der C₉-Aminosäure-Einheit gekennzeichnet: In 6 (Fig. 3) fehlt die Hydroxylbande bei 3420 cm⁻¹ und im ¹H-NMR.-Spektrum (Fig. 4) ist kein Signal einer mit D₂O austauschbaren Hydroxylgruppe zu beobachten. Auch im Gebiet von 3,6–4,2 ppm ist eine Lücke festzustellen, da das übliche Triplett des β-Methinprotons der C₉-Aminosäure [CH–CH(OH)–CH] nicht auftritt. Die übrigen, für Cyclosporine charakteristischen Signalgruppen sind jedoch vollzählig vorhanden: Signale von 4 CONH- und 7 CONCH₃-Gruppen (bei 7,3–8,5 bzw. 2,7–3,5 ppm), die α-Protonen von 11 Aminosäuren und 2 Vinylprotonen im Bereich von 4,3–5,8 ppm. Bei 1,6 ppm erscheint ferner das Dublett der endständigen Methylgruppe entsprechend der Teilstruktur –CH=CH–CH₃. Die Doppelbindung, die sich auch durch katalytische Hydrierung zum Dihydrocyclosporin F (18) nachweisen lässt, dürfte aufgrund der IR.-Bande bei 970⁻¹ (Fig. 3) in der *trans*-Konfiguration vorliegen.

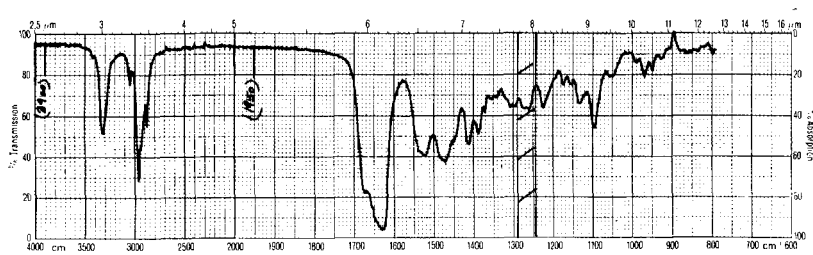


Fig. 3. IR.-Spektrum von Cyclosporin F (6) in CH₂Cl₂

Im Massenspektrum von Cyclosporin F erscheint der Molekularpik bei *m/z* 1185 entsprechend der Bruttoformel C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₁; ein Pik bei 1167, der dem Wasserabspaltungsprodukt entsprechen würde, tritt nicht auf. Das Fehlen der OH-Gruppe äussert sich auch darin, dass Cyclosporin F weder eine Isoverbindung noch Acylderivate zu bilden vermag.

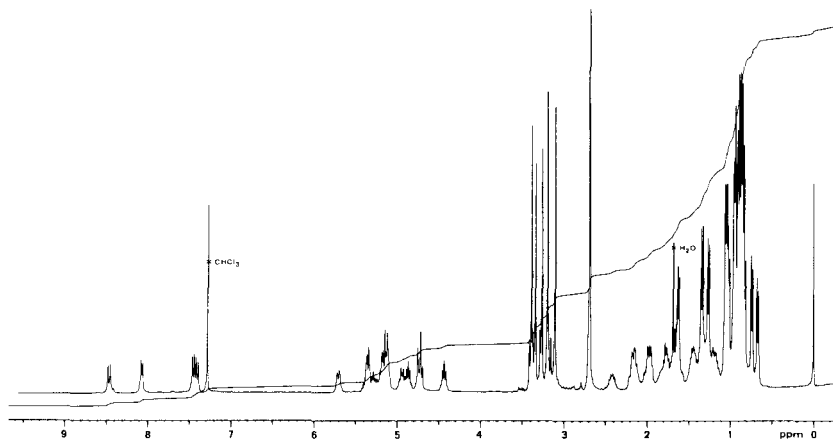
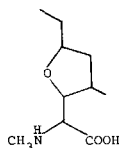


Fig. 4. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin F (**6**) in CDCl_3 (360 MHz, TMS = 0 ppm)

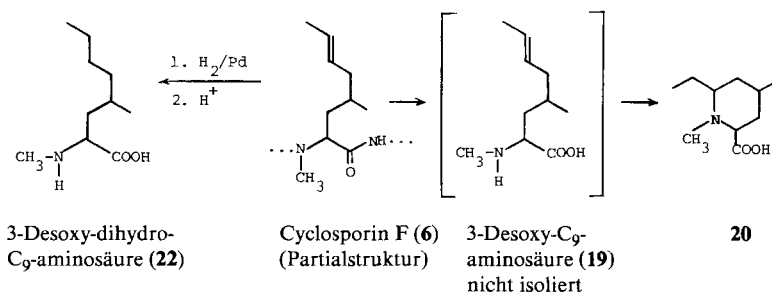
Bei der Aminosäureanalyse nach *Moore & Stein* (Tab. 6) und nach präparativer Hydrolyse können folgende Aminosäuren isoliert und identifiziert werden: *N*-Methyl-L-leucin (**4**), *N*-Methyl-L-valin, L-Valin, L- α -Aminobuttersäure, D,L-Alanin (**2**) und Sarkosin. Die gleiche Aminosäurezusammensetzung liegt auch beim Cyclosporin A vor. Die noch fehlende 3-Desoxy- C_9 -aminosäureeinheit (**19**) kann nicht intakt gefasst werden. Neben undefinierten, chlorhaltigen Reaktionsprodukten lässt sich lediglich in schlechter Ausbeute das Pipecolinsäure-Derivat **20** erhalten²⁾ (vgl. dazu [12]). Die Isolierung der 3-Desoxy- C_9 -aminosäure gelingt hingegen in Form der Dihydroverbindung **22** (Schema 6). Das nach Hydrolyse des Dihydrocyclosporins F (**18**) erhaltene Aminosäuregemisch wird über einen schwach basischen Ionenaustauscher filtriert und an Cellulose chromatographiert. Neben den bereits identifizierten zehn Aminosäuren fällt die gesuchte 3-Desoxy-dihydro- C_9 -aminosäure in kristallisierter Form an. IR., ^1H - und ^{13}C -NMR.-Spektren sind mit der angenommenen Konstitution (**22**) vereinbar. Zur Konfiguration der beiden chiralen Zentren in **22** lassen sich folgende Anhaltspunkte anführen: aus der positiven Änderung des optischen Drehwertes von $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +19^\circ$ in neutraler Lösung zu $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +37^\circ$ in saurem Milieu kann nach der Regel von *Clough-Lutz-Jirgensons* [13] auf die L-Konfiguration der Aminosäure **22** geschlossen werden. Ähnliche Verhältnisse liegen z. B. auch beim *N*-Methyl-L-leucin vor ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +21^\circ \rightarrow [\alpha]_{\text{D}}^{21} = 31^\circ$) [14]. Für das zweite chirale Zentrum wird aus Analogie zu den Cyclosporinen A–E die (*R*)-Konfiguration angenommen [2] [5] [6]. Die neue Aminosäure **22** kann als (2*S*,4*R*)-4-Methyl-2-methylamino-octansäure bezeichnet und folglich Cyclosporin F als Desoxy-cyclosporin A (**6**) formuliert werden.

²⁾ Bei der Hydrolyse von Cyclosporin A (**1**) kann die ungesättigte C_9 -Aminosäure ebenfalls nicht genau gewonnen werden, sondern es bildet sich in einer Additionsreaktion das cyclische Derivat **21**.



21

Schema 6



Eine zusätzliche Bestätigung der postulierten Struktur **6** bringt der Vergleich der ¹³C-NMR.-Spektren der Cyclosporine F und A. In beiden Spektren sind die Signale von je 62 C-Atomen zu erkennen. Das Fehlen der Hydroxylgruppe in der C₉-Aminosäure des Cyclosporins F wirkt sich deutlich in einer Reihe von Signalverschiebungen aus, die in *Tabelle 2* interpretiert werden.

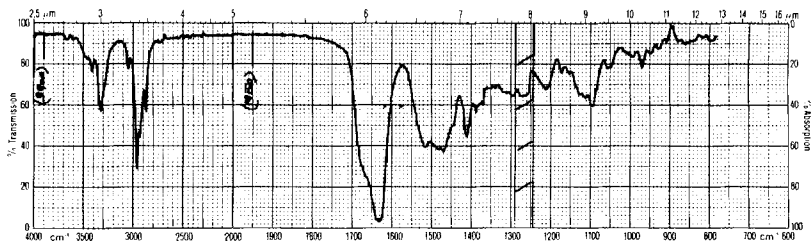
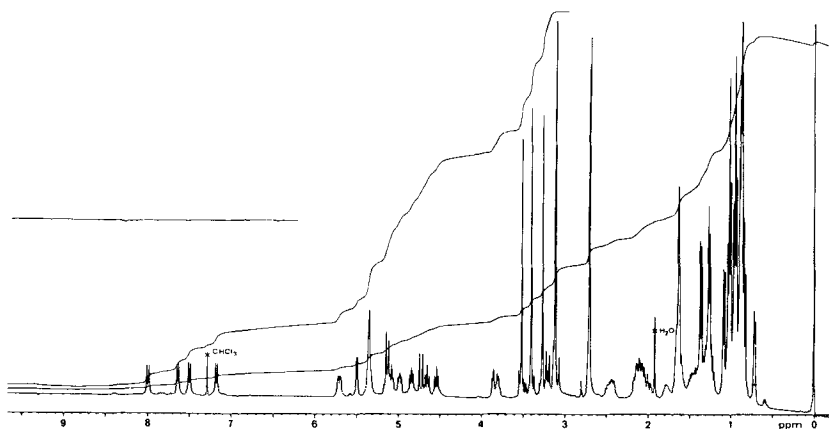
Tabelle 2. ¹³C-Chemische Verschiebungen der C₉-Aminosäure in Cyclosporin A bzw. der 3-Desoxy-C₉-aminosäure in Cyclosporin F (90,5 MHz, CDCl₃, TMS = 0 ppm)

C-Atom	Cyclosporin A δ (ppm)	Cyclosporin F δ (ppm)	Δδ (ppm)
α	58,9	55,0	+ 3,9
β	74,7	36,9	+ 37,8
γ	36,0	30,1	+ 5,9
γ-CH ₃	16,8	20,5	- 3,7
δ	35,5	40,6	- 5,1
ε	129,7	129,5	+ 0,2
ζ	126,1	126,7	- 0,6
η	17,8	17,8	0

Die übrigen vergleichbaren Signale (*Tab. 5*) zeigen nur geringfügige Diskrepanzen und illustrieren, dass offensichtlich zwischen Cyclosporin F und A keine weiteren Abweichungen in der Aminosäuresequenz bestehen.

Cyclosporin G. – Das IR.-Spektrum von Cyclosporin G (**7**) mit der dominierenden Amidbande bei 1630–1670 cm⁻¹ (*Fig. 5*) deckt sich praktisch mit den Spektren der Cyclosporine A, B und D. Auch bei den ¹H-NMR.-Spektren (*Fig. 6*) ist eine weitgehende Übereinstimmung festzustellen (u. a. 4 CONH, 7 CONCH₃, α-H von 11 AS, CH₃-CH=CH- und >CH-CHOH-CH< der C₉-AS).

Das ¹³C-NMR.-Spektrum des Cyclosporins G zeigt 58 Signale, die 63 C-Atomen zugeordnet werden (*Tab. 5*) und bestätigt das Vorliegen der oben abgeleiteten Strukturelemente.


 Fig. 5. IR-Spektrum von Cyclosporin G (7) in CH_2Cl_2

 Fig. 6. ^1H -NMR-Spektrum von Cyclosporin G (7) in CDCl_3 (360 MHz, TMS = 0 ppm)

Im EI.-Massenspektrum des Cyclosporins G ist der höchste Pik bei m/z 1215 zu beobachten, entsprechend der Bruttoformel $\text{C}_{63}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$, die auch aus den Elementaranalysen und dem ^{13}C -NMR-Spektrum resultiert. Ein deutlicher Fragmentpik bei m/z 1197 ist durch H_2O -Eliminierung aus der C_9 -Aminosäureinheit bedingt. Das Fragmentierungsmuster stimmt fast völlig mit dem MS. des mit Cyclosporin G (7) isomeren Cyclosporins D (4) überein und unterstreicht die nahe chemische Verwandtschaft der beiden Metabolite. Eine weitere Parallele zwischen 7 und 4 besteht in der leicht verlaufenden, säurekatalysierten Umlagerung von Cyclosporin G in Isocyclosporin G (24) (siehe Schema 3) und in der Hydrierung von 7 zu Dihydrocyclosporin G (23).

Bei der Aminosäureanalyse werden aus Cyclosporin G folgende Komponenten bestimmt: Sarkosin, Alanin (2), Valin und (erstmal aus einem Cyclosporin) Norvalin. Cyclosporin G enthält offensichtlich Norvalin anstelle der α -Aminobuttersäure im Cyclosporin A bzw. einer Valin-Einheit im Cyclosporin D.

Diese Folgerung wird durch den Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von Cyclosporin A (1) und G (7) erhärtet: die Aufnahmen der beiden Metabolite (Tab. 5) differieren im wesentlichen nur in der verschiedenen Lage dreier $\text{sp}^3\text{-C}$ -Signale. Die in Tabelle 3 zugeordneten Signalverschiebungen entsprechen dem Ersatz der α -Aminobuttersäure in 1 durch Norvalin in 7 (vgl. [15]). Die geringfügigen Abweichungen

der übrigen Signale machen es wahrscheinlich, dass die Cyclosporine A und G bis auf die AS Nr. 2 gleich gebaut sind.

Tabelle 3. ^{13}C -Chemische Verschiebungen der α -Aminobuttersäure in Cyclosporin A bzw. des Norvalins in Cyclosporin G (90,6 MHz, CDCl_3 , TMS=0 ppm)

C	Cyclosporin A α -Abu δ (ppm)	Cyclosporin G Nva δ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm) = $\delta_A - \delta_G$
α	48,7	47,1	+ 1,6
β	24,9	34,0	- 9,5
γ	9,8	18,6	- 8,8
δ	—	13,9	neu

Ein abschliessender Beweis wird durch kristallographische Untersuchungen des *O*-Jodacetyl-cyclosporins G (**26**) erbracht. Die Herstellung von **26** erfolgt, analog wie beim Cyclosporin E (*Schema 5*), über das entsprechende *O*-Chloracetylderivat **25** durch Chlor/Jod-Austausch. Die mit **26** bei 150 K durchgeführte Röntgenstrukturanalyse bestätigt die für Cyclosporin G postulierte Formel **7**. Die molekulare Konformation von Cyclosporin G erweist sich wiederum als β -Faltblattstruktur (AS 1–6) mit Schlinge (AS 7–11), stabilisiert durch drei strebenartige H-Brücken, und ist beinahe identisch mit den Konformationen der Cyclosporine A–D [11].

Cyclosporin H. – Das aus den Mutterlaugen der Cyclosporin A-Fractionen isolierte Cyclosporin H (**8**) zeigt eine ähnliche Polarität wie der Hauptmetabolit. Auffallend ist der gegenüber den anderen Cyclosporinen wesentlich kleinere negative Drehwert des Cyclosporins H ($[\alpha]_D^{20} = -112^\circ$, MeOH) sowie die Form der IR.-Bande bei 3300 cm^{-1} (*Fig. 7*). Das ^1H -NMR.-Spektrum von **8** bietet ein ungewöhnlich komplexes Bild (*Fig. 8*). Zwischen 2,7 und 3,4 ppm erscheint eine Vielzahl von *N*-Methylsignalen, die nach Zusatz von D_2O zu sieben Signalen von *N*-methylierten Aminosäuren kollabieren. Ferner ist bei 1,65 ppm ein weiteres Methylsignal sichtbar, das von einer endständigen, an einer Doppelbindung sitzenden CH_3 -Gruppe stammen dürfte. Schliesslich ist bei 3,9 ppm ein mit D_2O austauschbares Signal einer OH-Gruppe zu erkennen. Auch das ^{13}C -NMR.-Spektrum ist derart kompliziert, dass die genaue Zahl der C-Atome nicht bestimmt werden kann. Lediglich das Signal eines an Sauerstoff gebundenen C-Atoms bei ca. 76 ppm und die Signale zweier Vinyl- sp^2 -C-Atome bei ca. 130 ppm können mit einiger Sicherheit zugeordnet werden.

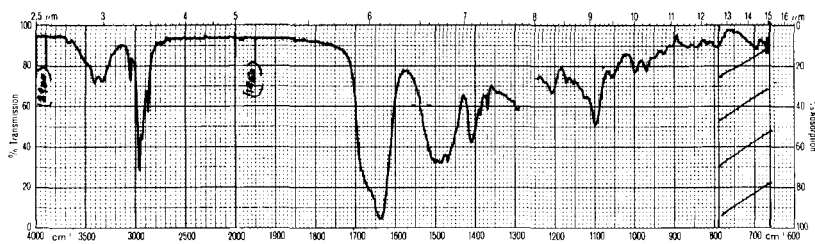


Fig. 7. IR.-Spektrum von Cyclosporin H (**8**) in CH_2Cl_2

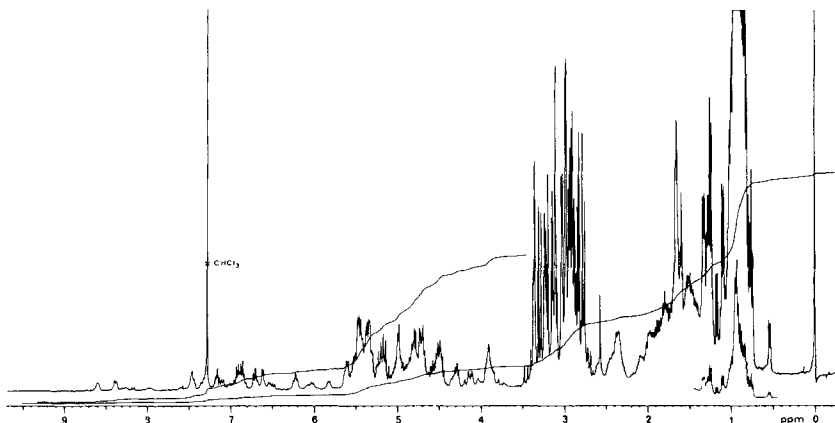


Fig. 8. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin H (**8**) in CDCl_3 (360 MHz, TMS=0 ppm)

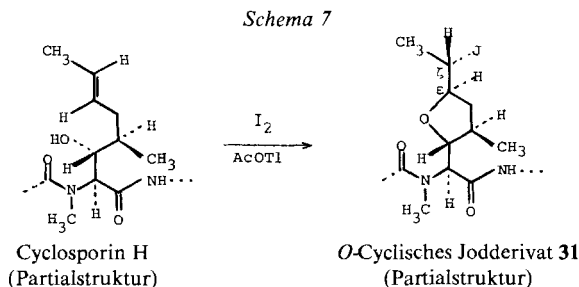
Im FD.- bzw. im EI.-Massenspektrum des Cyclosporins H erscheint der höchste Pik bei m/z 1202 ($M^+ + 1$) bzw. m/z 1201 (M^+); ferner sind im EI.-MS. noch Fragmentpik bei m/z 1183 und 1089 zu beobachten, die der Abspaltung von H_2O bzw. einer $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}$ -Einheit entsprechen. Aufgrund der resultierenden Bruttoformel $\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$, die mit den Elementaranalysen korrespondiert, sind die Cyclosporine H und A isomer. Die nach den Spektraldaten vorliegende *trans*-Doppelbindung (IR.-Bande bei 970 cm^{-1}) lässt sich durch Hydrierung von **8** zum Dihydrocyclosporin H (**27**) bestätigen.

Die Aminosäureanalyse (Tab. 6) kombiniert mit einer orientierenden dünn-schichtchromatographischen Untersuchung der Hydrolyseprodukte liefert aus Cyclosporin H die gleichen Bruchstücke wie aus Cyclosporin A: Artefakt der C_9 -Aminosäure (**21**), *N*-Methyl-leucin, *N*-Methyl-valin, Valin, α -Aminobuttersäure, Alanin und Sarkosin.

Cyclosporin H lässt sich unter Säurekatalyse in die entsprechende Isoverbindung **28** überführen (Schema 3). Im Gegensatz zum Cyclosporin A verläuft die *N,O*-Acyliwanderung aber äussert mühsam und mit geringen Ausbeuten; Cyclosporin H verhält sich in dieser Hinsicht ähnlich wie Cyclosporin E. Isocyclosporin H (**28**) ist durch die neu auftretende Esterbande im IR. bei 1735 cm^{-1} charakterisiert sowie durch ein breites Signal im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei 2,3 ppm (3 H), das der freigelegten sekundären Methylaminogruppe zukommt. Die Rückumlagerung der Isoverbindung in Cyclosporin H erfolgt ebenfalls schleppend und nur mit sehr schlechten Ausbeuten.

Ähnlich wie beim Cyclosporin E dürfte die Erschwerung der Umlagerung in die Iso-Form auch beim Cyclosporin H durch die Struktur der involvierten Aminosäure Nr. 11 verursacht werden (z. B. *N*-Entmethylierung). Versuche, Cyclosporin H mit dem isomeren Cyclosporin A bzw. mit Cyclosporin E *via* Permethylierungsreaktionen zu korrelieren, führen in diesem Fall nicht zum Ziel: das aus *O*-Acetyl-cyclosporin H (**29**) gewonnene Tetra-*N*-methyl-*O*-acetyl-cyclosporin H (**30**) ist mit dem Permethylierungsprodukt **15** aus *O*-Acetyl-cyclosporin A nicht identisch. Offenbar weist Cyclosporin H einen tiefergehenden Unterschied in der Sequenz oder Konfiguration der Aminosäuren auf.

Um den heiklen und aufwendigen *Edman-Abbau* [2] von Isocyclosporin H zur exakten Bestimmung der Sequenz und die präparative Isolierung der einzelnen Aminosäuren zur Konfigurationsbestimmung zu umgehen, wird Cyclosporin H in ein für kristallographische Messungen geeignetes Derivat übergeführt (*Schema 7*).



Cyclosporin H lässt sich, analog wie Cyclosporin A [2], mit Jod und Thallium(I)-acetat zu einem kristallisierten cyclischen, jodierten Derivat **31** umsetzen. Die Röntgenstrukturanalyse mit **31** [11] ergibt folgendes Resultat: Cyclosporin H enthält neben *D*-Alanin eine weitere *D*-Aminosäure, nämlich *N*-Methyl-*D*-valin an der Stelle 11. Die Sequenz der übrigen Bausteine und ihre Konfigurationen sind gleich wie im Cyclosporin A; die Isomerie zwischen den Cyclosporinen A und H beruht somit lediglich auf der verschiedenen Chiralität der *N*-Methylvalin-Einheit. Cyclosporin H besitzt zwar ebenfalls die typische, durch drei H-Brücken stabilisierte β -Faltblattstruktur (AS 1–5) mit Schlinge (AS 6–11); die *D*-Konfiguration des *N*-Methylvalins (AS 11) bedingt aber eine gegenüber den Cyclosporinen A–D massiv veränderte Konformation des Schlaufenfragmentes. Die Isopropyl-Seitenkette des *D*-Methylvalins (AS 11) bewirkt ferner, wie Modellbetrachtungen zeigen, eine sterische Abschirmung seiner Carbonylgruppe gegenüber dem Angriff der Hydroxylgruppe der *C*₉-Aminosäure. Mit dieser räumlichen Abweichung findet die beim Cyclosporin H erschwerte *N,O*-Acylumlagerung zur Isoverbindung eine Erklärung.

Cyclosporin I (9). – Cyclosporin I (**9**) wird als Spurenmetabolit aus Mutterlaugen der Cyclosporin-D-Fractionen isoliert. Im IR.-Spektrum (*Fig. 9*) dominiert die breite Amidbande bei 1630–1670 cm^{-1} ; bei 3320 und 1510–1530 cm^{-1} sind die Streck- und Deformationsschwingungen der sekundären Amide und bei 970 cm^{-1} die schwache Bande der *trans*-C=C-Bindung der *C*₉-Aminosäure erkennbar. Die im FD.-Massenspektrum auftretenden höchsten Pike bei *m/z* 1224 und 1202 entsprechen einem Molekulargewicht von 1201 (Addition von Na^+ bzw. H^+) und der Bruttoformel $\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$.

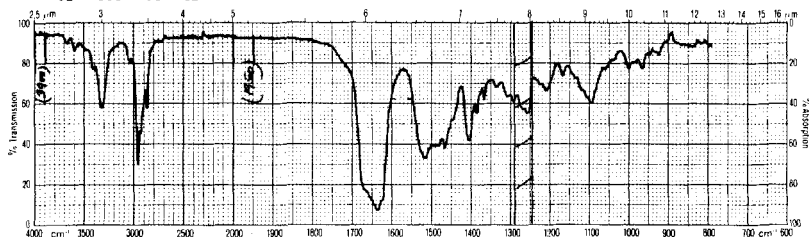


Fig. 9. IR.-Spektrum von Cyclosporin I (**9**) in CH_2Cl_2

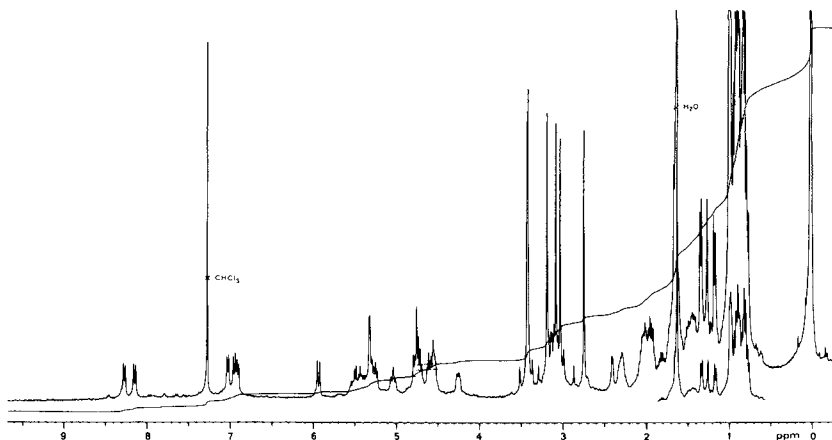


Fig. 10. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin I (**9**) in CDCl_3 (360 MHz, TMS = 0 ppm)

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin I (Fig. 10) sind die Signale von 5 CONH- und 6 CONCH₃-Gruppen ersichtlich sowie eine Methylgruppe in der Sequenz CH₃-CH=CH- und bei 2,4 ppm das Dublett einer OH-Gruppe. Das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Tab. 5) weist Signale für 62 C-Atome auf und lässt 11 Carboxamidgruppen, eine Vinylengruppierung und ein an Sauerstoff gebundenes Methin-C-Atom erkennen. Die Aminosäureanalyse ergibt 1 Sarkosin, 2 Alanin, 2 Valin und (neu) 1 Leucin. Nach Dünnschichtchromatographie der Hydrolyseprodukte können noch zusätzlich *N*-Methylvalin, *N*-Methylleucin und der Artefakt **21** aus der C₉-Aminosäure-Einheit identifiziert werden.

Die vorliegenden Befunde lassen auf eine nahe strukturelle Verwandtschaft zwischen den Cyclosporinen I (**9**) und D (**4**) schliessen: **9** enthält formal eine CH₂-Gruppe weniger und liefert Leucin als Hydrolyseprodukt. Für Cyclosporin I kann somit die Konstitution eines *N*-Desmethyl-cyclosporins D in Betracht gezogen werden. Allerdings ist die vorausgesetzte, weitgehende Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz nicht bewiesen, da die naheliegende Verknüpfung der beiden Metabolite **4** und **9** über ein gemeinsames Permethylderivat aus Materialmangel nicht durchführbar ist.

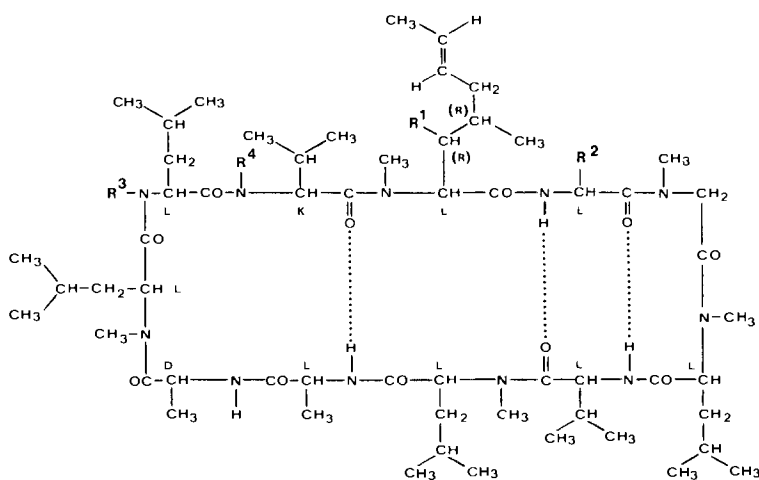
Zusätzliche Hinweise für die enge Beziehung zwischen **9** und **4** sowie für die Lokalisierung des Leucins im Cyclosporin I können mit Hilfe detaillierter $^1\text{H-NMR}$ -Studien unter Einbezug von NOE.-Doppelresonanzexperimenten gewonnen werden. Zunächst lässt sich ableiten, dass die für Cyclosporin D (**4**) charakteristische Valineinheit in Stellung 2 auch im Cyclosporin I vorliegt. Beim Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Cyclosporin A (**1**) mit Cyclosporin I (**9**) beobachtet man eine deutliche Verschiebung des α -H-Signals der Aminosäure 2 von 5,08 ppm (Abu in **1**) nach 4,55 ppm (Val in **9**), die mit dem Austausch von α -Aminobuttersäure gegen Valin gut vereinbar ist; in den Spektren der Cyclosporine A und D ist eine ähnliche Verlagerung des entsprechenden Protonensignals festzustellen ($\Delta \sim 0,33$ ppm).

Zur Lokalisierung des Leucins in **9** wird das Methylsignal bei 2,70 ppm (6 H) herangezogen, das bei Cyclosporin D den *N*-Methylaminosäuren **10** (MeLeu) und

11 (MeVal) zugeordnet wird. Die Integration dieses Signals beim Cyclosporin I ergibt nur eine *N*-Methylgruppe (3 H); eine der beiden fraglichen Aminosäuren ist also nicht methyliert. Besitzt Cyclosporin I, wie vorausgesetzt, eine im übrigen gleiche Aminosäuresequenz wie Cyclosporin D, dann liegt in 11 ein *N*-Methylvalin vor und Leucin nimmt die Stellung 10 ein. Cyclosporin I kann somit tentativ als [Leu¹⁰]-Cyclosporin D bezeichnet werden.

Abschliessende Bemerkungen. – Die Formeln der bis jetzt charakterisierten Cyclosporine A–I sind in *Schema 8* zusammengestellt. Das Bauprinzip dieser neutralen Oligopeptide besteht aus einem 33-gliedrigen Ring, der durch Verknüpfung von 11 Aminosäuren gebildet wird. Die neun Vertreter unterscheiden sich voneinander durch relativ geringfügige Variationen einzelner Elemente: Die Cyclosporine A, B, C, D und G differieren nur im Bau der Aminosäure Nr. 2, bei den Cyclosporinen E und I handelt es sich um Mono-demethylderivate der Cyclosporine A und D und beim Cyclosporin F um Desoxycyclosporin A.

Schema 8. Struktur der Cyclosporine A bis I



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	K ^{a)}
Cyclosporin A	OH	CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	L
Cyclosporin B	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	L
Cyclosporin C	OH	CH(OH)-CH ₃	CH ₃	CH ₃	L
Cyclosporin D	OH	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	L
Cyclosporin E	OH	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	L
Cyclosporin F	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	L
Cyclosporin G	OH	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	L
Cyclosporin H	OH	CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	D
Cyclosporin I	OH	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	L

a) K = Konfiguration der AS 11.

In Hinsicht auf die Biosynthese der Cyclosporine ist speziell die ungesättigte C₉-Aminosäure mit der Konfiguration 2*S*,3*R*,4*R* bemerkenswert. Auch die übrigen Aminosäure-Einheiten besitzen – mit zwei Ausnahmen – die (2*S*)-Konfiguration der natürlichen L-Reihe. Die Ausnahmen betreffen D-Alanin, das in allen Cyclosporinen in Stellung 8 vorliegt, sowie das nur in Cyclosporin H enthaltene N-Methyl-D-valin (AS 11).

Wie schon früher erwähnt, liegen die Cyclosporine A und C in dem durch Wildstämme von *T. inflatum* produzierten Wirkstoffkomplex als Hauptmetaboliten vor. Die übrigen Cyclosporine treten mengenmässig stark zurück und sind z. T. nur als Spurenmetabolite nachweisbar. Das Verhältnis der Komponenten ist jedoch nicht stabil und kann, wie neuere Untersuchungen zeigen, durch Zugabe geeigneter Aminosäuren verschoben werden [16]. Die Biosynthese der beschriebenen Cyclosporine verläuft somit nicht streng spezifisch, sondern kann durch kompetitiven Einbau extern angebotener Vorläufer gesteuert werden.

Experimenteller Teil

Allgemeines. – Die Schmelzpunkte (Smp.) wurden auf einem Apparat nach *Tottoli* bestimmt und sind korrigiert. Zur Säulenchromatographie diente Kieselgel (*Merck*, Korngrösse 0,063–0,2 mm). Dünnschichtchromatographie (DC.) erfolgte, wenn nicht anders angegeben, auf Kieselgelfertigplatten *Merck* oder *Polygram Sil G*-Folien (*Macherey-Nagel & Co.*); Detektion mit Jod oder *Dragendorff*-Reagens. Die UV-Spektren wurden in Methanol auf einem *Beckmann*-Spektralphotometer Mod. *DK 2* aufgenommen. Die IR-Spektren (Angabe in cm⁻¹) wurden, soweit nicht anders vermerkt, in CH₂Cl₂ auf einem *Perkin-Elmer*-IR-Spektrophotometer Mod. 21 mit Filter bestimmt. Die Aufnahmen der ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren (in CDCl₃, wenn nicht anders angegeben) erfolgten auf einem *Bruker WH-360* oder *HX-90-E*; interner Standard: Tetramethylsilan = 0 ppm. Die Elektronenstoss-Ionisations (EI)- bzw. Felddesorptions (FD)-Massenspektren (Angabe in *m/z*) wurden auf einem *CEC 21-110B*-Spektrometer aufgenommen.

Weitere Abkürzungen: RT. = Raumtemperatur.

Isolierung der Cyclosporine E, F, G, H und I. – Die durch aerobe Submers-Züchtung von *Tolypocladium inflatum* Gams (NRRL 8044) gewonnenen Kulturbrühen wurden wie früher beschrieben [1] [2] aufgearbeitet. Die Auftrennung des rohen Cyclosporin-Metabolitenkomplexes in die einzelnen Komponenten erfolgte nach dem im *Schema 2* angegebenen Weg (vgl. auch [6]).

Cyclosporin E (5). Die Isolierung von Cyclosporin E aus Randfraktionen, die ein Gemisch der Cyclosporine A, B und E enthalten, ist in [6] beschrieben.

Cyclosporin F (6) und G (7). Zur Gewinnung der Cyclosporine F und G wurden 38 g einer Mutterlauge aus der Kristallisation von Cyclosporin D an 3 kg Kieselgel mit wassergesättigtem Essigester chromatographiert, wobei in den zuerst eluierten Fraktionen Cyclosporin D abgetrennt wurde und die späteren Fraktionen (25,4 g) die Cyclosporine F und G, begleitet von verschiedenen Nebenkomponenten, enthielten. Zur weiteren Anreicherung wurde das Gemisch zuerst an 3 kg Kieselgel mit CHCl₃/CH₃OH 98:2 (→ 15,9 g Gemisch F + G) und anschliessend zur Auftrennung an 1,5 kg Kieselgel mit Hexan/Aceton 2:1 chromatographiert; dabei wurden in sehr stark angereicherter Form zuerst Cyclosporin F und nachfolgend Cyclosporin G eluiert. Zur Reingewinnung wurden die F-Anteile (9,78 g) aus Äther/Petroläther 1:4 bei RT. kristallisiert, wobei 8,0 g DC.-einheitliches, reines Cyclosporin F in Form farbloser Polyeder anfiel. Die Kristallisation der G-Fractionen (2,66 g) aus Äther/Petroläther 1:1 bei RT. ergab 1,23 g reines Cyclosporin G (farblose Polyeder) und eine an G sehr stark angereicherte Mutterlauge von 1,41 g.

Cyclosporin H (8). Zur Gewinnung von Cyclosporin H wurden Mutterlaugen aus der Rohkristallisation von Cyclosporin A an Kieselgel mit wassergesättigtem Essigester chromatographiert. Das dabei eluierte Cyclosporin H (im Gemisch mit wenig A) wurde zur weiteren Anreicherung in der minimalen Menge Äther unter Erwärmen gelöst, beim Abkühlen auf RT. fiel das Cyclosporin H spontan aus, wäh-

rend das restliche Cyclosporin A in der Lösung verblieb. Die Reingewinnung erfolgte durch Kristallisation aus der 8-fachen Menge Äther bei +7° und ergab 47,9 g einheitliches Cyclosporin H.

Cyclosporin I (9). Bei der Aufarbeitung auf Cyclosporin D fiel eine Randfraktion an, die neben Cyclosporin D noch eine weitere Komponente enthielt. Die anschliessende Kristallisation aus Aceton bei -15° brachte eine weitgehende Abtrennung des Cyclosporins D; in der Mutterlauge verblieb Cyclosporin I neben wenig D. Chromatographie an Kieselgel mit Hexan/Aceton 2:1 ergab 105 mg DC.-einheitliches, amorphes Cyclosporin I.

Tabelle 4. *R_f-Werte der Cyclosporine A bis I in verschiedenen DC.-Systemen^{a)}*

Metabolit	Essigester ^{b)}	Aceton/Hexan 1:1	CHCl ₃ /CH ₃ OH 96:4	Äther/CH ₃ OH 9:1
Cyclosporin D	0,56	0,45	0,49	0,48
Cyclosporin F ^{c)}	0,48	0,47	0,53	0,45
Cyclosporin G	0,46	0,41	0,47	0,43
Cyclosporin I	0,45	0,30	0,41	0,40
Cyclosporin H	0,41	0,37	0,40	0,46
Cyclosporin A	0,38	0,35	0,43	0,37
Cyclosporin E	0,31	0,30	0,44	0,28
Cyclosporin B	0,21	0,27	0,35	0,27
Cyclosporin C	0,15	0,21	0,27	0,22

a) Kieselgel-Fertigplatten *Merck*; Detektion: Joddampf; Laufstrecke 10 cm (wenn nicht anders angegeben).

b) Laufstrecke 3 × 10 cm.

c) Anfärbung mit Joddampf schwächer als übrige Cyclosporine.

Charakterisierung der Cyclosporine E, F, G, H und I. – **Cyclosporin E (5).** Aus Äther bei +7° farblose, prismatische Nadeln vom Smp. 142–144°, $[\alpha]_D^{20} = -179^\circ$ ($c = 0,54$, CHCl₃), $[\alpha]_D^{20} = -186^\circ$ ($c = 0,51$, CH₃OH). – UV.: Endabsorption gegen 200 nm. – IR. (*Fig. 1*): 3450 br. (OH), 3320 (sek. Amid, ν NH), 1630–1680 (Amid, ν CO), 1510–1530 (sek. Amid, δ NH), 970 (CH=CH, *trans*). – ¹H-NMR. (*Fig. 2*): 8,4; 8,1; 7,8; 7,45 und 7,05 (*d*, 5 CONH); 4,6–5,9 (13 H, H-C(α) der AS 1 bis 11, H-C(ϵ) und H-C(ζ) der C₉-AS); 4,9 (1 H, mit D₂O austauschbar, OH der C₉-AS); 3,6 (*m*, 1 H, H-C(β) der C₉-AS); 3,5 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,4 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,3 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,23 (*d*, 1 H, H-C(α) der AS 3); 3,15 (2 *s*, 6 H, 2 CONCH₃); 2,9 (*s*, 3 H, CONCH₃); 0,6–2,7 (*m*, 70 H; darunter 1,65 (*d*, 3 H, 3 H-C(η) der C₉-AS)). – ¹³C-NMR.: siehe *Tab. 5*. – EI-MS.: 1187 (*M*⁺), 1169 (*M*⁺-H₂O), 1114 (1169-C₄H₇, aus C₉-AS), 1086 (1169-C₆H₁₁, aus C₉-AS).

C₆₁H₁₀₉N₁₁O₁₂ Ber. C 61,6 H 9,2 N 13,0 O 16,2%
(1188,608) Gef. „ 61,5 „ 9,3 „ 13,0 „ 16,5%

Cyclosporin F (6). Aus Äther/Petroläther 1:4 farblose Polyeder vom Smp. 183–184°, $[\alpha]_D^{20} = -290^\circ$ ($c = 1,15$, CHCl₃), $[\alpha]_D^{20} = -218^\circ$ ($c = 1,00$, CH₃OH). – UV.: Endabsorption gegen 200 nm. – IR. (*Fig. 3*): 3320 (sek. Amid, ν NH), 1630–1670 (Amid, ν CO), 1520–1540 (sek. Amid, δ NH), 970 (CH=CH *trans*). – ¹H-NMR. (*Fig. 4*): 8,46; 8,06; 7,45 und 7,40 (4 *d*, 4 CONH); 4,4–5,75 (13 H, H-C(α) der AS 1 bis 11, H-C(ϵ) und H-C(ζ) der C₉-AS); 3,4 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,35 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,28 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,2 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,1 (*s*, 3 H, CONCH₃); 3,15 (*d*, 1 H, H-C(α) der AS 3); 2,7 (*s*, 6 H, 2 CONCH₃); 0,7–2,5 (*m*, 72 H; darunter 1,6 (*d*, 3 H, 3 H-C(η) der C₉-AS)). – ¹³C-NMR.: siehe *Tab. 5*. – EI-MS.: 1185 (*M*⁺), 1130 (*M*⁺-C₄H₇, aus C₉-AS).

C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₁ Ber. C 62,8 H 9,4 N 13,0 O 14,8%
(1186,636) Gef. „ 62,8 „ 9,5 „ 13,0 „ 14,8%

Cyclosporin G (7). Aus Äther/Petroläther 1:1 farblose Polyeder vom Smp. 196–197°, $[\alpha]_D^{20} = -245^\circ$ ($c = 1,00$, CHCl₃), $[\alpha]_D^{20} = -191^\circ$ ($c = 1,04$, CH₃OH). – UV.: Endabsorption gegen 200 nm. – IR. (*Fig. 5*): 3420–3500 (OH), 3320 (sek. Amid, ν NH), 1630–1670 (Amid, ν CO), 1510–1520 (sek. Amid, δ NH), 970 (CH=CH, *trans*). – ¹H-NMR. (*Fig. 6*): 8,0; 7,65; 7,5 und 7,17 (4 *d*, 4 CONH); 4,5–5,7 (13 H, H-C(α) der

AS 1 bis 11), H–C(ϵ) und H–C(ζ) der C₉–AS); 3,9 (d, 1 H, mit D₂O austauschbar, OH der C₉–AS); 3,8 (t, 1 H, H–C(β) der C₉–AS); 3,53 (s, 3 H, CONCH₃); 3,4 (s, 3 H, CONCH₃); 3,27 (s, 3 H, CONCH₃); 3,2 (d, 1 H, H–C(α) der AS 3); 3,1 (s, 6 H, 2 CONCH₃); 2,7 (s, 6 H, 2 CONCH₃); 0,7–2,5 (m, 72 H; darunter 1,63 (br. s, 3 H, 3 H–C(η) der C₉–AS)). – ¹³C-NMR.: siehe Tab. 5. – EI-MS.: 1215 (M⁺), 1197 (M⁺–H₂O), 1142 (1197–C₄H₇, aus C₉–AS), 1103 (M⁺–C₇H₁₂O, aus C₉–AS).

C₆₃H₁₁₃N₁₁O₁₂ Ber. C 62,2 H 9,4 N 12,7 O 15,8%
(1216,662) Gef. „ 62,0 „ 9,4 „ 12,6 „ 16,3%

Cyclosporin H (8). Aus Äther farblose prismatische Nadeln vom Smp. 162–165°, [α]_D²⁰ = –177° (c = 0,75, CHCl₃), [α]_D²⁰ = –112° (c = 0,71, CH₃OH). – UV.: Endabsorption gegen 200 nm. – IR. (Fig. 7): 3420–3450 (OH), 3330 (sek. Amid, ν NH), 1630–1660 (Amid, ν CO), 1510–1520 (sek. Amid, δ NH), 970 (CH = CH, *trans*). – ¹H-NMR. (Fig. 8): komplexes Signalbild. – ¹³C-NMR.: komplexes Signalbild. – EI-MS.: 1201 (M⁺), 1183 (M⁺–H₂O), 1089 (M⁺–C₇H₁₂O, aus C₉–AS). – FD-MS.: 1202 (M⁺ + 1).

C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₂ Ber. C 61,9 H 9,3 N 12,8 O 16,0%
(1202,635) Gef. „ 61,9 „ 9,4 „ 12,9 „ 16,2%

Cyclosporin I (9). Weisses amorphes Pulver; Smp. 137–140°, [α]_D²⁰ = –220° (c = 0,71, CHCl₃), [α]_D²⁰ = –183° (c = 0,73, CH₃OH). – UV.: Endabsorption gegen 200 nm. – IR. (Fig. 9): 3320 (sek. Amid, ν NH), 1630–1670 (Amid, CO), 1510–1530 (sek. Amid, δ NH), 970 (CH = CH, *trans*). – ¹H-NMR. (Fig. 10): 8,28; 8,15; 7,05; 6,95 und 6,90 (5 d, 5 CONH); 4,2–6,0 (14 H, H–C(α) der AS 1 bis 11, H–C(β), H–C(ϵ) und H–C(ζ) der C₉–AS); 3,4 (2 s, 6 H, 2 CONCH₃); 3,2 (s, 3 H, CONCH₃); 3,15 (d, 1 H, H–C(α) der AS 3); 3,1 (s, 3 H, CONCH₃); 3,05 (s, 3 H, CONCH₃); 2,78 (s, 3 H, CONCH₃); 2,4 (d, mit D₂O austauschbar, 1 H, OH der C₉–AS); 0,8–2,35 (m, 72 H; darunter 1,65 (d, 3 H, 3 H–C(η) der C₉–AS)). – ¹³C-NMR.: siehe Tab. 5. – FD-MS. 1224 (M⁺ + 23), 1202 (M⁺ + 1).

Tabelle 5. ¹³C-NMR-Spektren der Cyclosporine A, D, E, F, G und I bei 90,5 MHz, in CDCl₃
(TMS = 0 ppm)

(AS-Nr.)-C-Atom	CyA	CyD	CyE	CyF	CyG	CyI
11 × CO	173,72	174,15	174,94	173,95	173,93	174,36
(Amid)	173,72	174,01	174,94	173,69	173,84	173,79
	173,46	173,84	173,86	173,44	173,56	173,79
	173,46	173,64	173,56	173,44	173,56	172,50
	171,58	171,72	171,71	172,51	171,67	172,50
	171,18	171,34	171,46	171,69	171,29	172,31
	171,10	171,25	171,42	171,35	171,18	171,79
	170,31	170,90	170,80	171,01	170,39	170,59
	170,31	170,51	169,94	170,90	170,30	169,83
	170,02	170,21	169,89	170,49	170,12	169,09
	169,99	170,21	168,55	170,30	170,09	168,65
1- α	58,9	59,1	59,0	55,0	58,9	59,1
β	74,7	75,0	76,4	36,9	74,8	75,8
γ	36,0	36,1	37,7	30,1	36,1	36,0
γ -CH ₃	16,8	17,1	17,5	20,5	16,9	14,9
δ	35,5	35,8	36,3	40,6	35,6	35,8
ϵ	129,7	129,9	129,9	129,5	129,8	128,4
ζ	126,1	126,2	126,2	126,7	126,2	127,8
η	17,8	17,9	17,9	17,8	17,9	18,0
2- α	48,7	54,0	49,3	48,8	47,1	53,9
β	24,9	30,3	25,3	24,9	34,0	31,3
γ	9,8	18,2	10,3	10,0	18,6	16,0
γ'	–	19,4	–	–	–	19,1
δ	–	–	–	–	13,9	–
3- α	50,3	50,5	50,6	50,0	50,4	48,8
N-CH ₃	39,4	39,6	39,5	39,3	39,5	39,1

(AS-Nr.)-C-Atom	CyA	CyD	CyE	CyF	CyG	CyI
5- α	55,3	55,4	57,1	55,2	55,4	54,2
β	31,1	31,2	31,5	31,2	31,1	34,3
γ	18,4	18,4	18,6	18,3	18,4	18,5
γ'	18,7	18,7	18,7	18,5	18,7	18,6
11 α	57,9	58,0	52,6	58,4	57,9	57,3
β	29,0	29,3	29,1	29,7	29,1	27,1
γ	19,8	20,0	19,0	19,7	19,9	19,1
γ'	20,2	20,4	19,8	20,2	20,3	19,5
Ala(a)- α	48,6	48,6	48,9	48,4	48,7	47,7
β	15,9	15,9	16,2	15,1	15,9	15,9
Ala(b)- α	45,1	45,2	46,9	44,8	45,1	45,6
β	18,1	18,2	18,2	17,8	18,2	18,1
Leu- α	57,6	57,7	57,9	57,4	57,6	60,3
	55,5	55,7	55,9	55,5	55,6	55,2
	55,4	55,7	55,7	55,3	55,5	54,9
	48,3	48,4	49,5	48,0	48,3	46,6
Leu- β	40,7	40,8	39,1	40,7	40,8	41,6
	39,0	39,2	39,1	39,4	39,1	37,6
	37,4	37,6	38,4	37,4	37,5	36,8
	36,0	36,1	36,7	36,2	36,1	36,0
Leu- γ	24,9	25,0	25,0	24,8	25,0	25,1
	24,6	24,8	24,8	24,6	24,7	24,8
	24,5	24,6	24,7	24,4	24,6	24,6
	23,6	23,7	23,2	23,9	23,7	23,1
Leu- δ, δ'	25,3	25,5	25,4	25,0	25,4	25,2
	23,8	24,1	24,1	24,1	23,9	23,6
	23,8	23,9	23,4	23,9	23,8	23,4
	23,4	23,5	22,9	23,8	23,4	23,1
	23,3	23,5	22,9	23,5	23,4	22,8
	21,9	22,0	22,7	22,0	22,0	22,5
	21,8	21,9	21,4	21,4	21,9	21,6
	21,1	21,2	21,2	21,0	21,2	21,3
N-CH ₃	33,9	34,3	35,5	31,8	34,0	33,3
	31,5	31,6	32,8	31,6	31,5	30,7
	31,3	31,4	31,9	31,3	31,3	30,5
	29,7	29,9	31,2	30,0	29,8	29,9
	29,7	29,8	30,0	29,9	29,8	28,8
	29,5	29,6	–	29,7	29,6	–

Orientierende Aminosäureanalyse. – Die Cyclosporine A bis I wurden durch 16stdg. Erhitzen mit 6N HCl auf 115° hydrolysiert und die Spaltprodukte auf einem Aminosäure-Analyser BIOTRONIK LC 2000 untersucht. Die identifizierten Aminosäuren sind (in molaren Verhältnissen) in *Tabelle 6* angegeben³⁾.

3) N-Methylierte Aminosäuren werden wegen ihrer schwachen Farbreaktion mit Ninhydrin nicht erfasst mit Ausnahme des Sarkosins, das aber erfahrungsgemäss schwankende Werte liefert.

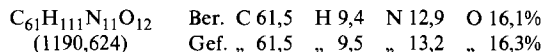
Tabelle 6. Analyse der Hydrolyseprodukte nach Moore & Stein [17]

Metabolit	Aminosäure (gef.)/theor.						
	Sar	Ala	α -Abu	Thr	Val	Nva	Leu
Cyclosporin A	(0,46) 1	(2,07) 2	(0,81) 1	–	(1,05) 1	–	–
Cyclosporin B	(0,64) 1	(2,99) 3	–	–	(1,04) 1	–	–
Cyclosporin C	(0,43) 1	(2,06) 2	–	(0,79) 1	(0,94) 1	–	–
Cyclosporin D	(0,39) 1	(1,99) 2	–	–	(2,01) 2	–	–
Cyclosporin E ^{a)}	(0,72) 1	(2,01) 2	(1,03) 1	–	(1,95) 2	–	–
Cyclosporin F	(0,65) 1	(2,05) 2	(0,89) 1	–	(0,95) 1	–	–
Cyclosporin G	(0,98) 1	(2,03) 2	–	–	(0,77) 1	(0,99) 1	–
Cyclosporin H	(0,82) 1	(2,14) 2	(0,98) 1	–	(1,02) 1	–	–
Cyclosporin I ^{a)}	(0,61) 1	(1,68) 2	–	–	(1,81) 2	–	(0,77) 1

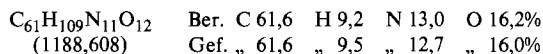
a) Nach 48stdg. Erhitzen.

Die orientierende dünn-schicht-chromatographische Untersuchung der Hydrolyseprodukte erfolgte auf *Polygram-Folien Cel 400*, Fließmittel Propanol/Wasser 4:1, Detektion mit Ninhydrin.

Dihydrocyclosporin E (10). Zur Suspension von 25 mg vorhydrierter 10proz. Pd/C in 1 ml Äthanol wurden 250 mg (2,1 mmol) Cyclosporin E (**5**) in 2,5 ml Äthanol gegeben und bei RT. bis zur beendeten H₂-Aufnahme hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde die Lösung eingedampft, wobei ein amorphes weisses Pulver anfiel. Kristallisation aus Äther ergab 231 mg **10** als feine Nadeln vom Smp. 156–158°, $[\alpha]_D^{20} = -177^\circ$ ($c = 0,76$, CHCl₃). – IR.: wie **5**, hingegen fehlt die Bande bei 970 (CH=CH). – ¹H-NMR.: Abwesenheit der Signale bei 5,35 (*m*, 2 H, H-C(ϵ)) und H-C(ζ) der C₉-AS) und 1,6 (*d*, 3 H, 3 H-C(η)) der C₉-AS).



Isocyclosporin E (11). Die Lösung von 357 mg (0,3 mmol) **5** und 72 mg (0,75 mmol) Methansulfonsäure in 3,6 ml Dioxan wurde 40 Std. auf 50° erwärmt. Nach Abkühlen auf RT. und Zugabe von 90 mg Natriumacetat wurde vom abgeschiedenen Salz abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand an 50 g Kieselgel mit CHCl₃/CH₃OH 98:2 chromatographiert: 107 mg (30,5%) DC.-einheitliches **11** als amorphes weisses Pulver, Smp. 139–142°, $[\alpha]_D^{20} = -160^\circ$ ($c = 0,56$, CHCl₃). – UV.: Endabsorption. – IR.: 1735 (Ester). – ¹H-NMR.: 6,6–8,1 (*m*, 5 H, 5 CONH); 2,85 (*s*, 3 H), 3,1 (2 *s*, 6 H), 3,3 (*s*, 3 H) und 3,35 (*s*, 3 H), (total 5 CONCH₃); 2,3 (*s*, 3 H, NCH₃).



O-Acetyl-cyclosporin A (14). Die Lösung von 24,0 g (20 mmol) **1** und 3,675 g (30 mmol) 4-Dimethylaminopyridin in 320 ml Acetanhydrid wurde 20 Std. bei RT. gerührt, anschliessend mit Wasser versetzt und 3mal mit Äther extrahiert; die vereinigten Extrakte wurden mit 0,5N HCl und mit Wasser gewaschen und eingedampft. Das Rohprodukt wurde an 2 kg Kieselgel mit CHCl₃/CH₃OH 98:2 chromatographiert. Nach Kristallisation der DC.-einheitlichen Fraktionen aus Äther resultierten 13,3 g (53%) **14** in Form rechteckiger Plättchen, Smp. 230–231°; $[\alpha]_D^{20} = -312^\circ$ ($c = 0,52$, CHCl₃), $[\alpha]_D^{20} = -246^\circ$ ($c = 0,81$,

CH₃OH). – IR.: 1735 und 1240 (Ester). – ¹H-NMR.: 2,0 (s, 3 H, CH₃COO). – MS.: 1243 (M⁺), 1183 (M⁺–CH₃COOH), 1128 (1183–C₄H₇, aus C₉–AS).

C ₆₄ H ₁₁₃ N ₁₁ O ₁₃	Ber. C 61,8	H 9,2	N 12,4	O 16,7%
(1244,672)	Gef. „ 61,7	„ 9,2	„ 12,6	„ 17,0%

Tetra-N-methyl-O-acetyl-cyclosporin A (15). Die Lösung von 1,245 g (1 mmol) **14** in 10 ml trockenem DMF wurde mit 3,41 g (24 mmol) frisch destilliertem Methyljodid und 3,24 g (14 mmol) Silberoxid versetzt und 22 Std. bei RT. im Dunkeln gerührt. Anschliessend wurde der Niederschlag abfiltriert, mit CHCl₃ nachgewaschen und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wurde in CHCl₃ aufgenommen, die Lösung über *Hyflo* filtriert und eingedampft. Das Rohprodukt (1,33 g) wurde an 200 g Kieselgel mit CHCl₃/CH₃OH 98:2 chromatographiert; anschliessende Nachchromatographie der Spitzenfraktionen (1,01 g) an 100 g Kieselgel mit Äther/Methanol 9:1 ergab 618 mg (48%) DC.-einheitliches **15** als amorphes weisses Pulver vom Smp. 161–165°, [α]_D²⁰ = –273° (c = 1,33, CHCl₃), [α]_D²⁰ = –236° (c = 1,22, CH₃OH). – IR.: 1735 und 1240 (Ester), 1630–1660 (tert. Amid); Banden bei 3320 (sek. Amid, νNH) und 1520–1540 (sek. Amid, δNH) fehlen. – ¹H-NMR.: 2,05 (s, 3 H, CH₃COO); 2,65–3,2 (m, 33 H, 11 CONCH₃); Signale bei 7,4–8,7 (Amidprotonen) fehlen. – ¹³C-NMR.: 172,94; 172,44; 172,33; 171,07; 170,92; 170,91; 170,65; 170,09; 170,01; 169,32; 169,07 (11 CON<); 168,25 (CH₃COO); 129,3 und 127,0 (C(ε) und C(ζ) der C₉–AS); 73,9 (C(β) der C₉–AS); 10,6–60,2 (CH₃, CH₂, CH). – EI-MS.: 1299 (M⁺), 1239 (M⁺–CH₃COOH), 1184 (1239–C₄H₇, aus C₉–AS).

C ₆₈ H ₁₂₁ N ₁₁ O ₁₃	Ber. C 62,8	H 9,4	N 11,8	O 16,0%
(1300,780)	Gef. „ 62,6	„ 9,5	„ 12,0	„ 16,4%

O-Acetyl-cyclosporin E (12). Die Lösung von 1,19 g (1 mmol) **5** und 367 mg (3 mmol) 4-Dimethylaminopyridin in 10 ml Acetanhydrid/Pyridin 1:1 wurde 2 Std. bei 45° stehen gelassen und dann eingedampft. Der Rückstand wurde in CHCl₃ aufgenommen und die Lösung 3mal mit H₂O gewaschen und wiederum eingedampft. Das nun erhaltene Rohprodukt wurde an 100 g Kieselgel mit CHCl₃/CH₃OH 98:2 chromatographiert und dann – zur Abtrennung von nicht umgesetztem **5** – an Kieselgel mit Äther/Methanol 19:1 nachchromatographiert. Es resultierten 850 mg (69%) **12**; aus Äther/Petroläther 1:1 Kristalle vom Smp. 205–206°, [α]_D²⁰ = –269° (c = 0,73, CHCl₃), [α]_D²⁰ = –244° (c = 0,76, CH₃OH). – IR.: 1740 und 1235 (Ester). – ¹H-NMR.: 2,0 (s, 3 H, CH₃COO).

C ₆₃ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₃	Ber. C 61,5	H 9,1	N 12,5	O 16,9%
(1230,645)	Gef. „ 61,4	„ 9,0	„ 12,2	„ 17,3%

Penta-N-methyl-O-acetyl-cyclosporin E (13). Durch Behandlung mit CH₃I/Ag₂O im DMF wie bei **15** wurden 493 mg (0,4 mmol) **12** permethyliert. Chromatographie des Rohproduktes an Kieselgel mit Äther/Methanol 9:1 lieferte 207 mg (40%) **13**, Smp. 160–163°, [α]_D²⁰ = –256° (c = 0,65, CHCl₃), [α]_D²⁰ = –229° (c = 0,75, CH₃OH). – IR.: 1735 und 1240 (Ester), 1630–1660 (tert. Amid); Banden bei 3320 (sek. Amid, νNH) und 1520–1540 (sek. Amid, δNH) fehlen. – ¹H-NMR.: 2,05 (s, 3 H, CH₃COO); 2,6–3,3 (m, 33 H, 11 CONCH₃); Signale bei 7,4–8,7 (Amidprotonen) fehlen. – ¹³C-NMR.: wie **15**. – FD-MS.: 1301 (M⁺ + 1).

C ₆₈ H ₁₂₁ N ₁₁ O ₁₃	Ber. C 62,8	H 9,4	N 11,8	O 16,0%
(1300,780)	Gef. „ 62,6	„ 9,4	„ 12,3	„ 15,7%

Das Permethylierungsprodukt **13** erwies sich aufgrund der analytischen und spektralen Daten (DC., IR., ¹H- und ¹³C-NMR., MS.) als identisch mit Tetra-*N*-methyl-*O*-acetyl-cyclosporin A (**15**).

O-Chloracetyl-cyclosporin E (16). Die Lösung von 1,07 g (0,9 mmol) **5** in 5 ml abs. Pyridin wurde mit 3,69 g (21,6 mmol) Chloressigsäureanhydrid versetzt und 6 Std. bei 45° gerührt. Anschliessend wurde mit Wasser verdünnt, mit Äther extrahiert, die Ätherextrakte mit Wasser gewaschen und das Rohprodukt an 100 g Kieselgel mit Äther/Methanol 95:5 chromatographiert. Die DC.-einheitlichen Fraktionen wurden aus Äther/Petroläther kristallisiert: 818 mg (72%) **16** als farblose Prismen vom Smp. 226–227°, [α]_D²⁰ = –269° (c = 0,54, CHCl₃); [α]_D²⁰ = –238° (c = 0,55, CH₃OH). – IR.: 1760 (Ester). – ¹H-NMR.: 4,0 (s, 2 H, ClCH₂COO). – EI-MS.: 1265/1263 (M⁺), 1169 (M⁺–ClCH₂COOH).

C ₆₃ H ₁₁₀ ClN ₁₁ O ₁₃	Ber. C 59,8	H 8,8	Cl 2,8	N 12,2	O 16,4%
(1265,090)	Gef. „ 59,8	„ 8,9	„ 2,8	„ 12,1	„ 16,2%

O-Jodacetyl-cyclosporin E (17). Die Lösung von 506 mg (0,4 mmol) **16** in 4 ml Aceton wurde 9 Std. mit 600 mg (4 mmol) NaI unter Rückfluss erhitzt. Vom abgeschiedenen Salz wurde abfiltriert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand zwischen Äther und Wasser verteilt. Die Ätherextrakte wurden

eingedampft und an 60 g Kieselgel mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 98,5:1,5 gereinigt. Kristallisation der DC.-einheitlichen Fraktionen aus Äther/Petroläther 1:1 ergab 475 mg (87%) **17** als farblose Prismen vom Smp. 246–247°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -256^\circ$ ($c=0,58$, CHCl_3), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -229^\circ$ ($c=0,60$, CH_3OH). – IR.: 1735 (Ester). – $^1\text{H-NMR.}$: 3,6 (s, 2 H, ICH_2COO). – FD.-MS.: 1355 (M^+), 1227 ($M^+ - \text{HI}$), 1169 ($M^+ - \text{ICH}_2\text{COOH}$).

$\text{C}_{63}\text{H}_{110}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$	Ber. C 55,8	H 8,2	1,9,4	N 11,4	O 15,3%
(1356,541)	Gef. „ 55,9	„ 8,5	„ 9,7	„ 11,0	„ 15,7%

Dihydrocyclosporin F (18). Die Hydrierung von 3,54 g (3 mmol) Cyclosporin F (**6**) erfolgte wie bei **10** beschrieben und lieferte nach Kristallisation des Rohproduktes aus Petroläther bei -16° Kristalle von **18**, Smp. 164,5–166,5°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -288^\circ$ ($c=0,42$, CHCl_3), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -211^\circ$ ($c=0,54$, CH_3OH). – IR.: wie **6**, hingegen fehlt Bande bei 970 ($\text{CH}=\text{CH}$). – $^1\text{H-NMR.}$: Abwesenheit der Signale bei 5,3 (m , 2 H, $\text{H-C}(\epsilon)$) und $\text{H-C}(\zeta)$ der $\text{C}_9\text{-AS}$) und 1,6 (d , 3 H, 3 $\text{H-C}(\eta)$ der $\text{C}_9\text{-AS}$).

$\text{C}_{62}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{11}$	Ber. C 62,6	H 9,6	N 13,0	O 14,8%
(1188,652)	Gef. „ 62,5	„ 9,8	„ 12,9	„ 15,0%

Hydrolyse von Cyclosporin F; Isolierung der freien Aminosäuren. Das Gemisch von 4 g Cyclosporin F und 100 ml 6N HCl wurde 20 Std. unter Rückfluss erhitzt. Der Eindampfungsrückstand wurde in wenig Wasser gelöst, durch eine schwach basische Ionenaustauschersäule (DOWEX AG 3-X4, Acetat-form) filtriert und so lange mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat Ninhydrin-negativ war. Nach Eindampfen des Eluats wurde das rohe Aminosäuregemisch (4,3 g) an 1,2 kg Cellulosepulver (Avicel PH 101) mit zu 95% wassergesättigtem 2-Butanol chromatographiert (33 Fraktionen à 300 ml; DC.: Fertig-platten «Polygram Cel 400», Propanol/Wasser 4:1, Detektion durch Ninhydrin). Zur Identifizierung wurden die einzelnen Aminosäuren kristallisiert und mit authentischen Präparaten verglichen. Ergebnis: Fr. 10–12: 123 mg **20** [Smp. 197–204°; IR. (KBr): 1620 und 1580; $^1\text{H-NMR.}$ (D_2O): 0,97 (t , 3 H, 3 $\text{H-C}(\eta)$), 1,0 und 1,1 (2 d , 3 H, $\gamma\text{-CH}_3$), 1,3–1,6 (m , 4 H, 2 $\text{H-C}(\beta)$ und 2 $\text{H-C}(\delta)$), 1,7–1,9 (m , 2 H, 2 $\text{H-C}(\zeta)$), 2,1 (m , 1 H, $\text{H-C}(\gamma)$), 2,8 (m , 3 H, N-CH_3), 4,0 (m , 1 H, $\text{H-C}(\epsilon)$), 4,2–4,4 (m , 1 H, $\text{H-C}(\alpha)$); EL.-MS.: 185 (M^+), 158 ($M^+ - 27$), 140 ($M^+ - \text{COOH}$)]; Fr. 13–16: 2,19 g *N*-Methyl-L-leucin [Smp. 282°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +19,8^\circ$ ($c=1,18$, Wasser)]; Fr. 17: 200 mg *N*-Methyl-L-valin [Smp. 289°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +16,5^\circ$ ($c=0,73$, H_2O)]; Fr. 18: 234 mg Gemisch aus *N*-Methyl-L-valin und L-Valin; Fr. 19–20: 286 mg L-Valin [Smp. 286°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4,8^\circ$ ($c=1,05$, H_2O)]; Fr. 21: 80 mg Gemisch aus Valin und wenig *N*-Methylvalin und α -Aminobuttersäure; Fr. 22–23: 213 mg L- α -Aminobuttersäure [Smp. 290°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +19,9^\circ$ ($c=1,3$, 2N HCl)]; Fr. 24–25: 236 mg Gemisch aus α -Aminobuttersäure, Alanin und Sarkosin; Fr. 26–33: 654 mg Gemisch aus Alanin und Sarkosin; Nachchromatographie an 200 g Kieselgel mit Äthanol/Wasser 4:1 ergab 298 mg D,L-Alanin [Smp. 279–280°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 0^\circ$ ($c=1,29$, H_2O)] und 340 mg Sarkosin (Smp. 213–214°).

Isolierung und Charakterisierung der 3-Desoxy-dihydro-C₉-aminosäure (22). Dihydrocyclosporin F (5,76 g) wurde wie oben beschrieben hydrolysiert. Bei der chromatographischen Auftrennung des rohen Aminosäuregemisches enthielten die zuerst eluierten Fraktionen die Aminosäure **22** (480 mg, 53%); Kristallisation aus Äthanol/Wasser ergab prismatische Nadeln vom Smp. 281°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +19,4^\circ$ ($c=0,55$ in wasserges. 2-Butanol); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +37,0^\circ$ ($c=0,54$ in wasserges. 2-Butanol + 1 Tropfen konz. Salzsäure). – UV. ($\text{CH}_3\text{OH} + 1$ Tr. konz. Salzsäure): Endabsorption. – IR. (KBr): 1400, 1580, 1620. – $^1\text{H-NMR.}$ ($\text{D}_2\text{O} + 1$ Tr. DCI-Lösung): 0,9 (br. s, 3 H, 3 $\text{H-C}(\eta)$); 0,98 (d , 3 H, $\gamma\text{-CH}_3$); 1,2–1,4 (br. 6 H, 2 $\text{H-C}(\delta)$, 2 $\text{H-C}(\epsilon)$ und 2 $\text{H-C}(\zeta)$); 1,65 (m , 1 H, $\text{H-C}(\gamma)$); 1,82 und 1,90 (m , 2 H, 2 $\text{H-C}(\beta)$); 2,78 (s, 3 H, CH_3NH), 4,05 (t , 1 H, $\text{H-C}(\alpha)$). – $^{13}\text{C-NMR.}$: 172,8 (s , C=O); 61,1 (d , C(α)); 37,7 (t , C(δ)⁴); 36,5 (t , C(β)⁴); 33,2 (qa , N-CH_3); 30,2 (d , C(γ)); 29,4 (t , C(ϵ)); 23,5 (t , C(ζ)); 20,2 (qa , $\gamma\text{-CH}_3$); 14,7 (qa , C(η)).

$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}_2$	Ber. C 64,1	H 11,3	N 7,5	O 17,1%
(187,283)	Gef. „ 63,8	„ 11,2	„ 7,5	„ 17,1%

Herstellung von Dihydrocyclosporin G (23). Die Hydrierung von 4,55 g Cyclosporin G ergab 4,51 g **23** als amorphes weisses Pulver vom Smp. 150–153°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -232^\circ$ ($c=0,64$, CHCl_3), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -184^\circ$ ($c=0,83$, CH_3OH). – IR.: wie **7**, hingegen fehlt Bande bei 970 ($\text{CH}=\text{CH}$). – $^1\text{H-NMR.}$: Abwesenheit der Signale bei 5,35 (m , 2 H, $\text{H-C}(\epsilon)$) und $\text{H-C}(\zeta)$ der $\text{C}_9\text{-AS}$) und 1,65 (br. s, 3 H, 3 $\text{H-C}(\eta)$ der $\text{C}_9\text{-AS}$).

$\text{C}_{63}\text{H}_{115}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	Ber. C 62,1	H 9,5	N 12,6	O 15,8%
(1218,678)	Gef. „ 62,2	„ 9,8	„ 12,4	„ 15,9%

⁴) Zuordnungen können vertauscht werden.

Herstellung von Isocyclosporin G (24). Die Lösung von 730 mg (0,6 mmol) Cyclosporin G in 7 ml Dioxan wurde 17 Std. mit 144 mg (1,5 mmol) Methansulfonsäure bei 50° stehen gelassen. Die Aufarbeitung wie bei **11** lieferte 333 mg (46%) DC.-einheitliches **24** als amorphes weisses Pulver; aus Äther feine Prismen vom Smp. 143–146°, $[\alpha]_D^{20} = -196^\circ$ ($c = 0,72$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{20} = -128^\circ$ ($c = 0,73$, CH_3OH). – IR.: 1735 (Ester). – $^1\text{H-NMR.}$: 6,5–7,9 (m , 4 H, 4 CONH); 2,7–3,4 (m , 18 H, 6 CONCH_3); 2,3 (br. s , 3 H, NCH_3). – FD.–MS.: 1215 (M^+).

$\text{C}_{63}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$ (1216,662)	Ber. C 62,2 Gef. „ 62,0	H 9,4 „ 9,6	N 12,7 „ 12,9	O 15,8% „ 16,1%
---	----------------------------	----------------	------------------	--------------------

Herstellung von O-Chloracetyl-cyclosporin G (25). Wie bei **16** beschrieben. Aus 1,2 g (1 mmol) Cyclosporin G wurden nach chromatographischer Reinigung des Rohproduktes an Kieselgel mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 98,5:1,5 und anschliessender Kristallisation aus Äther/Petroläther 1:1, 0,1 g (79%) **25** in Form farbloser Polyeder vom Smp. 226–226,5° erhalten, $[\alpha]_D^{20} = -296^\circ$ ($c = 0,62$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{20} = -244^\circ$ ($c = 0,75$, CH_3OH). – IR.: 1760 (Ester). – $^1\text{H-NMR.}$: 4,0 und 4,15 (AB -System, $J = 14$, 2 H, ClCH_2COO). – EI.–MS.: 1293/1291 (M^+), 1197 ($M^+ - \text{ClCH}_2\text{COOH}$).

$\text{C}_{65}\text{H}_{114}\text{ClN}_{11}\text{O}_{13}$ (1293,144)	Ber. C 60,4 Gef. „ 60,3	H 8,9 „ 9,1	Cl 2,7 „ 2,7	N 11,9 „ 12,3	O 16,1% „ 16,0%
---	----------------------------	----------------	-----------------	------------------	--------------------

Herstellung von O-Jodacetyl-cyclosporin G (26). Aus 776 mg (0,6 mmol) **25** wurden analog wie bei **17** durch Reaktion mit NaI (900 mg, 6 mmol) nach Reinigung an Kieselgel mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 98,5:1,5 und Kristallisation aus Äther/Petroläther 715 mg (86%) **26** als farblose Plättchen vom Smp. 226–227° erhalten, $[\alpha]_D^{20} = -282^\circ$ ($c = 0,57$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{20} = -235^\circ$ ($c = 0,65$, CH_3OH). Zur Röntgenstrukturanalyse wurden Kristalle aus Methanol, die in Form gut ausgebildeter Polyeder anfielen, verwendet. – IR.: 1745 (Ester). – $^1\text{H-NMR.}$: 3,7 (s , 2 H, ICH_2COO). – EI.–MS.: kein M^+ , 1197 ($M^+ - \text{ICH}_2\text{COOH}$). – FD.–MS.: 1384 ($M^+ + 1$), 1257 ($M^+ + 1 - \text{I}$).

$\text{C}_{65}\text{H}_{114}\text{IN}_{11}\text{O}_{13}$ (1384,595)	Ber. C 56,4 Gef. „ 56,5	H 8,3 „ 8,5	I 9,2 „ 9,1	N 11,1 „ 11,2	O 15,0% „ 15,4%
--	----------------------------	----------------	----------------	------------------	--------------------

Dihydrocyclosporin H (27). Hydrierung von 4,8 g (4 mmol) Cyclosporin H und anschliessende Kristallisation aus Äther lieferten 4,66 g **27** vom Smp. 193–195°, $[\alpha]_D^{20} = -182^\circ$ ($c = 1,48$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{20} = -112^\circ$ ($c = 1,22$, CH_3OH). – IR.: wie **8**, hingegen fehlt Bande bei 970 ($\text{CH}=\text{CH}$). – $^1\text{H-NMR.}$: Abwesenheit der Signale bei 5,4 (m , 2 H, $\text{H}-\text{C}(\epsilon)$ und $\text{H}-\text{C}(\zeta)$ der C_9 -AS) und 1,65 (br. s , 3 H, 3 $\text{H}-\text{C}(\eta)$ der C_9 -AS).

$\text{C}_{62}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$ (1204,651)	Ber. C 61,8 Gef. „ 61,4	H 9,5 „ 9,5	N 12,8 „ 13,0	O 15,9% „ 16,2%
---	----------------------------	----------------	------------------	--------------------

Herstellung von Isocyclosporin H (28). Die Lösung von 2,40 g (2 mmol) Cyclosporin H und 0,48 g (5 mmol) Methansulfonsäure in 24 ml Dioxan wurde 3 Std. bei 80° gerührt. Nach üblicher Aufarbeitung (wie bei **11**) wurden nach Chromatographie an Kieselgel mit wassergesättigtem Essigester 258 mg (11%) DC.-einheitliches **28** vom Smp. 137–140° erhalten, $[\alpha]_D^{20} = -176^\circ$ ($c = 0,92$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{20} = -121^\circ$ ($c = 0,62$, CH_3OH). – IR.: 1735 (Ester). – $^1\text{H-NMR.}$: 6,4–8,3 (m , 4 H, 4 CONH); 2,7–3,4 (m , 18 H, 6 CONCH_3); 2,3 (m , 3 H, NCH_3).

$\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$ (1202,635)	Ber. C 61,9 Gef. „ 61,8	H 9,3 „ 9,5	N 12,8 „ 13,0	O 16,0% „ 16,3%
---	----------------------------	----------------	------------------	--------------------

Herstellung von O-Acetyl-cyclosporin H (29). Wie bei **12** beschrieben. Aus 2,4 g (2 mmol) Cyclosporin H wurden nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 98:2 und Kristallisation aus Äther 2,15 g (87%) **29** in Form farbloser, feiner Nadeln vom Smp. 276–276,5° erhalten, $[\alpha]_D^{20} = -139^\circ$ ($c = 0,50$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{20} = -109^\circ$ ($c = 0,67$, CH_3OH). – IR.: 1735 und 1235 (Ester). – $^1\text{H-NMR.}$: 2,0 (s , 3 H, CH_3COO).

$\text{C}_{64}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$ (1244,672)	Ber. C 61,8 Gef. „ 61,6	H 9,2 „ 9,3	N 12,4 „ 12,2	O 16,7% „ 16,9%
---	----------------------------	----------------	------------------	--------------------

Herstellung von Tetra-N-methyl-O-acetyl-cyclosporin H (30). Die Permethylierung von 1,245 g (1 mmol) **29** wurde wie bei **15** durchgeführt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Chromatographie an 200 g Kieselgel mit wassergesättigtem Essigester; Nachchromatographie der Spitzenfraktionen an 100 g Kieselgel mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 98,5:1,5 lieferte 601 mg (46%) DC.-einheitliches **30** als amorphes weisses Pulver vom Smp. 163–164°, $[\alpha]_D^{20} = -119^\circ$ ($c = 0,63$, CHCl_3); $[\alpha]_D^{20} = -126,5^\circ$ ($c = 0,92$,

CH₃OH). – IR.: 1735 und 1235 (Ester), 1630–1660 (tert. Amid); Banden bei 3320 (sek. Amid, νNH) und 1520–1540 (sek. Amid, δNH) fehlen. – ¹H-NMR.: 2,0 (s, 3 H, CH₃COO); 2,6–3,3 (m, 33 H, 11 CONCH₃); Signale bei 6,6–8,6 (Amidprotonen) fehlen. – EI.-MS.: 1299 (M⁺), 1240 (M⁺–CH₃COO), 1185 (1240–C₄H₇, aus C₉–AS).

C ₆₈ H ₁₂₁ N ₁₁ O ₁₃	Ber. C 62,8	H 9,4	N 11,8	O 16,0%
(1300,780)	Gef. „ 62,9	„ 9,5	„ 11,5	„ 16,2%

Umwandlung von Cyclosporin H in das Derivat 31. Zur Lösung von 3,61 g (3 mmol) Cyclosporin H und 948 mg (3,6 mmol) Thallium(I)-acetat in 48 ml CHCl₃ wurde unter Rühren die Lösung von 762 mg (6 mmol) Jod in 48 ml CHCl₃ getropft. Der zunächst entstandene dunkelgrüne Niederschlag ging nach 5 Std. Rühren bei RT. in hellgelbes Thallium(I)-jodid über, das abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand an Kieselgel mit CHCl₃/CH₃OH 98:2 chromatographiert; 3,70 g (93%) DC-einheitliches **31**; aus Äther 3,6 g (90%) feine, farblose Nadeln vom Smp. 177–180°, [α]_D²⁰ = –125° (c = 0,58, CHCl₃), [α]_D²⁰ = –112° (c = 0,64, CH₃OH). Kristalle zur Röntgenstrukturanalyse wurden aus Methanol/Äther 1:9 in Form schmaler Prismen erhalten. – IR.: sehr ähnlich wie **8**; schwache Bande bei 970 (CH=CH) fehlt. – ¹H-NMR.: 1,8 (br. s, 3 H, CH₃–CHI–); Abwesenheit der Vinylprotonen. – FD.-MS.: 1328 (M⁺ + 1). – EI.-MS.: kein M⁺, 1199 (M⁺–HI), 1089 (M⁺–C₇H₁₁IO).

C ₆₂ H ₁₁₀ I N ₁₁ O ₁₂	Ber. C 56,1	H 8,3	I 9,6	N 11,6	O 14,5%
(1328,531)	Gef. „ 56,2	„ 8,6	„ 9,9	„ 11,4	„ 14,8%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Dreyfuss, E. Hänni, 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. Chim. Acta* **59**, 1075 (1976).
- [3] W. Gams, *Persoonia* **6**, 185 (1971).
- [4] T. J. Petcher, H. P. Weber & A. Rügger, *Helv. Chim. Acta* **59**, 1480 (1976).
- [5] R. Traber, M. Kuhn, A. Rügger, H. Lichti, H. R. Loosli & A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* **60**, 1247 (1977).
- [6] R. Traber, M. Kuhn, H. R. Loosli, W. Pache & A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* **60**, 1568 (1977).
- [7] R. Wenger (Sandoz AG), *Europ. Patent Appl.* 34 567 (1981).
- [8] J. F. Borel, C. Feurer, H. U. Gubler & H. Stähelin, *Agents Actions* **6**, 468 (1976); J. F. Borel, C. Feurer, C. Magnée & H. Stähelin, *Immunology* **32**, 1017 (1977); J. F. Borel, *Trends Pharmacol. Sci.* **2**, 146 (1980).
- [9] D. Wiesinger & J. F. Borel, *Immunobiol.* **156**, 454 (1979).
- [10] R. Y. Calne, D. J. G. White, S. Thiru, D. B. Evans, P. McMaster, D. C. Dunn, G. N. Craddock, D. B. Pentlow & K. Rolles, *Lancet* **1978**, II, 1323.
- [11] T. J. Petcher, H. P. Weber et al., in Vorbereitung.
- [12] T. Fujita, Y. Takaishi, A. Okamura, E. Fujita, K. Fuji, N. Hiratsuka, M. Komatsu & I. Arita, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 585.
- [13] G. W. Clough, *J. Chem. Soc.* **113**, 526 (1918); O. Lutz & B. Jirgensons, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **63**, 448 (1930); **64**, 1221 (1931).
- [14] Beilstein **4**, III 1416.
- [15] E. Preisch, T. Clerc, J. Seibl & W. Simon, *Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden*, Springer-Verlag 1976.
- [16] H. Kobel & R. Traber, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 237 (1982).
- [17] S. Moore & H. W. Stein, *J. Biol. Chem.* **192**, 663 (1951).