

## 2. Neue Cyclosporine aus *Tolypocladium inflatum*<sup>1)</sup> Die Cyclosporine K–Z

von René Traber, Hans Hofmann, Hans-Rudolf Loosli, Monique Ponelle und Albert von Wartburg\*

Sandoz AG, Präklinische Forschung, CH-4002 Basel

(30.X.86)

---

### Novel Cyclosporins from *Tolypocladium inflatum*. The Cyclosporins K–Z

The fungus *T. inflatum* produces a plethora of oligopeptides, the cyclosporins, which exhibit remarkable biological activities. Cyclosporin A, the main metabolite, represents a potent immunosuppressant which opened new ways in the immunotherapy of bone marrow and organ transplantations. In addition to the already described cyclosporins A–I, we report now the isolation of the cyclosporins K–Z. The structural assignments of these novel congeners are based on chemical degradation, correlation reactions, mass spectra, and extensive analysis of <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra. All cyclosporins are cyclic undecapeptides differing from each other by minor variations in the amino-acid sequence. Comparison of the immunosuppressive and antifungal effects furnished new information concerning structure-activity relationships.

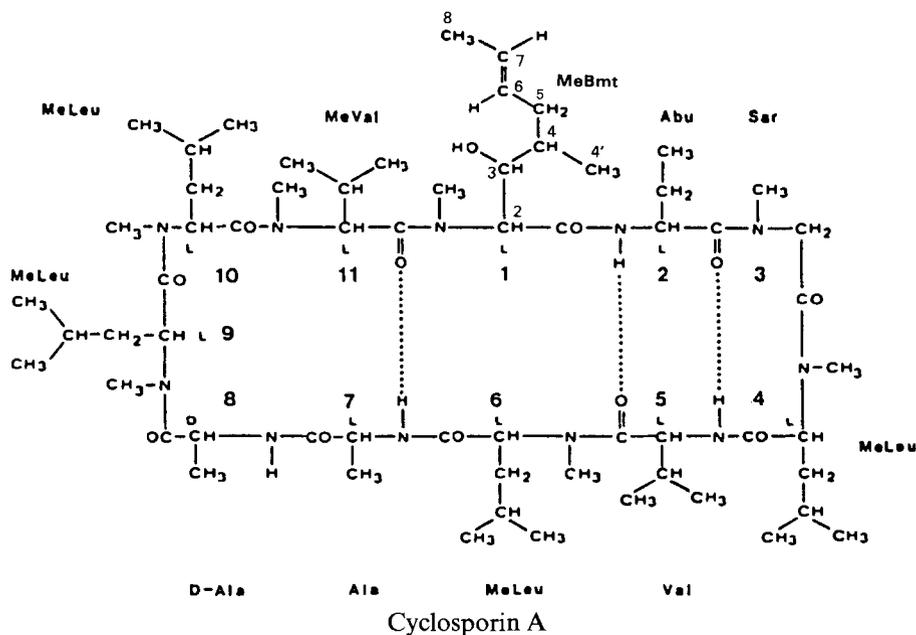
---

**1. Einleitung.** – Cyclosporin A [1] [2], ein im Verlauf unseres mikrobiologischen ‘Screenings’ entdeckter Pilzmetabolit, erwies sich als wertvolles Immunsuppressivum (*Sandimmun*<sup>®</sup>) [3] [4], das in der Klinik neue Wege in der Immuntherapie bei Knochenmark- und Organ-Transplantationen eröffnete [5]. Die Struktur des Cyclosporin A als cyclisches, aus 11 z. T. *N*-methylierten Aminosäuren aufgebautes Oligopeptid konnte durch präparative Baustein-Analyse, Bestimmung der Aminosäure-Sequenz sowie mittels spektroskopischer Daten und Röntgen-Kristallanalyse aufgeklärt werden [1] [6]. Eine detaillierte Analyse verschiedener NMR-spektroskopischer Parameter erlaubte einen Vergleich der Konformationen von Cyclosporin A in apolarer Lösung und im Kristall [7] [8].

Neben Cyclosporin A wurden in der Folge eine Reihe von Nebenmetaboliten isoliert, die Cyclosporine B–I, die strukturell und z. T. auch wirkungsmässig eine nahe Verwandtschaft zur A-Komponente aufweisen [9–11]. Bis vor kurzem wurden Cyclosporin A und seine Begleitstoffe ausschliesslich in *Cyclindrocarpon lucidum* BOOTH und *Tolypocladium inflatum* GAMS gefunden; inzwischen liessen sich Cyclosporine auch in anderen niederen Pilzen als sekundäre Stoffwechselprodukte nachweisen [12]. Das Auftreten zahlreicher Nebenmetabolite und die ungewöhnlichen Strukturelemente *L*- $\alpha$ -Aminobuttersäure, *D*-Alanin und die C<sub>9</sub>-Aminosäure (2*S*,3*R*,4*R*,6*E*)-3-Hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure (= MeBmt) lassen darauf schliessen, dass die Biosynthese dieser Peptide nicht ribosomal sondern an einem multifunktionalen Enzym-Komplex erfolgt [13] [14]. Einbauversuche mit radioaktiv markiertem Acetat und Methionin zeigten, dass die charakteristische C<sub>9</sub>-Aminosäure durch Kopf-Schwanz-Kondensation von 4 Acetat-Einheiten

---

<sup>1)</sup> Auszugsweise als Poster an der 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy präsentiert (Washington DC, 8.–10. Oktober 1984); Abstract No. 900.

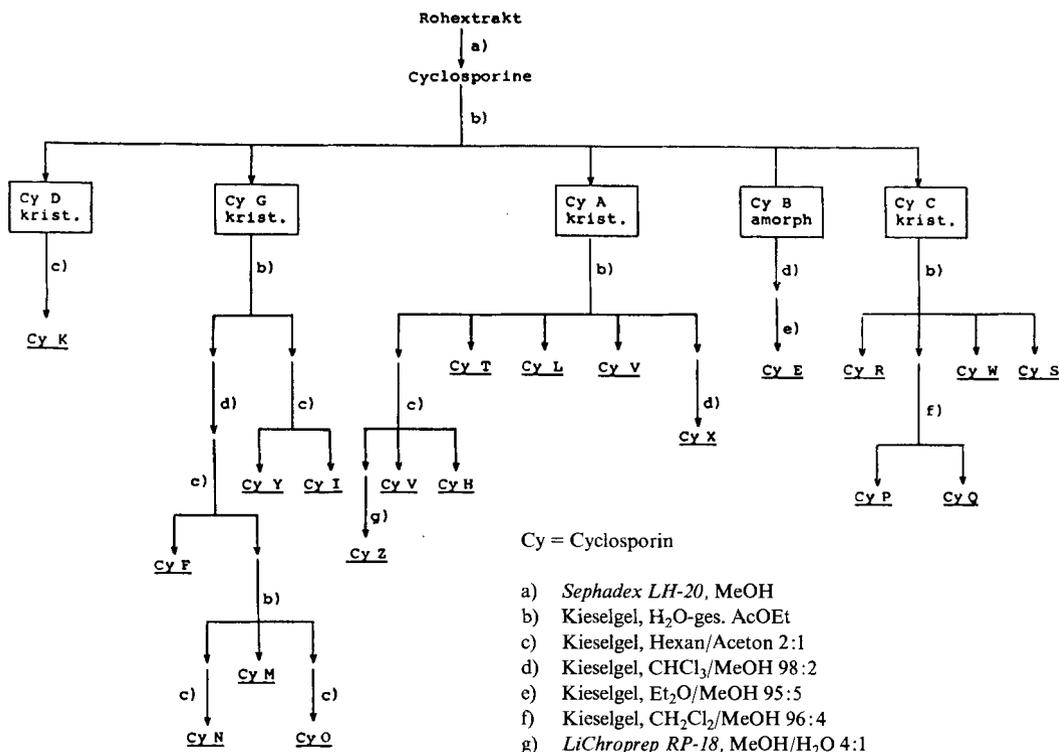


gebildet wird, während ihre C-Methyl-Gruppe wie auch die 7 N-Methyl-Gruppen der Aminosäuren aus Methionin stammen [15]. Neuerdings ist es auch gelungen die C<sub>9</sub>-Aminosäure – in Form ihres N-Demethyl-Derivates – aus Kulturen einer selektionierten Blockmutante von *T. inflatum* zu isolieren [16]. Die C<sub>9</sub>-Aminosäure wird offensichtlich zunächst als intakte Aminosäure-Einheit synthetisiert und erst dann zum Aufbau der Peptid-Kette verwendet. Der Verlauf der Cyclosporin-Biosynthese kann durch Zugabe von Vorläufern markant beeinflusst werden. Exogen angebotene, in Position 2 der genuinen Cyclosporine auftretende Aminosäuren werden besonders leicht eingebaut und bewirken eine massive Ausbeutesteigerung für die entsprechenden Cyclosporin-Komponenten [14]. Auch 'fremde' Aminosäuren werden akzeptiert; so wird z. B. D-Serin anstelle von D-Alanin in Position 8 inkorporiert unter Bildung von [D-Ser<sup>8</sup>]Cyclosporin A [17], einem in Wildstämmen bisher nicht nachgewiesenen Strukturanalogen. Die kontinuierliche Suche nach neuen Spurenmetaboliten aus *T. inflatum* und die Erzeugung neuer Strukturmodifikationen durch gesteuerte Biosynthese zielen darauf ab, unsere Kenntnisse über Struktur-Aktivitätsrelationen in der Cyclosporin-Reihe zu erweitern. Dabei interessieren uns speziell Metabolite mit hoher immunsuppressiver Aktivität sowie Stoffe, bei denen eine antifungische, antiparasitäre oder entzündungshemmende Wirkung dominiert [18].

Im folgenden berichten wir über die Isolierung und Strukturaufklärung von 16 neuen, natürlichen Spurenmetaboliten, den Cyclosporinen K–Z, sowie über die aus den biologischen Wirkungsprofilen ableitbaren Beziehungen zwischen Struktur und immunmodulierender bzw. antifungischer Aktivität.

**2. Isolierung und Charakterisierung der neuen Cyclosporine.** – Die aerobe Submerszucht von *T. inflatum* in Stahlfermentern und die Extraktion und Aufarbeitung der Kulturbrühe wurden schon früher beschrieben [1] [11]. Für die vorliegende Arbeit stan-

Schema 1. Isolierung der Cyclosporine A–Z



Tab. 1. Physikalisch-chemische Daten der Cyclosporine A–Z

Metabolit	Bruttoformel <sup>a)</sup>	Schmp.	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> in CHCl <sub>3</sub>	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup> in MeOH
Cyclosporin A	C <sub>62</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	148–151° (krist. Aceton)	–244°	–189°
Cyclosporin B	C <sub>61</sub> H <sub>109</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	149–152° (amorph)	–238°	–168°
Cyclosporin C	C <sub>62</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub>	152–155° (krist. Aceton)	–255°	–182°
Cyclosporin D	C <sub>63</sub> H <sub>113</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	148–151° (krist. Aceton)	–245°	–211°
Cyclosporin E	C <sub>61</sub> H <sub>109</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	149–152° (krist. Et <sub>2</sub> O)	–179°	–186°
Cyclosporin F	C <sub>62</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub>	195–196° (krist. Et <sub>2</sub> O/ Petroläther 1:4)	–285°	–205°
Cyclosporin G	C <sub>63</sub> H <sub>113</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	196–197° (krist. Et <sub>2</sub> O/ Petroläther 1:1)	–245°	–191°
Cyclosporin H	C <sub>62</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	162–165° (krist. Et <sub>2</sub> O)	–177°	–112°
Cyclosporin I	C <sub>62</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	137–140° (amorph)	–220°	–183°
Cyclosporin K	C <sub>63</sub> H <sub>113</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub>	127–132° (amorph)	–293°	–241°
Cyclosporin L	C <sub>61</sub> H <sub>109</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	154–157° (amorph)	–292°	–187°
Cyclosporin M	C <sub>63</sub> H <sub>113</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	142–144° (krist. Et <sub>2</sub> O)	–211°	–183°
Cyclosporin N	C <sub>62</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	169–172° (krist. Et <sub>2</sub> O)	–234°	–188°
Cyclosporin O	C <sub>60</sub> H <sub>109</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub>	186–188° (krist. Et <sub>2</sub> O/ Petroläther 1:7)	–304°	–228°
Cyclosporin P	C <sub>61</sub> H <sub>109</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub>	157–160° (amorph)	–258°	–181°
Cyclosporin Q	C <sub>60</sub> H <sub>107</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	160–164° (amorph)	–247°	–156°

Tab. 1 (Forts.)

Metabolit	Bruttoformel <sup>a)</sup>	Schmp.	$[\alpha]_D^{20}$ in $\text{CHCl}_3$	$[\alpha]_D^{20}$ in MeOH
Cyclosporin R	$\text{C}_{60}\text{H}_{107}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	173–175° (amorph)	–175°	–179°
Cyclosporin S	$\text{C}_{60}\text{H}_{107}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$	174–176° (amorph)	–199°	–153°
Cyclosporin T	$\text{C}_{61}\text{H}_{109}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	168–171° (amorph)	–245°	–196°
Cyclosporin U	$\text{C}_{61}\text{H}_{109}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	177–179° (amorph)	–207°	–190°
Cyclosporin V	$\text{C}_{63}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	149–152° (krist. $\text{Et}_2\text{O}$ )	–225°	–191°
Cyclosporin W	$\text{C}_{61}\text{H}_{109}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$	150–156° (amorph)	–219°	–207°
Cyclosporin X	$\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	160–163° (krist. $\text{Et}_2\text{O}$ )	–233°	–165°
Cyclosporin Y	$\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$	172–175° (amorph)	–192°	–179°
Cyclosporin Z	$\text{C}_{61}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{11}$	132–136° (amorph)	–297°	–226°

<sup>a)</sup> Vgl. Elementaranalysen im *Exper. Teil* (Tab. 16).

den uns Nebenfraktionen und Kristallisation-Mutterlaugen aus der technischen Produktion von Cyclosporin A als Ausgangsmaterial zur Isolierung der nur in geringen Konzentrationen vorkommenden Begleitmetabolite zur Verfügung. Die Anreicherung und Reinigung der Einzelkomponenten erfolgten wie früher durch systematische Chromatographie an *Sephadex LH-20* und an Kieselgel. Der Verlauf der Isolierprozesse und die Gehaltsbestimmung der Mischfraktionen wurde durch DC und HPLC laufend kontrolliert (*Schema 1*).

Die physikalisch-chemischen Daten aller bis jetzt isolierten Cyclosporine sind in *Tab. 1* zusammengestellt. Elementaranalysen, Aminosäure-Bestimmungen,  $\alpha$ -Werte der HPLC-Analyse und  $R_f$ -Werte in verschiedenen DC-Systemen sind im *Exper. Teil* angegeben (*Tab. 14–17*).

**3. Strukturaufklärung der neuen Cyclosporine.** – Die Strukturermittlung der neuen Cyclosporine erfolgte durch IR- und Massenspektren, Aminosäure-Analyse sowie durch ausführliche Interpretationen der NMR-Spektren. Alle bis jetzt bekannten Cyclosporine sind Undecapeptide; die 11 Amid-Bindungen ( $\text{CONH}/\text{CONCH}_3$ ) sind aus den NMR-Spektren leicht ersichtlich. Zur Charakterisierung der einzelnen Bausteine wurden die Cyclosporine hydrolysiert und die anfallenden Aminosäuren quantitativ bestimmt (s. *Exper. Teil, Tab. 17*). *N*-Methylierte Aminosäuren wurden in einigen Fällen präparativ isoliert, meist jedoch nur qualitativ mittels DC erfasst.

Durch extensive Analyse der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von Cyclosporin A bei 300 bzw. 500 MHz unter Zuhilfenahme kombinierter, zwei-dimensionaler NMR-Techniken ist es kürzlich gelungen, alle  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signale jeder einzelnen Aminosäure sowie die N-Atome der 4 NH-Gruppen exakt zuzuordnen [7]. Aufgrund dieser Informationen lassen sich auch die NMR-Spektren der übrigen Cyclosporine im Detail interpretieren (s. *Exper. Teil, Tab. 18*). Die vergleichende Auswertung aller vorliegenden Spektren ermöglicht es, die in spezifischen ppm-Bereichen auftretenden Signal-Verschiebungen mit den für die einzelnen Nebenmetabolite charakteristischen Strukturvariationen zu korrelieren. Die Positionen der gegenüber Cyclosporin A neu auftretenden Strukturelemente, d. h. der ausgetauschten Aminosäuren, können so mit grosser Sicherheit bestimmt werden. Zudem lassen sich Abweichungen in der Konformation des Ringgerüsts durch Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten erkennen.

Die postulierten Aminosäuresequenzen der neuen Cyclosporine (s. *Tab. 2*) wurden in einigen Fällen durch chemische Verknüpfung *via* Permethylierungsprodukte bestätigt.

Tab. 2. Strukturen der bis jetzt bekannten Cyclosporine A–Z

Meta- bolit	Aminosäure										
	1 <sup>a)</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Cy A	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy B	MeBmt	Ala	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy C	MeBmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy D	MeBmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy E	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	Val
Cy F	Desoxy-MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy G	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy H	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	D-MeVal
Cy I	MeBmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
Cy K	Desoxy-MeBmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy L	Bmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy M	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Nva	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy N	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
Cy O	MeLeu	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy P	Bmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy Q	MeBmt	Abu	Sar	Val	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy R	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	Leu(?)	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu(?)	MeVal
Cy S	MeBmt	Thr	Sar	Val	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy T	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
Cy U	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	Leu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy V	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Abu	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy W	MeBmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	Val
Cy X	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	Leu	MeLeu	MeVal
Cy Y	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	Leu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Cy Z	Methylamino- octansäure	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal

<sup>a)</sup> Bmt = (2*S*, 3*R*, 4*R*, 6*E*)-2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-6-octensäure (= (4*R*)-4-((*E*)-2-Butenyl)-4-methyl-L-threonin).

Cyclosporin K = [(3-Deoxy-MeBmt)<sup>1</sup>, Val<sup>2</sup>]Cyclosporin A. Cyclosporin K (*m/z* 1200 (MH<sup>+</sup>)), wurde aus Kristallisationsmutterlaugen von Cyclosporin D isoliert. Der neue Nebenmetabolit, der apolarste der bis jetzt bekannten Begleitstoffe, ist durch das Fehlen der sekundären OH-Gruppe in MeBmt gekennzeichnet: keine OH-Banden im IR, kein <sup>1</sup>H-NMR-Signal eines gegen D<sub>2</sub>O austauschbaren OH-Protons, Fehlen des für das intakte MeBmt charakteristischen Fragmentes C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O (*m/z* 112) im MS. Aus der Aminosäure-Analyse (Tab. 17) geht

 Tab. 3. <sup>13</sup>C-NMR-Daten (δ[ppm]) der Aminosäuren 1 und 2 der Cyclosporine A und K

C-Atom	Cyclosporin K Deoxy-MeBmt	Cyclosporin A MeBmt	C-Atom	Cyclosporin K Val	Cyclosporin A Abu
CH <sub>3</sub> -N(2.1)	31,68	33,97	C(2.2)	53,75	38,86
C(2.1)	55,34	58,75	C(3.2)	29,91	25,06
C(3.1)	36,61	74,74	C(4.2)	19,44	9,93
C(4.1)	29,46	35,99	C(4'.2)	18,38	–
C(4'.1)	20,06	16,76			
C(5.1)	40,61	35,63			
C(6.1)	129,33	129,68			
C(7.1)	126,69	126,32			
C(8.1)	17,83	17,96			

zudem hervor, dass anstelle der im Cyclosporin A vorkommenden *L*- $\alpha$ -Aminobuttersäure (Abu-2) eine Val-Einheit auftritt. Die im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum beobachteten Signalverschiebungen (Tab. 3 und 18) ermöglichen eine Lokalisierung der erwähnten strukturellen Variationen: In Position 1 liegt 3-Deoxy-MeBmt [11] vor, Val nimmt Position 2 ein; zusätzliche Änderungen in der Aminosäuren-Sequenz und in der Konformation der 'backbone'-Struktur sind nicht ersichtlich.

Analoge spektrale Unterschiede wurden auch beim Vergleich von Cyclosporin A mit Cyclosporin F (= [3-Deoxy-MeBmt $^1$ ]Cyclosporin A) bzw. Cyclosporin D (= [Val $^2$ ]Cyclosporin A) festgestellt [10] [11].

*Cyclosporin L* = [Bmt $^1$ ]Cyclosporin A $^2$ ). Cyclosporin L weist gegenüber der A-Komponente eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe weniger auf, wie aus der Bruttoformel (Tab. 1;  $m/z$  1188 ( $\text{MH}^+$ )) und den 61 Signalen im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum hervorgeht. Die Hydrolyse liefert die gleichen Aminosäuren wie aus Cyclosporin A bis auf den Artefakt von MeBmt, der durch einen noch unbekannt Baustein,  $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_3$  ( $m/z$  188 ( $\text{MH}^+$ )), ersetzt ist. Dieses Spaltstück, das auch bei der Hydrolyse von Cyclosporin P entsteht, wurde als cyclisches Derivat A der *N*-Demethyl- $\text{C}_9$ -Aminosäure charakterisiert (s. *Exper. Teil*).

Aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cyclosporin L (Fig. 1) resultieren 5 CONH- und 6 CONCH $_3$ -Gruppen (gegenüber 4 CONH und 7 CONCH $_3$  beim Cyclosporin A). Ferner erscheinen die Signale für die endständige  $\text{CH}_3$ -

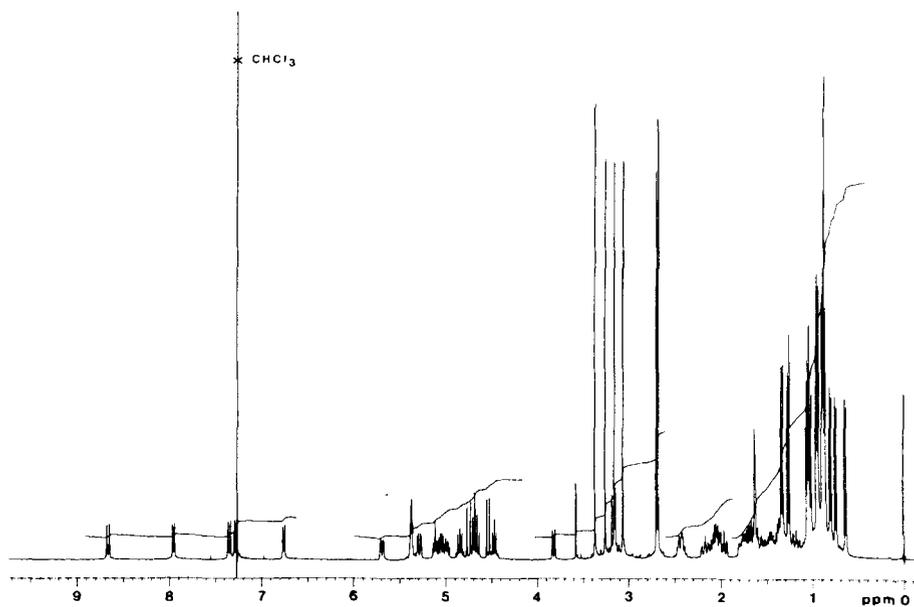
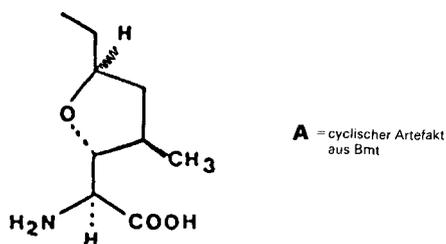


Fig. 1.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cyclosporin L in  $\text{CDCl}_3$

<sup>2)</sup> Die Erstisolierung von Cyclosporin L erfolgte durch die Herren R. Reuille (Chem. Entwicklung) und P. Rohrer (Chem. Produktion).

Tab. 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten ( $\delta$ [ppm]) der Aminosäuren 1, 2 und 11 der Cyclosporine A, C, L und P

C-Atom	Cyclosporin A	Cyclosporin L	Cyclosporin P	Cyclosporin C
	MeBmt	Bmt	Bmt	MeBmt
$\text{CH}_3\text{-N}(2.1)$	33,97	–	–	33,44
C(2.1)	58,75	53,35	53,64	58,92
	Abu	Abu	Thr	Thr
C(2.2)	48,86	49,00	51,16	51,53
	MeVal	MeVal	MeVal	MeVal
C(2.11)	57,93	62,60	62,58	58,07

und die sekundäre OH-Gruppe der *N*-Demethyl- $\text{C}_9$ -Aminosäure. Erwartungsgemäss fehlt das *s* (bei 3,5 ppm) für  $\text{CH}_3\text{-N}(2.1)$ -Gruppe; dafür tritt bei 6,8 ppm ein neues *d* auf (NH), das mit H–C(2.1) koppelt. Damit in Übereinstimmung steht die beobachtete Signal-Verschiebung für H–C(2.1) von 5,5 ppm (im Cyclosporin A) nach 4,7 ppm. Aufgrund dieser Befunde handelt es sich beim Cyclosporin L um  $\text{N}^{2.1}$ -Demethylcyclosporin A. Dieser Strukturvorschlag wird durch die in Tab. 4 und 18 aufgelisteten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale weiter erhärtet. Beweiselemente bilden das Fehlen des Signals für  $\text{CH}_3\text{-N}(2.1)$  sowie die Verschiebung der Signale für C(2.1) nach 53,35 ppm ( $\beta$ -Effekt) und des benachbarten C(2.11) nach 62,60 ppm ( $\gamma$ -Effekt). Die übrigen Signale weisen im Vergleich zum Cyclosporin A nur geringfügige Änderungen auf (Tab. 18).

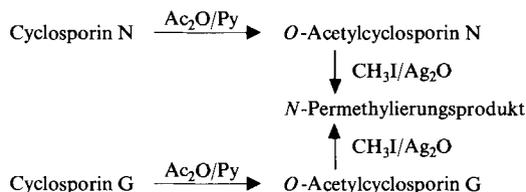
*Cyclosporin M* = [ $\text{Nva}^2, \text{Nva}^3$ ]Cyclosporin  $\text{A}^3$ ). Cyclosporin M ( $m/z$  1216 ( $\text{MH}^+$ )) ist zu Cyclosporin G isomer, weist aber anstelle des Val eine zweite Nva-Einheit auf (Tab. 17). Aus dem Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren kann geschlossen werden, dass der Austausch wie erwartet in Position 5 erfolgt ist, und dass die beiden Metaboliten im übrigen praktisch gleiche Konformationen einnehmen. Die Verlagerungen der involvierten Signale sind in Tab. 5 angegeben.

 Tab. 5.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten ( $\delta$ [ppm]) der Aminosäuren 2 und 5 in den Cyclosporinen G und M

C-Atom	Cyclosporin G Nva	Cyclosporin M Nva	C-Atom	Cyclosporin G Val	Cyclosporin M Nva
C(2.2)	47,09	46,97	C(2.5)	55,38	50,09
C(3.2)	33,99	33,94	C(3.5)	31,06	32,53
C(4.2)	18,63	18,76	C(4.5)	19,78	19,64
C(5.2)	13,91	13,86	C(4'.5)	18,35	–
			C(5.5)	–	13,65

*Cyclosporin N* = [ $\text{Nva}^2, \text{Leu}^{10}$ ]Cyclosporin A. Cyclosporin N ( $m/z$  1202 ( $\text{MH}^+$ )) wurde aufgrund der Aminosäure-Zusammensetzung (Tab. 17), Korrelationsreaktionen und spektroskopischen Vergleiche als  $\text{N}^{2.10}$ -Demethylcyclosporin G formuliert (Nva in Stellung 2, Leu anstelle von MeLeu). Die weitgehende Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenz bei den Cyclosporinen N und G lässt sich durch direkte Verknüpfung über ein gemeinsames *N*-Permethylierungsprodukt belegen (Schema 2). Die postulierte Position 10 der Leu-Einheit in Cyclosporin N

Schema 2



<sup>3)</sup> Cyclosporin M wurde erstmals von Herrn R. Reuille als Begleitkomponente von Cyclosporin G in mikropräparativem Maßstab isoliert.

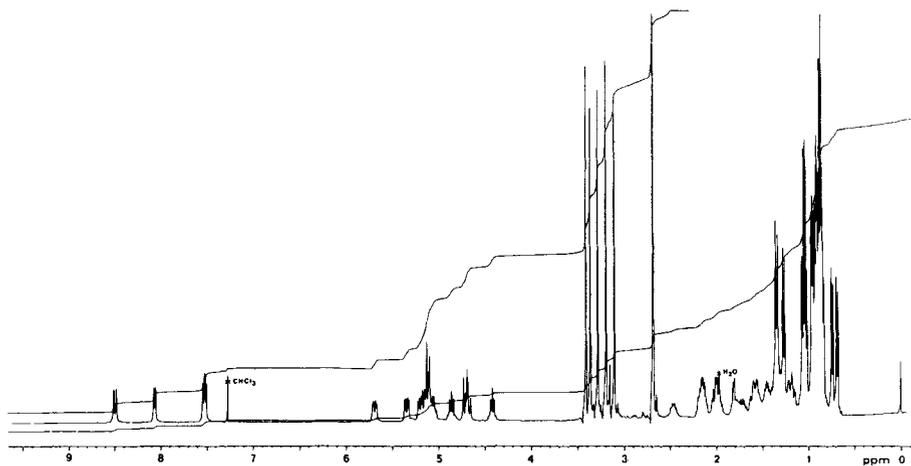
Tab. 6.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten ( $\delta$ [ppm]) der Aminosäuren 9 und 10 der Cyclosporine A, D, G, I, N und T

C-Atom	Cy N	Cy G	Cy I	Cy D	Cy T	Cy A
	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeLeu	MeLeu
C(2.9)	55,13	48,30	55,2	48,24	55,13	48,30
	Leu	MeLeu	Leu	MeLeu	Leu	MeLeu
C(2.10)	47,56	57,51	47,7	57,51	47,56	57,54
$\text{CH}_3\text{-N}(2.10)$	–	29,74	–	29,74	–	29,83

stützt sich auf folgende  $^{13}\text{C}$ -NMR-Befunde: Abwesenheit des Signals für die  $\text{CH}_3\text{-N}(2.10)$ -Gruppe sowie markante Verlagerungen der Signale für C(2.10) nach 47,56 ppm ( $\beta$ -Effekt) und für C(2.9) nach 55,13 ( $\gamma$ -Effekt) (Tab. 6).

Analoge Verhältnisse werden bei den Cyclosporinen I [11] und T (s. u.) beobachtet, die als  $N^{2,10}$ -Demethyl-Verbindungen der Cyclosporine D bzw. A charakterisiert wurden. Das Vorliegen von Leucin in Position 10 ermöglicht bei den Cyclosporinen I, N und T die Ausbildung einer zusätzlichen H-Brücke und bewirkt konformative Änderungen gegenüber den entsprechenden  $N^{2,10}$ -methylierten Metaboliten.

*Cyclosporin O* = [MeLeu<sup>1</sup>, Nva<sup>2</sup>]Cyclosporin A. Mit Cyclosporin O ( $m/z$  1160 ( $\text{MH}^+$ )) liegt der erste fermentativ gewonnene Nebenmetabolit vor, bei dem das charakteristische MeBmt gegen eine übliche  $N$ -methylierte Aminosäure-Einheit (MeLeu) ausgetauscht wurde. Die Absenz von MeBmt fällt sofort auf durch das Fehlen der Banden für OH-Gruppe und (C=C)-Bindung im IR und der entsprechenden Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum sowie durch das Auftreten eines atypischen Fragmentierungsmusters im MS. Dementsprechend lässt sich Cyclosporin O weder hydrieren noch acylieren. Bei den restlichen Aminosäuren ist das Vorkommen einer Nva-Einheit bemerkenswert. Cyclosporin O stimmt diesbezüglich mit Cyclosporin G (= [Nva<sup>2</sup>]Cyclosporin A) überein.

Fig. 2.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cyclosporin O in  $\text{CDCl}_3$ Tab. 7.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten ( $\delta$ [ppm]) der Aminosäure 1 der Cyclosporine G und O

C-Atom	Cyclosporin G MeBmt	Cyclosporin O MeLeu	C-Atom	Cyclosporin G MeBmt	Cyclosporin O MeLeu
$\text{CH}_3\text{-N}(2.1)$	33,90 ( $\text{CH}_3$ )	31,72 ( $\text{CH}_3$ )	C(5.1)	35,51 ( $\text{CH}_2$ )	20,94 ( $\text{CH}_3$ )
C(2.1)	58,71 (CH)	54,04 (CH)	C(6.1)	129,68 ( $\text{CH}=\text{}$ )	–
C(3.1)	74,64 (CH)	38,86 ( $\text{CH}_2$ )	C(7.1)	126,16 ( $\text{CH}=\text{}$ )	–
C(4.1)	35,93 (CH)	24,49 (CH)	C(8.1)	17,85 ( $\text{CH}_3$ )	–
C(4'.1)	16,75 ( $\text{CH}_3$ )	23,79 ( $\text{CH}_3$ )			

In den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren zeigen diese beiden Metabolite im Bereich der Aminosäure 2 (Nva) keine signifikanten Signal-Verschiebungen. Deutliche Unterschiede ergeben sich hingegen durch den im Cyclosporin O erfolgten Ersatz von MeBmt in Position 1 durch MeLeu (s. Tab. 7).

*Cyclosporin P* = [Bmt<sup>1</sup>,Thr<sup>2</sup>]Cyclosporin A. Bei Cyclosporin P ( $m/z$  1204 ( $\text{MH}^+$ )) handelt es sich um das  $\text{N}^{2,1}$ -Demethyl-Derivat von Cyclosporin C, wie aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Daten und der Zusammensetzung der Hydrolyse-Produkte hervorgeht (u. a. 1 Thr, und das aus Bmt stammende cyclische Abbauprodukt). Neben den erwarteten  $^1\text{H}$ -NMR-Signalen für 5 CONH- und 6 CONCH<sub>3</sub>-Gruppen sind im weiteren die gleichen Signal-Verlagerungen festzustellen wie beim Cyclosporin L (=  $\text{N}^{2,1}$ -Demethylcyclosporin A; vgl. Tab. 4 und 18). Einstrahlung auf das Signal von H-C(2.1) bei 4,7 ppm führt zur Entkopplung des neuen Amid-Protons bei 6,9 ppm (s, NH(2.1)). Die restliche Aminosäure-Sequenz ist gleich wie im Cyclosporin C; die beiden Cyclosporine konnten *via* identisches *N*-Permethylierungsprodukt miteinander korreliert werden (s. *Exper. Teil*).

*Cyclosporin Q* = [Val<sup>4</sup>]Cyclosporin A. Cyclosporin Q ( $m/z$  1174 ( $\text{MH}^+$ )) enthält 2 CH<sub>2</sub>-Einheiten weniger als Cyclosporin A und gehört in die Reihe der Mono-*N*-Demethyl-Verbindungen (5 CONH, 6 CONCH<sub>3</sub>). Die Aminosäure-Bestimmung ergibt u. a. 1 Abu und 2 Val (gegenüber 1 Val im Cyclosporin A). Ferner wurden mittels DC noch zusätzlich MeVal, MeLeu und der Artefakt des MeBmt nachgewiesen. Für die Präsenz des intakten MeBmt sprechen ferner das Fragment  $m/z$  1062 im MS, die charakteristischen  $^1\text{H}$ -NMR-Signale für CH<sub>3</sub>-CH=CH und CHOH sowie die leicht verlaufende Hydrierung zum Dihydrocyclosporin Q. Nach diesen Befunden ist im Cyclosporin Q offensichtlich eine der 4 MeLeu-Einheiten des Cyclosporin A durch Val ersetzt und zwar diejenige in Position 4, wie aus folgenden  $^1\text{H}$ -NMR-Daten hervorgeht: Die den CH<sub>3</sub>-N-Gruppen entsprechenden Signale der Aminosäuren 1 (MeBmt), 3 (Sar), 6 (MeLeu), 10 (MeLeu) und 11 (MeVal) erscheinen bei gleichen ppm-Werten wie beim Cyclosporin A. Das Signal bei 3,12 ppm, das beim Cyclosporin A den beiden CH<sub>3</sub>-N-Gruppen der MeLeu-Einheiten 4 und 9 zugeordnet wird (entsprechend 6 H), tritt ebenfalls an gleicher Stelle auf, seine

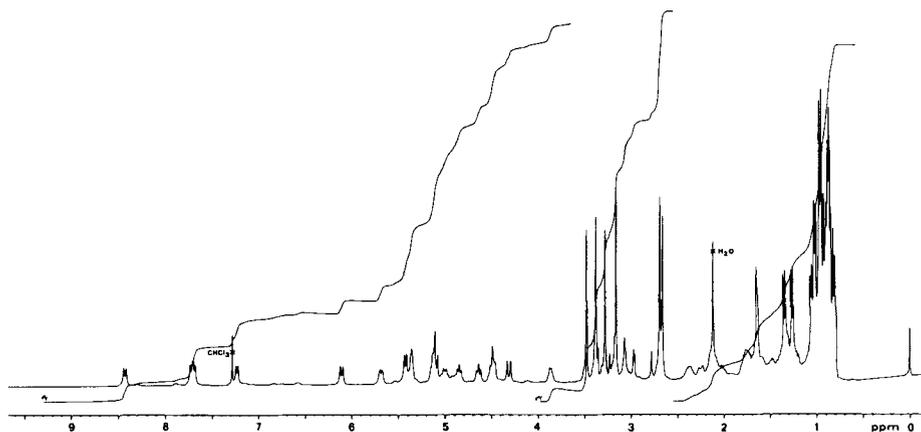


Fig. 3.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cyclosporin Q in  $\text{CDCl}_3$

Tab. 8.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten ( $\delta$ [ppm]) der Aminosäuren 4 und 3 der Cyclosporine A und Q

C-Atom	Cyclosporin Q Val	Cyclosporin A MeLeu	C-Atom	Cyclosporin Q Sar	Cyclosporin A Sar
CH <sub>3</sub> -N(2.4)	–	31,32	CH <sub>3</sub> -N(2.3)	39,05	39,40
C(2.4)	58,07	55,51	C(2.3)	54,64	50,37
C(3.4)	28,69	35,99			
C(4.4)	19,48	24,90			
C(4'.4)	16,25	–			
C(5.5)	–	23,49			
C(5'.5)	–	21,18			

Intensität entspricht jedoch nur einer  $\text{CH}_3\text{N}$ -Gruppe. Den relevanten Hinweis für die Lokalisierung des Val in Position 4 liefern die Signale der beiden Protonen an C(2) des benachbarten Sar (Stellung 3): Bei Cyclosporin Q ist eines der beiden Signale von 4,75 ppm (Cyclosporin A) nach 4,3 ppm verschoben (Fig. 3). Mit der abgeleiteten Position 4 für die Val-Einheit in Cyclosporin Q sind die im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum beobachteten Signal-Verschiebungen in Übereinstimmung (Tab. 8). Cyclosporin Q erfährt gegenüber Cyclosporin A deutliche Deformationen der Konformation.

Cyclosporin R = [ $\text{Leu}^{6(?)}$ ,  $\text{Leu}^{10(?)}$ ]Cyclosporin A. Cyclosporin R ( $m/z$  1174 ( $\text{MH}^+$ )) konnte nur in minimalen Mengen aus Mutterlaugenpräparaten von Cyclosporin C isoliert werden. Im Hydrolyse-Gemisch wurden neben den üblichen aus Cyclosporin A erhältlichen Aminosäuren 2 Leu-Moleküle nachgewiesen. Die GC-Bestimmung an Chirasil [19] ergab für alle nicht *N*-methylierten Aminosäuren die *L*-Konfiguration; eine Ausnahme bildete erwartungsgemäss die typische *D*-Ala-Einheit. Obschon das Präparat aufgrund des scharfen Piks im HPLC weitgehend einheitlich ist, zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ein komplexes, nicht interpretierbares Bild (Fig. 4); es lässt sich einzig aufgrund der Integrale ableiten, dass Cyclosporin R 5  $\text{CONCH}_3$ - und 6  $\text{CONH}$ -Gruppen enthält und demnach eine Bis-*N*-demethyl-Verbindung darstellt. Offenbar liegen im Cyclosporin R zwei der im Cyclosporin A enthaltenen MeLeu-Einheiten in *N*-demethylierter Form vor. Die vorgeschlagenen Positionen 6 und 10 sind jedoch vorläufig spekulativ, da die vorhandenen experimentellen Daten keine exakte Lokalisierung erlauben. Eine Absicherung der Aminosäure-Sequenz durch Verknüpfung der Cyclosporine R und A über ein gemeinsames Permethylierungsprodukt konnte aus Materialmangel noch nicht durchgeführt werden.

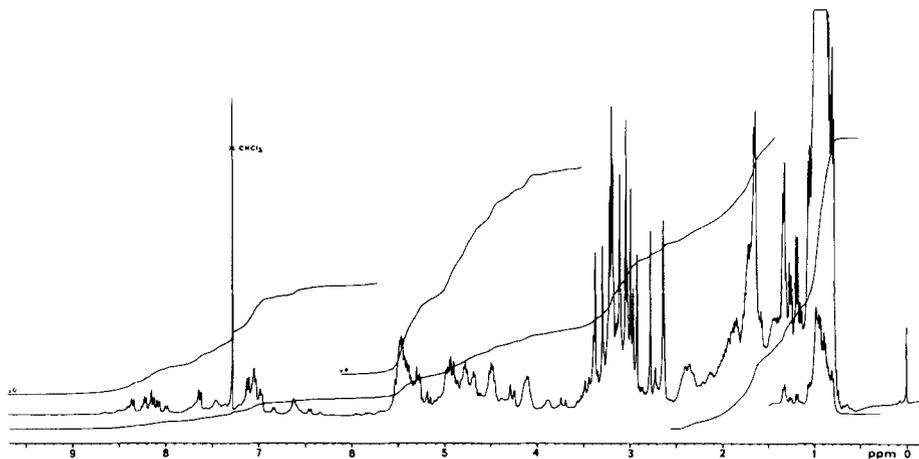


Fig. 4.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cyclosporin R in  $\text{CDCl}_3$

Cyclosporin S = [ $\text{Thr}^2$ ,  $\text{Val}^4$ ]Cyclosporin A. Cyclosporin S ( $m/z$  1190 ( $\text{MH}^+$ )) besitzt eine ähnliche Aminosäure-Zusammensetzung wie Cyclosporin C, wobei lediglich eine der 4 MeLeu-Einheiten durch Val ausgetauscht ist. Das Vorliegen von Thr und des intakten MeBmt ist im MS durch die typischen Fragmente  $m/z$  1146 und 1078 ersichtlich (Abspaltung von  $\text{CH}_3\text{CHO}$  aus Thr bzw.  $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}$  aus MeBmt).  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren bieten ein komplexes Bild und erlaubten keine sichere Interpretation. Für detaillierte  $^1\text{H}$ -NMR-Studien wurde deshalb der Chloracetylester des Cyclosporin S herangezogen, der durch übliche Acylierung der OH-Gruppe von Thr leicht zugänglich ist. Im gut aufgelösten Spektrum dieses Derivates treten die gleichen Signal-Verlagerungen im Bereich der Amid-Protonen und der Protonen an C(2) der Aminosäuren 3 und 4 auf wie bei Cyclosporin Q, das ebenfalls eine Val-Einheit in Position 4 enthält (s. oben).

Cyclosporin T = [ $\text{Leu}^{10}$ ]Cyclosporin A. Beim Cyclosporin T handelt es sich um ein weiteres *N*-Demethyl-Derivat des Cyclosporin A. Im MS tritt neben dem Molekularpik bei  $m/z$  1188 ( $\text{MH}^+$ ) ein Pik bei 1076 auf, der durch die Abspaltung des typischen  $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}$ -Fragmentes von MeBmt entsteht. Der Nachweis einer Leu-Einheit im Gemisch der Hydrolyse-Produkte und die Verknüpfung der Cyclosporine T und A über ein identisches Permethylierungsprodukt bestätigen den grundsätzlich gleichen Aufbau der Peptid-Kette in den beiden Metaboliten. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cyclosporin T sind erwartungsgemäss 5  $\text{CONH}$ - und 6  $\text{CONCH}_3$ -Gruppen ersichtlich.

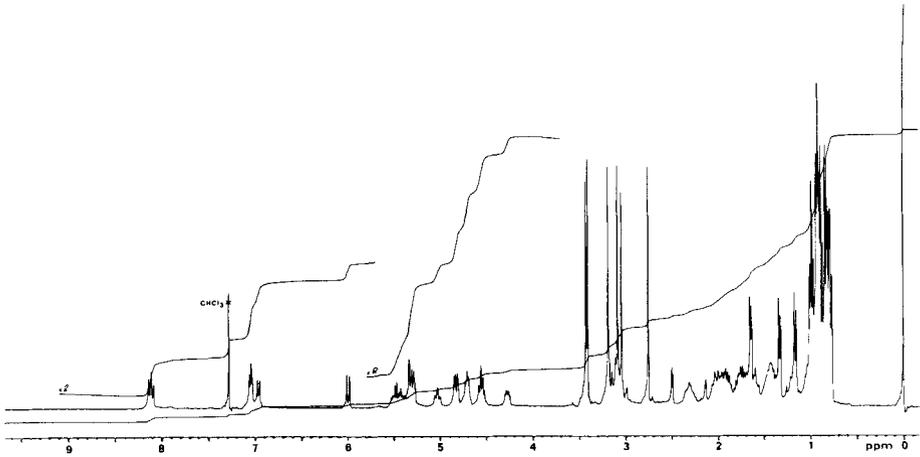


Fig. 5.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin T in  $\text{CDCl}_3$

Die  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten erlauben den Schluss, dass von den 4 im Cyclosporin A enthaltenen MeLeu-Einheiten MeLeu-10 im Cyclosporin T in demethylierter Form vorliegt. Die relevanten Verlagerungen der Signale für C(2.9) und C(2.10) sind in Tab. 6 angegeben.

Die drei bis jetzt mit Sicherheit bekannten  $N^{2,10}$ -Demethyl-Verbindungen, die Cyclosporine I, N und T, weisen aufgrund ihrer  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren (Tab. 18) praktisch deckungsgleiche Konformationen auf. (Für Cyclosporin R erlauben die komplexen NMR-Spektren keine sichere Zuordnung.)

Cyclosporin U = [Leu<sup>6</sup>]Cyclosporin A. Mit Cyclosporin U ( $m/z$  1188 ( $\text{MH}^+$ )) liegt erneut ein  $N$ -Demethyl-Derivat des Cyclosporin A vor. Im Gemisch der Aminosäuren lässt sich neben den üblichen Komponenten ein Leu anstelle eines MeLeu nachweisen. In den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen die Cyclosporine A und U folgende Unterschiede: H-C(2) von Val-5 erfährt eine Hochfeldverschiebung von 4,6 ppm nach 4,07 ppm und H-C(2.6) von 5,0 nach 4,32 ppm. Die Signale der H-C(2) von MeLeu-4, -9 und -10 werden hingegen nicht beeinflusst. Diese Effekte sprechen für die Stellung 6 des Leu in Cyclosporin U. Auch die  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten weisen auf die Position 6 für Leu hin, da signifikante Signal-Verschiebungen bei den Aminosäuren 5 und 6 beobachtet werden (Tab. 9).

Nach Acetylierung der OH-Gruppe von MeBmt lässt sich Cyclosporin U in ein Permethylierungsprodukt überführen, das auch aus Cyclosporin A nach analogen Reaktionsschritten erhältlich ist. Das Vorliegen einer

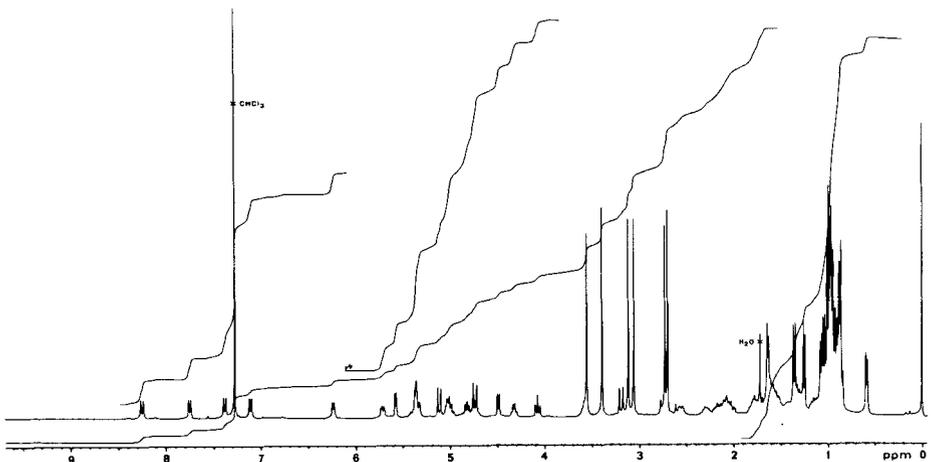


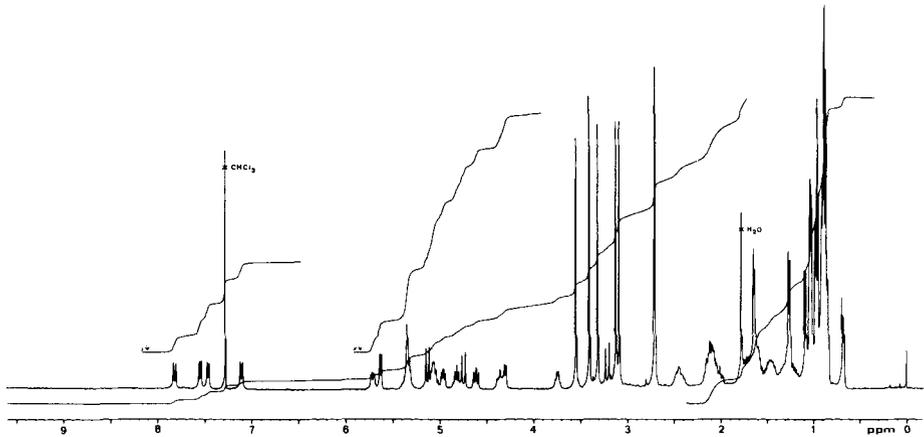
Fig. 6.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin U in  $\text{CDCl}_3$

Tab. 9.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten ( $\delta$ [ppm]) der Aminosäuren 5 und 6 der Cyclosporine A und U

C-Atom	Cyclosporin U Leu	Cyclosporin A MeLeu	C-Atom	Cyclosporin U Val	Cyclosporin A Val
$\text{CH}_3\text{-N}(2.6)$	–	31,53	C(2.5)	59,47	55,39
C(2.6)	53,17	55,31			
C(3.6)	40,72	37,41			
C(4.6)	25,51	25,40			
C(5.6)	23,10	23,85			
C(5'.6)	22,52	21,93			

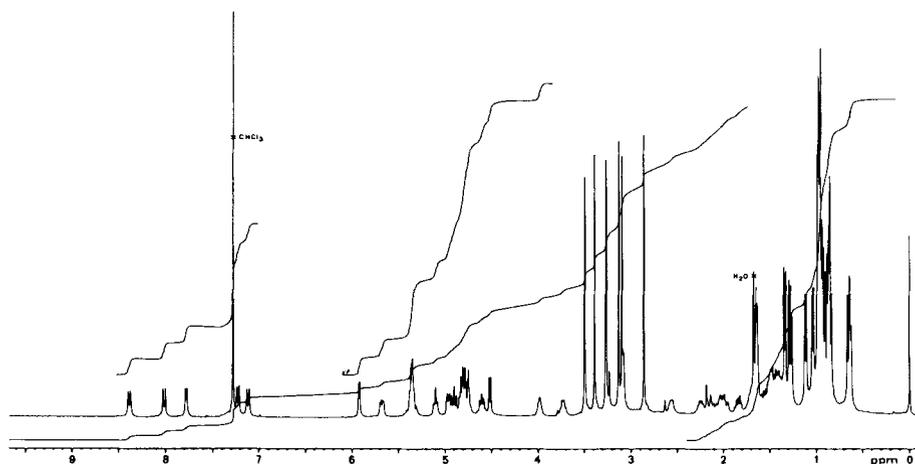
Leu-Einheit in Position 6 des Cyclosporin U hat beachtliche Auswirkungen auf die Konformation des Schlaufen-elementes und von MeBmt.

*Cyclosporin V* = [*Abu*<sup>7</sup>]Cyclosporin A. Cyclosporin V ( $m/z$  1216 ( $\text{MH}^+$ )) weist eine interessante Aminosäure-Zusammensetzung auf, da erstmals 2 Einheiten *L*- $\alpha$ -Aminobuttersäure und lediglich 1 Ala (*D*-Konfiguration nach *Chirasil*-Chromatographie) auftreten. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cyclosporin V fehlt dementsprechend das  $\text{CH}_3$ -Signal eines Ala (kein *d* bei 1,4 ppm, Integral 3 H). Ferner ist das Signal von H–C(2.7) von 4,5 nach 4,35 ppm verschoben und zeigt ein stark verändertes Kopplungsbild. Diese Befunde sprechen für den Ersatz des im Cyclosporin A vorliegenden *L*-Alanin (Ala-7) durch *L*- $\alpha$ -Aminobuttersäure im Cyclosporin V. Die postulierte Strukturdivergenz wird durch die Auswertung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren bestätigt (Tab. 10). Die übrigen Signale weisen nur marginale Abweichungen auf und unterstreichen die weitgehende Ähnlichkeit der Konformationen der Cyclosporine A und V (Tab. 18).

Fig. 7.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cyclosporin V in  $\text{CDCl}_3$ Tab. 10.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten ( $\delta$ [ppm]) der Aminosäure 7 der Cyclosporine A und V

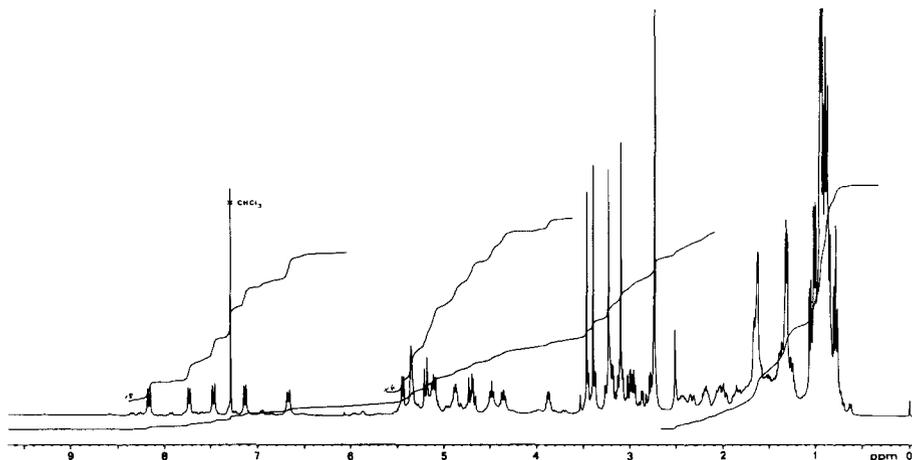
C-Atom	C(2.7)	C(3.7)	C(4.7)
Cyclosporin V, Abu	54,98	23,12	10,82
Cyclosporin A, Ala	48,69	16,07	–

*Cyclosporin W* = [*Thr*<sup>2</sup>,*Val*<sup>11</sup>]Cyclosporin A. Bei Cyclosporin W ( $m/z$  1204 ( $\text{MH}^+$ )) handelt es sich wiederum um eine *N*-Demethyl-Verbindung, wie aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren hervorgeht (5 CONH, 6 CONCH<sub>3</sub>). Im Gemisch der Hydrolyse-Produkte werden u. a. Thr und eine zweite Val-Einheit (anstelle des MeVal) nachgewiesen; Cyclosporin W wird deshalb tentativ als *N*<sup>2,11</sup>-Demethylcyclosporin C formuliert. Zur Bestätigung wurde ein Vergleich der NMR-Spektren von Cyclosporin W mit dem strukturell durch Röntgenanalyse gesicherten Cyclosporin E (= *N*<sup>2,11</sup>-Demethylcyclosporin A) [11] durchgeführt (Fig. 8; Tab. 18). Mit Ausnahme der durch die


 Fig. 8.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin W in  $\text{CDCl}_3$ 

(Thr-2)-Einheit bedingten Verschiebungen sind die entsprechenden Spektren weitgehend übereinstimmend. Bei den Cyclosporinen E und W treten im Schlaufenteil (Aminosäuren 6–11) wesentliche Konformationsänderungen auf, die durch eine zusätzliche H-Brücke vom Amid-Proton des Val-11 zur CO-Gruppe des D-Ala-8 verursacht werden.

Cyclosporin X = [*Nva*<sup>2</sup>,*Leu*<sup>9</sup>]Cyclosporin A. Mit Cyclosporin X ( $m/z$  1202 ( $\text{MH}^+$ )) liegt eine *N*-Demethyl-Verbindung vor, die eine ähnliche Aminosäure-Komposition aufweist wie Cyclosporin G (*Nva*, jedoch *Leu*


 Fig. 9.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin X in  $\text{CDCl}_3$ 

 Tab. 11.  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten ( $\delta$ [ppm]) der Aminosäure 9 der Cyclosporine A, G und X

C-Atom	Cyclosporin X Leu	Cyclosporin A MeLeu	Cyclosporin G MeLeu	C-Atom	Cyclosporin X Leu	Cyclosporin A MeLeu	Cyclosporin G MeLeu
$\text{CH}_3\text{-N}(2.9)$	–	29,65	29,57	C(4.9)	24,65	24,70	24,65
C(2.9)	45,86	48,30	48,30	C(5.9)	23,87	23,87	23,92
C(3.9)	42,94	39,04	39,05	C(5'.9)	22,04	21,86	21,83

anstelle einer MeLeu-Einheit). Hinweise für die Lage des Leu ergeben sich zunächst aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum durch die beobachtete Verschiebung von  $\text{H-C}(2.9)$  von 5,7 ppm (im Cyclosporin G) nach 4,8 ppm (Fig. 9). Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum fällt das Fehlen der  $\text{CH}_3\text{N}$ -Gruppe der Aminosäure 9 und die markanten Verlagerungen der C(2)- und C(3)-Signale (Tab. 11) auf. Mit Cyclosporin X wurde das erste natürlich vorkommende  $\text{N}^{2,9}$ -Demethyl-Derivat aufgefunden.

*Cyclosporin Y* = [*Nva*<sup>2</sup>, *Leu*<sup>6</sup>] *Cyclosporin A*. Auch Cyclosporin Y ( $m/z$  1202 ( $\text{MH}^+$ )) erweist sich als *N*-Demethyl-Verbindung mit naher Verwandtschaft zum Cyclosporin G. Als spezielle Aminosäuren wurden 1 *Nva* und 1 *Leu* festgestellt. Die Permethylierungsprodukte der Cyclosporine Y und G sind identisch und bestätigen die grundsätzlich gleiche Aminosäure-Sequenz der beiden Naturstoffe. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin Y sind die Signale für 5 CONH- und 6 CONCH<sub>3</sub>-Gruppierungen signifikant sowie die weitgehende Übereinstimmung mit den Spektren von Cyclosporin U (= [*Leu*<sup>6</sup>] *Cyclosporin A*). Die analoge Position 6 für die *Leu*-Einheit in Cyclosporin Y ist damit evident; zusätzliche Hinweise ergeben sich auch aus den  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren (Tab. 18).

*Cyclosporin Z* = [*N-Methyl-L-2-aminooctansäure*<sup>1</sup>] *Cyclosporin A*. Cyclosporin Z ( $m/z$  1174 ( $\text{MH}^+$ )) unterscheidet sich von Cyclosporin A im Bau der Aminosäure 1, wie im MS aus der Absenz des erwarteten Fragmentpiks  $m/z$  1062 ( $-\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}$ ) ersichtlich ist. Zudem tritt im IR-Spektrum keine OH-Bande auf, und im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Fig. 10) ist kein mit  $\text{D}_2\text{O}$  austauschbares Signal zu beobachten. Ferner fehlen die Signale für das Methin-Proton  $\text{H-C}(3.1)$  von MeBmt ( $\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}$ ) im Bereich von 3,6–4,2 ppm und das  $d$  bei 1,6 ppm für die endständige  $\text{CH}_3$ -Gruppe ( $\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}$ ). Die Hydrolyse von Cyclosporin Z liefert die gleichen Bausteine wie Cyclosporin A, wobei jedoch anstelle des Artefakts von MeBmt eine neue, mit Ninhydrin schwach anfärbbare Aminosäure erscheint. Nach präparativer Isolierung wird dieses Spaltstück als kristallisierte Verbindung  $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_2$  erhalten und als *N-Methyl-L-2-aminooctansäure* erkannt. Die *L*-Konfiguration lässt sich aus der positiven Differenz der optischen Drehwerte beim Übergang der freien Aminosäure ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +18^\circ$ ) in das Hydrochlorid ableiten ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +29^\circ$ ; Regel nach Clough-Lutz-Jirgensons [20]). Struktur und Position 1 der neuen Aminosäure werden auch durch die NMR-Daten belegt (Tab. 12).

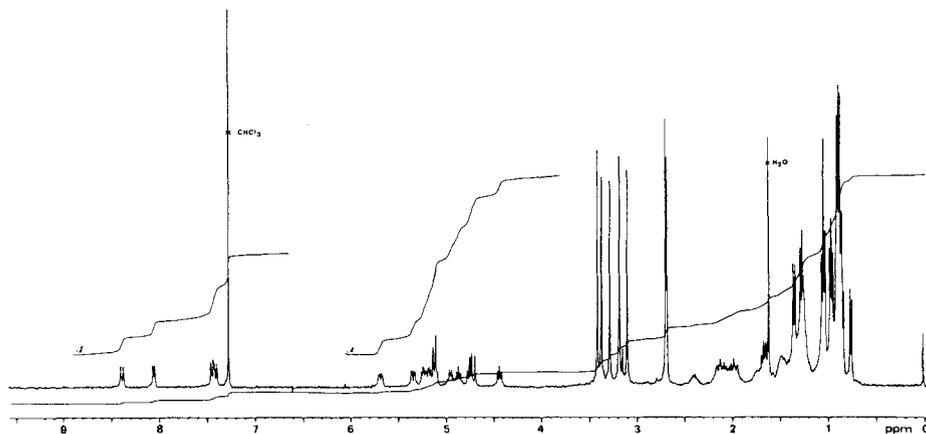


Fig. 10.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Cyclosporin Z in  $\text{CDCl}_3$

Tab. 12.  $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten ( $\delta$  [ppm]) der Aminosäure 1 der Cyclosporine A und Z

C-Atom	Cyclosporin Z <i>N-Methyl-2-amino-</i> octansäure	Cyclosporin A MeBmt	C-Atom	Cyclosporin Z <i>N-Methyl-2-amino-</i> octansäure	Cyclosporin A MeBmt
$\text{CH}_3-\text{N}(2.1)$	31,71 ( $\text{CH}_3$ )	33,97 ( $\text{CH}_3$ )	C(5.1)	29,52 ( $\text{CH}_2$ )	35,63 ( $\text{CH}_2$ )
C(2.1)	56,68 (CH)	58,75 (CH)	C(6.1)	31,25 ( $\text{CH}_2$ )	129,68 ( $\text{CH}=\text{}$ )
C(3.1)	30,24 ( $\text{CH}_2$ )	74,74 (CH)	C(7.1)	22,66 ( $\text{CH}_2$ )	126,32 ( $\text{CH}=\text{}$ )
C(4.1)	26,03 ( $\text{CH}_2$ )	35,99 (CH)	C(8.1)	14,02 ( $\text{CH}_3$ )	17,96 ( $\text{CH}_3$ )
C(4'.1)	–	16,76 ( $\text{CH}_3$ )			

**4. Struktur-Aktivitätsrelationen.** – Die in *Tab. 13* zusammengestellten Daten ermöglichen eine empirische Ableitung der wichtigsten Struktur-Wirkungsbeziehungen in der Cyclosporin-Reihe. Zum Verständnis der Interaktionen zwischen Wirkstoff und Rezeptor wurden zunächst Konformationsbestimmungen mittels Röntgen-Kristallanalyse eines Iod-Derivates von Cyclosporin A durchgeführt. Danach liegen die Aminosäuren 11 sowie 1–6 in einer verdrillten  $\beta$ -Faltblatt-Struktur vor, die durch 3 H-Brücken stabilisiert wird. Die restlichen Aminosäure-Einheiten bilden eine Schlaufe, in der die MeLeu-Einheiten 9 und 10 über eine *cis*-Amid-Bindung verknüpft sind [6]. Eine weitere Röntgenstrukturanalyse sowie extensive NMR-Studien wurden später mit kristallisiertem Cyclosporin A durchgeführt. Danach weist Cyclosporin A im Kristall und in apolarer Lösung

Tab. 13. *Biologische Aktivitäten*<sup>a)</sup>

Cyclosporin		Immun-suppression	Antifungische Aktivität
Cy A = Cyclosporin ( <i>Sandimmun</i> <sup>®</sup> )	= Cyclosporin A	+++	+
Cy B = [Ala <sup>2</sup> ]Cy A		+	+
Cy C = [Thr <sup>2</sup> ]Cy A		++	+
Cy D = [Val <sup>2</sup> ]Cy A		+	+
Cy E = [Val <sup>11</sup> ]Cy A	= <i>N</i> <sup>2,11</sup> -Demethyl-Cy A	(+)	+
Cy F = [Deoxy-MeBmt <sup>1</sup> ]Cy A	= Deoxy-Cy A	(+)	+
Cy G = [Nva <sup>2</sup> ]Cy A		+++	+
Cy H = [D-MeVal <sup>11</sup> ]Cy A		–	–
Cy I = [Val <sup>2</sup> , Leu <sup>10</sup> ]Cy A	= <i>N</i> <sup>2,10</sup> -Demethyl-Cy D	(+)	+
Cy K = [Deoxy-MeBmt <sup>1</sup> , Val <sup>2</sup> ]Cy A	= Deoxy-Cy D	(+)	(+)
Cy L = [Bmt <sup>1</sup> ]Cy A	= <i>N</i> <sup>2,1</sup> -Demethyl-Cy A	+	+
Cy M = [Nva <sup>2</sup> , Nva <sup>5</sup> ]Cy A	= [Nva <sup>2</sup> ]Cy G	++	+
Cy N = [Nva <sup>2</sup> , Leu <sup>10</sup> ]Cy A	= <i>N</i> <sup>2,10</sup> -Demethyl-Cy G	+	+
Cy O = [MeLeu <sup>1</sup> , Nva <sup>2</sup> ]Cy A	= [MeLeu <sup>1</sup> ]Cy G	(+)	(+)
Cy P = [Bmt <sup>1</sup> , Thr <sup>2</sup> ]Cy A	= <i>N</i> <sup>2,1</sup> -Demethyl-Cy C	+	+
Cy Q = [Val <sup>4</sup> ]Cy A		(+)	(+)
Cy R = [Leu <sup>7</sup> , Leu <sup>3</sup> ]Cy A	= Di- <i>N</i> -demethyl-Cy A	(+)	+
Cy S = [Thr <sup>2</sup> , Val <sup>4</sup> ]Cy A	= [Val <sup>4</sup> ]Cy C	(+)	(+)
Cy T = [Leu <sup>10</sup> ]Cy A	= <i>N</i> <sup>2,10</sup> -Demethyl-Cy A	++	+
Cy U = [Leu <sup>6</sup> ]Cy A	= <i>N</i> <sup>2,6</sup> -Demethyl-Cy A	+	+
Cy V = [Abu <sup>7</sup> ]Cy A		++	+
Cy W = [Thr <sup>2</sup> , Val <sup>11</sup> ]Cy A	= <i>N</i> <sup>2,11</sup> -Demethyl-Cy C	(+)	(+)
Cy X = [Nva <sup>2</sup> , Leu <sup>9</sup> ]Cy A	= <i>N</i> <sup>2,9</sup> -Demethyl-Cy G	+	(+)
Cy Y = [Nva <sup>2</sup> , Leu <sup>6</sup> ]Cy A	= <i>N</i> <sup>2,6</sup> -Demethyl-Cy G	+	+
Cy Z = [ <i>N</i> -Methyl-2-aminooctansäure <sup>1</sup> ]Cy A		(+)	(+)

<sup>a)</sup> +++ hochaktiv; ++ gut wirksam; + mässig aktiv; (+)– schwach aktiv oder inaktiv.

eine weitgehend ähnliche, starre Konformation des Ringgerüsts auf wie das Iod-Derivat. Die zusätzlich erhaltenen Informationen über die sterische Anordnung und Raumerfüllung der einzelnen Aminosäure-Seitenketten zeigten bemerkenswerterweise, dass die Seitenkette der C<sub>9</sub>-Aminosäure MeBmt im Kristall in die  $\beta$ -Falte eingezogen vorliegt, während in apolarer Lösung die Seitenkette vom Ringgerüst absteht [8].

*Immunsuppression.* Die dominierende Rolle der charakteristischen Aminosäure MeBmt für die immunsuppressive Wirkung bestätigt sich auch bei den neuen Cyclosporinen. *N*<sup>2,1</sup>-Demethyl-Verbindungen (Cyclosporine L und P) sowie Dihydro-Derivate sind

wesentlich schwächer aktiv, 3,1-Deoxy-Derivate (Cyclosporine F und K) zeigen praktisch keine Wirkung. Der Ersatz dieses essentiellen Strukturelementes (MeBmt) durch *N*-Methyl-L-2-aminooctansäure (Cyclosporin Z) oder MeLeu (Cyclosporin O) führt ebenfalls zum weitgehenden Verlust der Immunsuppression. Toleriert wird hingegen der häufig auftretende Austausch der Aminosäure 2 (Abu). Je nach Länge bzw. Raumerfüllung der Seitenkette der substituierenden Aminosäure wird eine hohe oder lediglich leicht verminderte Aktivität beobachtet. Die Vertreter dieses Typs (Cyclosporine A, B, C, D und G) weisen praktisch gleiche Konformationen auf [11] [21]. Natürlich vorkommende Varianten mit ausgetauschter Aminosäure 3 (Sar) sind bis jetzt nicht gefunden worden. Hingegen sind zwei Komponenten bekannt, die anstelle von MeLeu-4 eine Val-Einheit enthalten (Cyclosporine Q und S); beide Metabolite bewirkten keine signifikante Unterdrückung der Immunantwort. Der Ersatz von Val-5 durch Nva (Cyclosporin M) zieht dagegen nur einen geringfügigen Wirkungsabfall nach sich. *N*-Demethylierung der Aminosäure 6 (Leu anstelle von MeLeu, Cyclosporine R, U und Y) führt zu deutlich deformierten Konformationen im Schlaufenteil; bei den Cyclosporinen R, U und Y wird eine marginale Immunsuppression beobachtet. Substitution des Ala-7 durch die homologe L- $\alpha$ -Aminobuttersäure hat hingegen keine grosse Dämpfung der Wirkungsstärke zur Folge (Cyclosporin V). Ohne Wirkungseinbusse kann auch die ungewöhnliche D-Ala-8-Einheit gegen D-Ser ausgetauscht werden, wie das aktive, durch gesteuerte Biosynthese erhältliche [D-Ser<sup>8</sup>]Cyclosporin A zeigt [17]. Einen ungünstigen Effekt bewirkt die *N*-Demethylierung von MeLeu-9 (Cyclosporin X), während bei den *N*<sup>2,10</sup>-Demethyl-Derivaten (Cyclosporine I, N, R und T) immer noch Aktivitäten zwischen mässig bis marginal auftreten. Wie das MeBmt-1 ist auch der benachbarte Baustein MeVal-11 für die Ausübung einer Immunsuppression von entscheidender Bedeutung. Eine *N*-Demethylierung wie sie in den Cyclosporinen E und W vorliegt (Val anstelle von MeVal), ermöglicht die Ausbildung einer zusätzlichen H-Brücke von Val-11 zu D-Ala-8, und erzeugt damit eine signifikante Konformationsänderung [11] [21]. Die beiden Metabolite sind nur schwach wirksam. Eine noch tiefergreifende Abweichung von der molekularen Konformation des Cyclosporin A wird durch eine Konfigurationsumkehr bei der Aminosäure 11 bewirkt. Diese Situation liegt im Cyclosporin H<sup>4)</sup> vor (D-MeVal anstatt MeVal), der beobachtete totale Wirkungsverlust ist nicht überraschend.

*Antifungale Wirkung.* Die Cyclosporine weisen gegen Fadenpilze ein breites Wirkungsspektrum auf, allerdings sind die minimalen Hemmkonzentrationen relativ hoch. Unter den geprüften Organismen sind *Neurospora crassa* (Ascomycetes) und *Aspergillus niger* (*Fungi imperfecti*) besonders empfindlich. Die Hemmwirkung der Cyclosporine äussert sich in morphologischen Veränderungen, insbesondere sind Deformationen und starke Verästelung der wachsenden Hyphenspitzen festzustellen [2]. Der Wirkungsmechanismus ist noch unklar, doch scheint eine Beeinträchtigung der Zellwand-Synthese eine Rolle zu spielen. Unter den Hefen finden sich nur wenige sensitive Stämme.

Die antifungale Wirkung der Cyclosporine erweist sich als weniger strukturspezifisch. Variationen der Struktur und Konformation beeinflussen die Aktivität nur graduell. Eine Ausnahme bildet das inaktive Cyclosporin H, dessen stark divergierende Konformation durch die unnatürliche (D-MeVal-11)-Einheit bedingt ist.

<sup>4)</sup> Das Vorliegen von *N*-Methyl-D-valin im Cyclosporin H [11] wurde inzwischen durch präparative Isolierung und Konfigurationsbestimmung der fraglichen Aminosäure bestätigt.

Experimenteller Teil

**1. Isolierung der neuen Cyclosporine.** – Die chromatographische Auftrennung der Cyclosporin-Nebenfraktionen bzw. Mutterlaugen in die einzelnen Komponenten wurde nach dem im *Schema 1* angegebenen Weg ausgeführt (vgl. auch [11]). Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (Merck, Korngrösse 0,063–0,2 mm/0,04–0,063 mm) bzw. Lichroprep® RP-18 (Merck, Korngrösse 40–63 µm). DC: Kieselgel-Fertigplatten Merck oder Polygram-Sil-G-Folien (Macherey-Nagel & Co.); Detektion mit I<sub>2</sub> oder Dragendorff-Reagens; R<sub>F</sub>-Werte, Tab. 14.

Tab. 14. R<sub>F</sub>-Werte der Cyclosporine A–Z in verschiedenen DC-Systemen<sup>a)</sup>

Metabolit	AcOEt <sup>b)</sup>	Aceton/Hexan 1:1	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 96:4	Et <sub>2</sub> O/MeOH 9:1
Cyclosporin A	0,40	0,37	0,27	0,35
Cyclosporin B	0,22	0,28	0,18	0,23
Cyclosporin C	0,15	0,22	0,12	0,17
Cyclosporin D	0,58	0,46	0,31	0,42
Cyclosporin E	0,32	0,31	0,26	0,23
Cyclosporin F <sup>c)</sup>	0,50	0,49	0,37	0,39
Cyclosporin G	0,50	0,43	0,33	0,38
Cyclosporin H	0,39	0,39	0,23	0,38
Cyclosporin I	0,43	0,33	0,27	0,35
Cyclosporin K	0,65	0,52	0,40	0,48
Cyclosporin L	0,36	0,34	0,23	0,29
Cyclosporin M	0,52	0,44	0,43	0,39
Cyclosporin N	0,48	0,35	0,35	0,37
Cyclosporin O <sup>c)</sup>	0,61	0,53	0,46	0,51
Cyclosporin P	0,14	0,17	0,12	0,18
Cyclosporin Q	0,16	0,23	0,11	0,28
Cyclosporin R	0,26	0,25	0,13	0,36
Cyclosporin S	0,07	0,11	0,05	0,15
Cyclosporin T	0,35	0,27	0,23	0,34
Cyclosporin U	0,41	0,35	0,28	0,37
Cyclosporin V	0,46	0,41	0,31	0,41
Cyclosporin W	0,08	0,12	0,12	0,10
Cyclosporin X	0,31	0,31	0,15	0,37
Cyclosporin Y	0,52	0,40	0,28	0,43
Cyclosporin Z <sup>c)</sup>	0,53	0,50	0,37	0,45

<sup>a)</sup> Kieselgel-Fertigplatten Merck; Detektion: I<sub>2</sub>-Dampf; Laufstrecke 10 cm (wenn nicht anders angegeben).

<sup>b)</sup> Laufstrecke 3 × 10 cm. <sup>c)</sup> Anfärbung mit I<sub>2</sub>-Dampf schwächer als übrige Cyclosporine.

HPLC: Lichroprep® RP-8 (Merck, 5 µm, 250 × 4,6 mm; MeCN/H<sub>2</sub>O/MeOH 56:39:5 (v/v) unter Zusatz von 0,2 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und 0,2 ml Et<sub>3</sub>N/l) bzw. Shandon Hypersil (5 µm, 250 × 4,6 mm; MeCN/H<sub>2</sub>O/Orthophosphorsäure 630:370:0,1) bei 75°; UV-Detektion bei 210 nm; α-Werte, Tab. 15.

Tab. 15. α-Werte im HPLC der Cyclosporine A–Z. Stationäre Phase: Shandon Hypersil (5 µm, 250 × 4,6 mm); mobile Phase: MeCN/H<sub>2</sub>O/Orthophosphorsäure 630:370:0,1; Fluss 1,5 ml/min; Temp. 75°; Detektion 210 nm.

Cyclosporin	α-Wert	Cyclosporin	α-Wert	Cyclosporin	α-Wert
Cyclosporin S	2,81	Cyclosporin H	9,85	Cyclosporin D	14,22
Cyclosporin Q	4,44	Cyclosporin A	10,00	Cyclosporin O	14,81
Cyclosporin R	5,18	Cyclosporin T	10,52	Cyclosporin M	15,11
Cyclosporin P	5,52	Cyclosporin Y	11,39	Cyclosporin F	19,84
Cyclosporin C	6,37	Cyclosporin I	12,12	Cyclosporin E	20,14
Cyclosporin B	7,48	Cyclosporin V	12,44	Cyclosporin Z	24,58
Cyclosporin L	8,22	Cyclosporin G	12,96	Cyclosporin K	28,88
Cyclosporin U	8,89	Cyclosporin W	13,18		
Cyclosporin X	9,70	Cyclosporin N	13,26		

**2. Charakterisierung der Cyclosporine.** – Schmp., opt. Drehwerte und Bruttoformeln: s. *Tab. 1*. UV (MeOH): Endabsorption gegen 200 nm. IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): charakteristische Amid-Banden bei 1630–1670  $\text{cm}^{-1}$ ; für MeBmt, OH-Absorption bei ca. 3400 sowie (C=C)-Bande bei 970  $\text{cm}^{-1}$ . EI-MS, FD-MS und FAB-MS (mit 3-Nitrobenzylalkohol als Matrix): *Varian-MAT-212*-Spektrometer; Angaben in *m/z*. Elementaranalysen: s. *Tab. 16*.

Tab. 16. Elementaranalysen der Cyclosporine K–Z

	Ber. [%]				Gef. [%]			
	C	H	N	O	C	H	N	O
Cy K	63,0	9,5	12,8	14,7	63,1	9,7	12,6	14,8
Cy L	61,6	9,2	13,0	16,2	61,7	9,5	12,8	16,3
Cy M	62,2	9,4	12,7	15,8	62,5	9,5	12,5	16,0
Cy N	61,9	9,3	12,8	16,0	62,0	9,2	12,6	16,0
Cy O	62,1	9,4	13,3	15,2	62,1	9,3	13,3	15,2
Cy P	60,8	9,1	12,8	17,3	60,7	9,2	12,6	17,5
Cy Q	61,4	9,2	13,1	16,3	61,3	9,1	13,0	16,2
Cy R	61,4	9,2	13,1	16,3	61,2	9,2	13,0	16,7
Cy S	60,5	9,1	12,9	17,5	60,3	9,1	12,8	18,2
Cy T	61,6	9,2	13,0	16,2	61,7	9,2	12,9	16,5
Cy U	61,6	9,2	13,0	16,2	61,5	9,1	13,0	16,4
Cy V	62,2	9,3	12,7	15,8	61,9	9,6	12,5	16,3
Cy W	60,8	9,1	12,8	17,3	60,8	9,3	12,6	17,5
Cy X	61,9	9,3	12,8	16,0	61,8	9,1	12,8	16,3
Cy Y	61,9	9,3	12,8	16,0	61,8	9,6	12,7	16,4
Cy Z	62,4	9,5	13,1	15,0	62,3	9,6	12,9	15,1

**3. Aminosäure-Bestimmungen.** – 3.1. *Orientierende Aminosäure-Analysen.* Die Cyclosporine A–Z wurden durch 16 h 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 *Tab. 17* angegeben<sup>5)</sup>. Die orientierende DC-Untersuchung der Hydrolyse-Produkte erfolgte auf *Polygram-Folien Cel 400* mit BuOH/H<sub>2</sub>O/AcOH 4:1:1, Detektion mit Ninhydrin. In ausgewählten Fällen (Cy R, Cy V) wurden die Konfigurationen der nicht *N*-methylierten Aminosäuren in Form der entsprechenden *N*-Pentafluorpropionyl-isopropylester im GC an einer 'Chirasil-Val'-Kapillarsäule bestimmt.

3.2. *Präparative Isolierungen.* 3.2.1. *Hydrolyse von Cyclosporin L; Isolierung des Bmt-Artefakts (2S)-2-Amino-2-[(2R,3R)-5-Ethyl-2,3,4,5-tetrahydro-3-methylfuryl]essigsäure (A).* Ein Gemisch von 1,19 g (1 mmol) Cyclosporin L und 35 ml 6N HCl wurde 20 h unter Rückfluss erhitzt. Der Eindampfrückstand wurde in wenig H<sub>2</sub>O gelöst, durch eine schwach basische Ionenaustauschersäule (*Dowex AG 3-X4*, Acetat-Form) filtriert und so lange mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bis das Filtrat Ninhydrin-negativ war. Nach Eindampfen des Eluats wurde das rohe Aminosäure-Gemisch (1,45 g) an 320 g Cellulose-Pulver (*Avicel PH 101*) mit zu 95% H<sub>2</sub>O-ges. 2-Butanol chromatographiert (40 Fraktionen à 80 ml; DC: Fertigplatten 'Polygram Cel 400', BuOH/H<sub>2</sub>O/AcOH 4:1:1, Detektion mit Ninhydrin): 280 mg Mischfraktion aus A und *N*-Methyleucin, die durch weitere Chromatographie an Kieselgel mit PrOH/H<sub>2</sub>O/AcOH 85:10:5 aufgetrennt wurden: 146 mg reines A (Epimerengemisch), Schmp. 208–211° (Zers.),  $[\alpha]_D^{20} = -16,5^\circ$  ( $c = 0,57$ , MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1),  $[\alpha]_D^{20} = -7,7^\circ$  ( $c = 0,52$ , MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 + 1 Tropfen konz. HCl). IR (KBr): 2960, 1630, 1380, 1330, 1100, 1010. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O/DCI): 4,25 (*d*, H–C(2)); 4,0–4,1 (*m*, H–C(2'), H–C(5')); 2,3 (*m*, H–C(3')); 1,3–1,9 (*m*, CH<sub>2</sub>(4'), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,1 (*d*, CH<sub>3</sub>–C(3')); 0,9 (*t*, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>). FAB-MS: 188 (*MH*<sup>+</sup>). Anal. ber. für C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> (187,239): C 57,7, H 9,2, N 7,5, O 25,6; gef.: C 57,7, H 9,7, N 8,1, O 24,2.

Die aus der Cellulose-Säule nachfolgend eluierten Fraktionen enthielten nach DC *N*-Methyleucin, *N*-Methylvalin, Valin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Alanin und Sarcosin.

3.2.2. *Hydrolyse von Cyclosporin Z; Isolierung von N-Methyl-L-2-amino-octansäure.* Wie bei Cyclosporin L beschrieben wurden 1,18 g Cyclosporin Z hydrolysiert. Chromatographie des Aminosäure-Gemisches an Cellulose ergab 155 mg *N*-Methyl-L-2-amino-octansäure, aus MeOH/H<sub>2</sub>O Prismen vom Schmp. 257–258° (Zers.),  $[\alpha]_D^{20} = +18,1^\circ$  ( $c = 0,52$ , MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1),  $[\alpha]_D^{20} = +29,2^\circ$  ( $c = 0,53$ , MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 + 1 Tropfen konz. HCl). IR

<sup>5)</sup> *N*-Methylierte Aminosäuren werden wegen ihrer schwachen Farbreaktion mit Ninhydrin nicht erfasst, mit Ausnahme des Sar, das aber erfahrungsgemäss schwankende Werte liefert.

Tab. 17. *Analyse der Hydrolyse-Produkte der Cyclosporine A–Z nach Moore und Stein [22]*

Metabolit	Hydrolyse Dauer [h]	Aminosäure <sup>a)</sup>						
		Sar	Ala	$\alpha$ -Abu	Thr	Val	Nva	Leu
Cyclosporin A	16	(0,46) 1	(2,07) 2	(0,81) 1	–	(1,05) 1	–	–
Cyclosporin B	16	(0,64) 1	(2,99) 3	–	–	(1,04) 1	–	–
Cyclosporin C	16	(0,43) 1	(2,06) 2	–	(0,79) 1	(0,94) 1	–	–
Cyclosporin D	16	(0,39) 1	(1,99) 2	–	–	(2,01) 2	–	–
Cyclosporin E	48	(0,72) 1	(2,01) 2	(1,03) 1	–	(1,95) 2	–	–
Cyclosporin F	16	(0,65) 1	(2,05) 2	(0,89) 1	–	(0,95) 1	–	–
Cyclosporin G	16	(0,98) 1	(2,03) 2	–	–	(0,77) 1	(0,99) 1	–
Cyclosporin H	16	(0,82) 1	(2,14) 2	(0,98) 1	–	(1,02) 1	–	–
Cyclosporin I	48	(0,61) 1	(1,68) 2	–	–	(1,81) 2	–	(0,77) 1
Cyclosporin K	16	(0,91) 1	(2,00) 2	–	–	(1,63) 2	–	–
Cyclosporin L	16	(1,02) 1	(1,97) 2	(1,07) 1	–	(1,03) 1	–	–
Cyclosporin M	16	(0,74) 1	(1,58) 2	–	–	–	(1,41) 2	–
Cyclosporin N	16	(0,88) 1	(1,90) 2	–	–	(0,74) 1	(0,75) 1	(0,66) 1
Cyclosporin O	16	(0,81) 1	(2,03) 2	–	–	(0,68) 1	(0,83) 1	–
Cyclosporin P	16	(0,43) 1	(2,00) 2	–	(0,68) 1	(0,90) 1	–	–
Cyclosporin Q	48	(0,83) 1	(2,11) 2	(1,00) 1	–	(1,68) 2	–	–
Cyclosporin R	16	(0,81) 1	(1,98) 2	(0,99) 1	–	(1,02) 1	–	(1,35) 2
Cyclosporin S	48	(0,63) 1	(2,07) 2	–	(0,80) 1	(1,77) 2	–	–
Cyclosporin T	16	(0,47) 1	(1,79) 2	(0,82) 1	–	(0,88) 1	–	(0,68) 1
Cyclosporin U	16	(1,03) 1	(2,18) 2	(0,86) 1	–	(0,92) 1	–	(0,89) 1
Cyclosporin V	16	(1,02) 1	(1,00) 1	(1,39) 2	–	(0,66) 1	–	–
Cyclosporin W	48	(1,15) 1	(2,07) 2	–	(0,94) 1	(1,93) 2	–	–
Cyclosporin X	16	(0,97) 1	(2,03) 2	–	–	(0,87) 1	(0,74) 1	(0,97) 1
Cyclosporin Y	48	(1,15) 1	(2,09) 2	–	–	(0,96) 1	(1,05) 1	(0,89) 1
Cyclosporin Z	16	(1,16) 1	(2,02) 2	(1,06) 1	–	(0,98) 1	–	–

<sup>a)</sup> In Klammern die gefundenen, darunter die theoretischen Werte.

(KBr): 1625, 1580, 1460, 1400, 725.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 3,6 (*t*, H-C(2)); 2,7 (*s*,  $\text{CH}_3\text{NH}$ ); 1,9 (*m*,  $\text{CH}_2(3)$ ); 1,25–1,4 (*m*,  $\text{CH}_2(4)$ ,  $\text{CH}_2(5)$ ,  $\text{CH}_2(6)$ ,  $\text{CH}_2(7)$ ); 0,9 (*t*,  $\text{CH}_3(8)$ ). FAB-MS: 174 ( $\text{MH}^+$ ). Anal. ber. für  $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_2$  (173,256): C 62,4, H 11,1, N 8,1, O 18,5; gef.: C 62,5, H 11,2, N 8,3, O 18,6.

Die nachfolgend eluierten Fraktionen enthielten *N*-Methylleucin, *N*-Methylvalin, Valin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Alanin und Sarcosin (Nachweis mittels DC).

3.2.3. *Hydrolyse von Cyclosporin H; Isolierung von N-Methyl-D-valin*. Aus 5 g Cyclosporin H wurden nach Hydrolyse und Chromatographie an Cellulose 260 mg *N*-Methyl-D-valin erhalten; aus MeOH farblose Nadeln, Schmp. 280° (Zers.).  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -18,8^\circ$  ( $c = 2,05$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ). Vgl. *N*-Methyl-L-valin: Schmp. 250–260°,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +17,5^\circ$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) [23].

4. **NMR-Spektren.** – Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden auf einem Bruker-WH-360-Gerät in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommen; interner Standard TMS (= 0 ppm). Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der bis jetzt bekannten Cyclosporine sind in Tab. 18 angegeben.

5. **Chemische Verknüpfungsreaktionen über N-Permethylierungsprodukte.** – 5.1. *Verknüpfung der Cyclosporine N und Y mit Cyclosporin G. O-Acetylcyclosporin G*. Die Lsg. von 2,43 g (2 mmol) Cyclosporin G und 366 mg (3 mmol) 4-(Dimethylamino)pyridin in 24 ml  $\text{Ac}_2\text{O}$ /Pyridin 1:1 wurde 2 h bei RT. gerührt. Der Eindampfrückstand wurde in  $\text{CHCl}_3$  aufgenommen, die Lsg. mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und wiederum eingedampft. Chromatographie des Rohproduktes an 300 g Kieselgel mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  98:2 und Kristallisation der DC-einheitlichen Fraktionen aus  $\text{Et}_2\text{O}$  ergaben 2,04 g (81%) *O*-Acetylcyclosporin G als farblose Polyeder, Schmp. 243–244°,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -305^\circ$  ( $c = 0,76$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -245^\circ$  ( $c = 0,78$ , MeOH). IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 1735 und 1235 (Ester).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2,0 (*s*,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ). FAB-MS: 1258 ( $\text{MH}^+$ ). Anal. ber. für  $\text{C}_{65}\text{H}_{115}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$  (1258,710): C 62,0, H 9,2, N 12,2, O 16,5; gef.: C 61,9, H 9,2, N 12,0, O 16,7.

*Tetra-N-methyl-O-acetylcyclosporin G*. Die Lsg. von 1,26 g (1 mmol) *O*-Acetylcyclosporin G in 10 ml trockenem DMF wurde mit 3,55 g (25 mmol) frisch dest. Mel und 3,48 g (15 mmol)  $\text{Ag}_2\text{O}$  versetzt und 23 h im Dunkeln bei RT. gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde über Hyflo abfiltriert, mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  nachgewaschen und das Filtrat eingedampft. Chromatographie des Rückstandes an 200 g Kieselgel mit  $\text{H}_2\text{O}$ -ges. AcOEt ergab 914 mg (74%) *Tetra-N-methyl-O-acetylcyclosporin G* als amorphes weisses Pulver, Schmp. 158–160°,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -271^\circ$  ( $c = 0,98$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -238^\circ$  ( $c = 0,78$ , MeOH). IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 1735 und 1235 (Ester), 1630–1660 (tert. Amid); keine Banden bei 3320 (sek. Amid,  $\bar{\nu}$  (NH)) und 1510–1520 (sek. Amid,  $\delta$  (NH)).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2,1 (*s*,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 2,65–3,2 (*m*, 11  $\text{CONCH}_3$ ); Signale bei 7,4–8,6 (Amid-Protonen) fehlen. FD-MS: 1314 ( $\text{MH}^+$ ), 1255 ( $\text{MH}^+ - \text{CH}_3\text{COO}$ ). Anal. ber. für  $\text{C}_{69}\text{H}_{123}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$  (1314,820): C 63,0, H 9,4, N 11,7, O 15,8; gef.: C 62,8, H 9,4, N 11,6, O 16,2.

*O-Acetylcyclosporin N*. Aus 1,32 g Cyclosporin N wurden wie bei *O*-Acetylcyclosporin G beschrieben 1,18 g (86%) *O*-Acetylcyclosporin N erhalten, Schmp. 131–134°,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -204^\circ$  ( $c = 0,80$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -165^\circ$  ( $c = 0,56$ , MeOH). IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 1745 und 1225 (Ester).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2,0 (*s*,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ). FAB-MS: 1244 ( $\text{MH}^+$ ). Anal. ber. für  $\text{C}_{64}\text{H}_{113}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$  (1244,680): C 61,8, H 9,2, N 12,4, O 16,7; gef.: C 61,4, H 9,3, N 12,1, O 17,4.

*Penta-N-methyl-O-acetylcyclosporin N*. Permethylierung von 1,12 g *O*-Acetylcyclosporin N und Auftrennung des Rohproduktes an 200 g Kieselgel mit  $\text{H}_2\text{O}$ -ges. AcOEt ergaben 246 mg (21%) Spitzenfraktionen, die nach weiterer chromatographischer Reinigung 90 mg DC-einheitliches Permethylierungsprodukt lieferten, Schmp. 160–162°,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -252^\circ$  ( $c = 0,53$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -225^\circ$  ( $c = 0,53$ , MeOH). IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 1735, 1235 (Ester); 1630–1660 (tert. Amid).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2,1 (*s*,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 2,65–3,2 (*m*, 11  $\text{CONCH}_3$ ). FD-MS: 1314 ( $\text{MH}^+$ ), 1254 ( $\text{MH}^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$ ). Anal. ber. für  $\text{C}_{69}\text{H}_{123}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$  (1314,820): C 63,0, H 9,4, N 11,7, O 15,8; gef.: C 62,9, H 9,4, N 11,4, O 16,3.

Als Hauptprodukt bei der obigen Reaktion entstand das unvollständig methylierte Derivat 2,7,8-Tri-*N*-methyl-*O*-acetylcyclosporin N (561 mg, 48%), bei dem aufgrund der Aminosäure-Analyse Val-5 und Leu-10 nicht methyliert wurden. Aus  $\text{Et}_2\text{O}$  farblose Polyeder, Schmp. 174–175°,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -298^\circ$  ( $c = 0,85$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -281^\circ$  ( $c = 1,25$ , MeOH). IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 1735 und 1235 (Ester), 3370 (sek. Amid,  $\bar{\nu}$  (NH)), 1510 (sek. Amid,  $\delta$  (NH)).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2,05 (*s*,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 2,7–3,1 (9*s*, 9  $\text{CONCH}_3$ ); 6,9 (*d*, NH); 7,2 (*d*, NH). FD-MS: 1286 ( $\text{MH}^+$ ), 1227 ( $\text{MH}^+ - \text{CH}_3\text{COO}$ ). Anal. ber. für  $\text{C}_{67}\text{H}_{119}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$  (1286,760): C 62,5, H 9,3, N 12,0, O 16,2; gef.: C 62,6, H 9,2, N 11,8, O 16,7.

*O-Acetylcyclosporin Y*. Aus 240 mg Cyclosporin Y wurden 195 mg (79%) *O*-Acetylcyclosporin Y erhalten; aus  $\text{Et}_2\text{O}$  farblose Polyeder, Schmp. 180–182°,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -272^\circ$  ( $c = 0,71$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -244^\circ$  ( $c = 0,69$ , MeOH). IR (KBr): 1740 und 1230 (Ester).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2,0 (*s*,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ). FD-MS: 1244 ( $\text{MH}^+$ ).

*Penta-N-methyl-O-acetylcyclosporin Y*. Aus 125 mg *O*-Acetylcyclosporin Y wurden 100 mg (76%) Permethylierungsprodukt erhalten; Schmp. 151–154°,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -255^\circ$  ( $c = 0,76$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -228^\circ$  ( $c = 0,66$ , MeOH). IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 1735, 1235 (Ester); 1630–1660 (tert. Amid).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 2,1 (*s*,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 2,65–3,2 (*m*, 11

CONCH<sub>3</sub>). FD-MS: 1314 (*MH*<sup>+</sup>), 1255 (*MH*<sup>+</sup> – CH<sub>3</sub>COO). Anal. ber. für C<sub>69</sub>H<sub>113</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub> (1314,820): C 63,0, H 9,4, N 11,7, O 15,8; gef.: C 62,7, H 9,6, N 11,4, O 16,2.

Die Permethylierungsprodukte aus den Cyclosporinen G, N und Y erwiesen sich aufgrund der anal. und spektralen Daten (DC, HPLC, IR, <sup>1</sup>H-NMR, MS) als identisch.

5.2. *Verknüpfung der Cyclosporine T und U mit Cyclosporin A. O-Acetylcyclosporin T.* Aus 1,19 g Cyclosporin T wurden 884 mg (72%) *O*-Acetylcyclosporin T erhalten, Schmp. 155–157°,  $[\alpha]_D^{20} = -216^\circ$  (*c* = 0,69, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = -175^\circ$  (*c* = 0,97, MeOH). IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1745 und 1225 (Ester). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,0 (*s*, CH<sub>3</sub>COO). FAB-MS: 1230 (*MH*<sup>+</sup>). Anal. ber. für C<sub>63</sub>H<sub>111</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub> (1230,650): C 61,5, H 9,1, N 12,5, O 16,9; gef.: C 61,3, H 9,2, N 12,5, O 17,4.

*Penta-N-methyl-O-acetylcyclosporin T.* Aus 614 mg *O*-Acetylcyclosporin T wurden nach wiederholter chromatographischer Reinigung 133 mg (21%) DC-einheitliches Permethylierungsprodukt erhalten; Schmp. 161–163°,  $[\alpha]_D^{20} = -269,5^\circ$  (*c* = 0,58, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = -241^\circ$  (*c* = 0,58, MeOH). IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1735 und 1235 (Ester), 1630–1660 (tert. Amid). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,05 (*s*, CH<sub>3</sub>COO); 2,6–3,3 (*m*, 11 CONCH<sub>3</sub>). FD-MS: 1300 (*MH*<sup>+</sup>). Anal. ber. für C<sub>68</sub>H<sub>121</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub> (1300,790): C 62,8, H 9,4, N 11,8, O 16,0; gef.: C 62,6, H 9,5, N 11,6, O 16,4.

Als weiteres Produkt wurden 286 mg (45%) *2,7,8-Tri-N-methyl-O-acetylcyclosporin T* isoliert (Val-5 und Leu-10 nicht-methyliert); Schmp. 158–160°,  $[\alpha]_D^{20} = -298^\circ$  (*c* = 0,80, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = -290^\circ$  (*c* = 0,58, MeOH). IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1735 und 1235 (Ester), 3370 (sek. Amid,  $\bar{\nu}$ (NH)), 1505 (sek. Amid,  $\delta$ (NH)). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,03 (*s*, CH<sub>3</sub>COO); 2,8–3,1 (9*s*, 9 CONCH<sub>3</sub>); 6,85 (*d*, NH); 7,2 (*d*, NH). FD-MS: 1272 (*MH*<sup>+</sup>), 1212 (*MH*<sup>+</sup> – CH<sub>3</sub>COOH). Anal. ber. für C<sub>66</sub>H<sub>117</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub> (1272,726): C 62,3, H 9,2, N 12,1, O 16,4; gef.: C 62,0, H 9,3, N 12,1, O 16,7.

*O-Acetylcyclosporin U.* Aus 1,19 g Cyclosporin U wurden 1,16 g (94%) *O*-Acetylcyclosporin U erhalten; aus Et<sub>2</sub>O farblose Polyeder, Schmp. 181–183°,  $[\alpha]_D^{20} = -279^\circ$  (*c* = 1,02, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = -249^\circ$  (*c* = 0,84, MeOH). IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1735 und 1230 (Ester). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,0 (*s*, CH<sub>3</sub>COO). FD-MS: 1230 (*MH*<sup>+</sup>). Anal. ber. für C<sub>63</sub>H<sub>111</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub> (1230,650): C 61,5, H 9,1, N 12,5, O 16,9; gef.: C 61,2, H 9,1, N 12,4, O 17,3.

*Penta-N-methyl-O-acetylcyclosporin U.* Aus 861 mg *O*-Acetylcyclosporin U wurden 507 mg (56%) Permethylierungsprodukt erhalten; Schmp. 161–163°,  $[\alpha]_D^{20} = -270^\circ$  (*c* = 0,90, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = -236^\circ$  (*c* = 0,80, MeOH). IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1735, 1235 (Ester); 1630–1660 (tert. Amid). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,05 (*s*, CH<sub>3</sub>COO); 2,6–3,3 (*m*, 11 CONCH<sub>3</sub>). FD-MS: 1300 (*MH*<sup>+</sup>), 1240 (*MH*<sup>+</sup> – CH<sub>3</sub>COOH). Anal. ber. für C<sub>68</sub>H<sub>121</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub> (1300,790): C 62,8, H 9,4, N 11,8, O 16,0; gef.: C 62,9, H 9,7, N 11,7, O 16,1.

Die Permethylierungsprodukte aus den Cyclosporinen A [11], T und U erwiesen sich aufgrund der anal. und spektralen Daten (DC, HPLC, IR, <sup>1</sup>H-NMR, MS) als identisch.

5.3. *Verknüpfung von Cyclosporin P mit Cyclosporin C. Tetra-N-methyl-di-O-acetylcyclosporin C.* Aus 1,43 g Di-*O*-acetylcyclosporin C [9] wurden 664 mg (44%) Permethylierungsprodukt erhalten; Schmp. 168–170°,  $[\alpha]_D^{20} = -274^\circ$  (*c* = 1,14, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = -258^\circ$  (*c* = 0,69, MeOH). IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1735 und 1235 (Ester), 1630–1660 (tert. Amid). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,07 (*s*, CH<sub>3</sub>COO); 2,25 (*s*, CH<sub>3</sub>COO); 2,65–3,2 (11*s*, 11 CONCH<sub>3</sub>). FD-MS: 1358 (*MH*<sup>+</sup>). Anal. ber. für C<sub>70</sub>H<sub>123</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub> (1358,830): C 61,9, H 9,1, N 11,3, O 17,7; gef.: C 61,6, H 9,0, N 11,1, O 17,9.

Als Nebenprodukt wurden 188 mg (13%) *2,5,8-Tri-N-methyl-di-O-acetylcyclosporin C* (Ala-7 nicht-methyliert) isoliert; Schmp. 135–137°,  $[\alpha]_D^{20} = -275^\circ$  (*c* = 0,79, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = -256^\circ$  (*c* = 0,61, MeOH). IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1735 und 1235 (Ester), 1510 (sek. Amid,  $\delta$ (NH)). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,07 (*s*, CH<sub>3</sub>COO); 2,15 (*s*, CH<sub>3</sub>COO); 2,65–3,3 (*m*, 10 CONCH<sub>3</sub>); 6,6 (*d*, NH). FD-MS: 1344 (*MH*<sup>+</sup>). Anal. ber. für C<sub>69</sub>H<sub>121</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub> (1344,789): C 61,7, H 9,0, N 11,5, O 17,8; gef.: C 61,6, H 9,4, N 11,3, O 18,2.

*Di-O-acetylcyclosporin P.* Aus 1,33 g Cyclosporin P wurden 863 mg (61%) Di-*O*-acetylcyclosporin P erhalten; Schmp. 159–162°,  $[\alpha]_D^{20} = -273^\circ$  (*c* = 0,81, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = -220^\circ$  (*c* = 0,89, MeOH). IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1740 und 1240 (Ester). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,9 (*s*, CH<sub>3</sub>COO); 2,1 (*s*, CH<sub>3</sub>COO). FD-MS: 1288 (*MH*<sup>+</sup>). Anal. ber. für C<sub>65</sub>H<sub>113</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub> (1288,690): C 60,6, H 8,8, N 12,0, O 18,6; gef.: C 60,6, H 8,8, N 11,7, O 18,6.

*Penta-N-methyl-di-O-acetylcyclosporin P.* Aus 1,03 g Di-*O*-acetylcyclosporin P wurden nach wiederholter chromatographischer Reinigung 182 mg (17%) Permethylierungsprodukt erhalten; Schmp. 166–168°,  $[\alpha]_D^{20} = -273^\circ$  (*c* = 0,81, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = -258^\circ$  (*c* = 0,74, MeOH). IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1735, 1235 (Ester); 1630–1660 (tert. Amid). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2,07 (*s*, CH<sub>3</sub>COO); 2,25 (*s*, CH<sub>3</sub>COO); 2,65–3,2 (11*s*, 11 CONCH<sub>3</sub>). FD-MS: 1358 (*MH*<sup>+</sup>). Anal. ber. für C<sub>70</sub>H<sub>123</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub> (1358,830): C 61,9, H 9,1, N 11,3, O 17,7; gef.: C 61,9, H 9,2, N 11,3, O 17,8.

Als weiteres Produkt wurden 210 mg (20%) *Tetra-N-methyl-di-O-acetylcyclosporin P* isoliert (Ala-7 nicht-methyliert); Schmp. 154–156°,  $[\alpha]_D^{20} = -289^\circ$  (*c* = 0,73, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = -267^\circ$  (*c* = 0,83, MeOH).

Die Permethylierungsprodukte aus den Cyclosporinen C und P erwiesen sich aufgrund der anal. und spektralen Daten (DC, HPLC, IR, <sup>1</sup>H-NMR, MS) als identisch.



C(5'4)	23.49	23.40	23.39	23.34	23.71	23.40	23.4	23.78	23.59	23.41	23.41	23.50	23.36	-	23.39	23.64	23.44	22.98	23.47	23.39	23.51	
C(5'4)	21.18	21.16	21.36	21.13	21.06	21.26	21.14	22.8	20.72	21.17	20.97	22.86	21.22	21.37	-	22.84	21.03	21.02	21.17	21.20	21.00	21.26
CH <sub>3</sub> -N(2.4)	31.32	31.10	31.17	31.30	31.46	31.13	31.25	28.8	31.20	31.04	31.21	28.86	31.19	30.88	-	28.85	31.39	31.34	31.36	31.23	31.37	31.20
C(2.5)	55.39	55.11	54.66	55.50	55.42	54.82	55.38	54.9	54.95	54.99	50.09	54.58	54.99	54.49	55.38	54.61	59.47	55.65	55.15	55.10	59.56	54.79
C(3.5)	31.17	31.16	31.83	31.04	31.12	31.48	31.06	31.3	31.36	31.24	32.53	31.31	31.31	32.08	31.11	31.34	30.76	30.93	31.71	31.13	30.71	31.43
C(4.5)	19.81	19.40	19.16	19.90	19.75	19.58	19.78	19.5	19.76	19.65	19.64	19.41	19.71	19.10	19.64	19.40	19.88	19.98	19.53	19.61	19.90	19.52
C(4'5)	18.48	18.65	18.66	18.34	18.59	18.27	18.35	18.5	18.20	18.32	-	18.46	18.23	18.58	18.31	18.41	18.60	18.57	18.98	18.54	18.55	18.46
C(5.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C(2.6)	55.31	55.16	54.66	55.21	57.76	54.21	55.24	54.2	54.14	54.27	55.46	53.62	55.18	54.13	54.98	53.58	53.72	55.53	56.69	54.76	53.14	53.98
C(3.6)	37.41	37.22	37.40	37.43	38.25	37.20	37.36	35.8	37.25	37.44	38.05	35.61	37.45	37.59	37.06	35.63	40.72	37.95	38.20	36.98	40.75	37.44
C(4.6)	25.40	25.36	25.08	25.36	25.25	25.50	25.36	24.8	24.84	24.51	25.98	24.75	24.45	24.45	25.11	24.73	25.51	25.63	25.26	24.94	25.51	24.66
C(5.6)	23.85	23.62	23.74	23.80	23.41	23.92	23.79	23.1	23.95	23.84	23.81	22.98	23.85	23.88	23.67	22.96	23.10	23.79	23.39	23.68	23.62	23.85
C(5'6)	21.93	22.06	21.75	21.84	22.53	20.92	21.95	23.1	21.81	21.81	21.93	22.86	22.17	21.80	21.84	22.84	22.52	22.04	22.66	21.92	22.53	21.43
CH <sub>3</sub> -N(2.6)	31.53	31.37	31.36	31.47	31.85	31.13	31.45	30.5	31.13	31.14	31.06	30.41	31.19	31.22	31.46	30.45	-	31.69	31.92	31.31	-	31.20
C(2.7)	48.69	48.79	48.91	48.56	48.81	48.31	48.64	46.6	48.20	48.08	48.24	46.45	48.28	48.22	48.67	46.46	48.30	54.98	48.96	48.34	48.28	48.33
C(3.7)	16.07	16.25	16.16	15.95	16.16	15.21	15.91	14.9	15.18	15.27	15.87	14.76	15.07	15.39	15.87	14.78	16.21	23.12	18.47	15.59	16.13	15.07
C(4.7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.82	-	-	-	-
C(2.8)	45.20	45.22	45.27	45.12	46.86	44.69	45.12	45.6	44.61	44.85	45.22	45.51	44.64	44.91	45.01	45.51	45.24	45.23	46.87	48.51	45.20	44.68
C(3.8)	18.19	18.14	18.07	18.15	18.47	17.78	18.12	16.0	17.77	17.98	18.45	16.02	17.72	17.85	17.97	15.99	18.46	18.32	18.21	18.90	18.47	17.77
C(2.9)	48.30	48.32	48.25	48.24	49.38	47.86	48.30	55.2	47.81	47.99	48.40	55.13	47.85	48.01	48.24	55.13	48.38	48.26	49.37	45.86	48.36	47.99
C(3.9)	39.04	39.0	39.20	39.06	38.90	39.24	39.05	36.0	39.24	39.15	38.80	35.69	39.26	39.23	39.05	35.97	38.85	38.87	38.89	42.94	38.83	39.23
C(4.9)	24.70	24.71	24.72	24.65	24.66	24.71	24.65	25.2	24.38	24.68	24.57	25.10	24.72	24.72	24.69	25.09	24.71	24.62	24.65	24.65	24.59	24.71
C(5.9)	23.87	23.81	23.83	23.95	24.11	23.78	23.92	22.5	24.07	23.84	23.81	22.57	23.85	23.82	23.77	22.58	23.82	24.07	24.13	23.87	23.82	23.33
C(5'9)	21.86	21.76	21.75	21.84	21.28	21.81	21.83	21.3	21.24	21.48	21.84	21.20	21.87	21.80	21.84	21.20	21.86	21.80	21.26	22.04	21.86	21.92
CH <sub>3</sub> -N(2.9)	29.65	29.71	29.71	29.56	29.83	29.64	29.57	30.7	29.61	29.62	29.49	30.68	29.66	29.66	29.69	30.68	29.49	29.54	30.05	-	29.47	29.66
C(2.10)	57.54	57.32	57.34	57.51	57.00	57.16	57.51	47.7	57.19	57.46	57.66	47.56	57.12	57.44	57.40	47.56	57.67	57.59	57.80	57.21	57.66	57.23
C(3.10)	40.73	40.76	40.78	40.71	38.93	40.49	40.75	41.6	40.41	40.60	40.82	41.36	40.62	40.64	40.76	41.28	40.82	40.87	38.89	40.35	40.82	40.72
C(4.10)	24.55	24.65	24.63	24.52	24.61	24.31	24.57	25.1	24.14	24.29	24.57	24.98	24.33	24.31	24.54	24.97	24.60	24.59	24.65	24.57	24.71	24.49
C(5.10)	23.74	23.62	23.70	23.69	23.35	23.78	23.65	23.6	23.82	23.84	23.66	23.66	23.79	23.53	23.67	23.65	23.64	23.67	23.39	23.56	23.65	23.76
C(5'10)	23.36	22.99	23.21	23.36	22.84	23.44	23.25	21.6	23.48	23.44	23.18	21.57	23.67	23.22	23.21	21.55	23.41	23.24	22.85	23.07	23.51	-
CH <sub>3</sub> -N(2.10)	29.83	29.79	29.85	29.74	29.07	29.90	29.74	-	29.88	30.13	29.66	-	29.86	29.73	29.82	-	29.76	29.74	29.07	30.02	29.72	29.90
C(2.11)	57.93	57.90	58.07	57.79	52.46	58.31	57.86	57.3	58.35	62.60	57.74	57.04	58.35	62.58	58.19	56.96	57.90	57.75	52.70	57.70	57.89	58.19
C(3.11)	29.05	28.75	28.90	29.13	32.74	29.76	28.95	27.1	29.99	28.74	29.03	27.01	29.73	28.75	28.84	27.04	29.17	29.05	32.52	28.95	29.15	29.52
C(4.11)	20.26	20.04	20.07	20.28	18.98	20.36	20.17	18.6	20.48	20.16	20.47	18.57	20.36	20.08	20.04	18.55	20.53	20.31	19.16	19.90	20.51	20.22
C(4'11)	18.75	18.74	18.84	18.61	17.37	18.45	18.57	18.1	18.44	19.17	18.62	18.04	18.44	19.10	18.72	18.03	19.22	18.71	17.40	18.54	19.13	18.37
CH <sub>3</sub> -N(2.11)	29.81	29.76	29.85	29.74	-	29.85	29.74	29.9	29.70	29.76	29.66	29.86	29.96	30.18	29.82	29.85	29.70	29.61	-	29.75	29.72	29.82

**6.  $O^{3,2}$ -(Chloracetyl)cyclosporin S.** – Die Lsg. von 1,19 g (1 mmol) Cyclosporin S in 10 ml abs. Pyridin wurde bei 0° mit 0,56 g (5 mmol) Chloracetyl-chlorid versetzt und 2 h bei RT. gerührt. Dann wurde mit  $H_2O$  verdünnt, mit  $CH_2Cl_2$  extrahiert und das Rohprodukt an 200 g Kieselgel mit  $CHCl_3/MeOH$  96,5:3,5 chromatographiert: 0,78 g (62%)  $O^{3,2}$ -(Chloracetyl)cyclosporin S als hellgelbes Pulver, Schmp. 160° (Zers.),  $[\alpha]_D^{20} = -203^\circ$  ( $c = 0,78$ ,  $CHCl_3$ ),  $[\alpha]_D^{20} = -152^\circ$  ( $c = 0,65$ , MeOH). IR ( $CH_2Cl_2$ ): 1760 (Ester).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): 3,9 (s,  $ClCH_2COO$ ). FD-MS: 1268/1266 ( $MH^+$ ). Anal. ber. für  $C_{62}H_{108}ClN_{11}O_{14}$  (1267,070): C 58,8, H 6,8, Cl 2,8, N 12,2, O 17,7; gef.: C 58,3, H 8,6, Cl 3,5, N 12,0, O 17,5.

**7. Biologische Aktivitäten.** – Die Prüfungen auf immunsuppressive Wirkung der Cyclosporine verdanken wir den Herren Dr. J. F. Borel und P. Hiestand (vgl. [3] [4]). Die antifungale Aktivität wurde mittels Agardiffusionstest gegen *Neurospora crassa* und *Aspergillus niger* bestimmt (Dr. M. Dreyfuss).

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. von Wartburg, R. Traber, in 'Ciclosporin', 'Progress in Allergy', Vol. 38, Ed. J. F. Borel, S. Karger Ltd., Basel, 1986; A. Rügger, M. Kuhn, H. Lichti, H. R. Loosli, R. Huguenin, Ch. Quiquerez, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1075.
- [2] M. Dreyfuss, E. Härrli, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pache, H. Tschertler, *Eur. J. Appl. Microbiol.* **1976**, *3*, 125.
- [3] J. F. Borel, C. Feurer, H. U. Gubler, H. Stähelin, *Agents Actions* **1976**, *6*, 468.
- [4] J. F. Borel, C. Feurer, C. Magnée, H. Stähelin, *Immunology* **1977**, *32*, 1017.
- [5] R. Y. Calne, D. J. G. White, K. Rolles, D. P. Smith, B. M. Herbertson, *Lancet* **1978**, *i*, 1183; R. Y. Calne, D. J. G. White, S. Thiru, D. B. Evans, P. McMaster, D. C. Dunn, G. N. Graddock, D. B. Pentlow, K. Rolles, *ibid.* **1978**, *ii*, 1323; R. L. Powles, A. J. Barrett, H. Clink, H. E. M. Kay, J. Sloane, T. J. McElwain, *ibid.* **1978**, *ii*, 1327.
- [6] T. J. Petcher, H. P. Weber, A. Rügger, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1480.
- [7] H. Kessler, H. R. Loosli, H. Oschkinat, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 661.
- [8] H. R. Loosli, H. Kessler, H. Oschkinat, H. P. Weber, T. J. Petcher, A. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 682.
- [9] R. Traber, M. Kuhn, A. Rügger, H. Lichti, H. R. Loosli, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 1247.
- [10] R. Traber, M. Kuhn, H. R. Loosli, W. Pache, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 1568.
- [11] R. Traber, H. R. Loosli, H. Hofmann, M. Kuhn, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 1655.
- [12] M. Dreyfuss, *Sydowia. Annales Mycologici* **1986**, im Druck.
- [13] R. Zocher, N. Madry, H. Peeters, H. Kleinkauf, *Phytochemistry* **1984**, *23*, 549.
- [14] H. Kobel, R. Traber, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1982**, *14*, 237.
- [15] H. Kobel, H. R. Loosli, R. Voges, *Experientia* **1983**, *39*, 873.
- [16] J. J. Sanglier, R. Traber, 15th IUPAC Internat. Symposium on the Chemistry of Natural Products, Den Haag/NL, 17.-22. August 1986, Posterpräsentation, Abstract Nr. PC 29; Publikation in Vorbereitung.
- [17] P. Bollinger, H. J. Bölsterli, H. Kobel, für *Sandoz Ltd.*, U.S. Patent 4.384.996, 1983.
- [18] 'Ciclosporin', 'Progress in Allergy', Vol. 38, Ed. J. F. Borel, S. Karger Ltd., Basel, 1986.
- [19] H. Frank, G. J. Nicholson, E. Bayer, *J. Chromatogr.* **1978**, *167*, 187.
- [20] G. W. Clough, *J. Chem. Soc.* **1918**, *113*, 526; O. Lutz, B. Jirgensons, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1930**, *63*, 448; **1931**, *64*, 1221.
- [21] T. J. Petcher, H. P. Weber (*Sandoz AG*); unveröffentlichte Befunde.
- [22] S. Moore, H. W. Stein, *J. Biol. Chem.* **1951**, *192*, 663.
- [23] Pl. A. Plattner, U. Nager, *Helv. Chim. Acta* **1948**, *31*, 2192.