

Synthese von Cyclosporin und Analoga: Zusammenhang zwischen Struktur und immunsuppressiver Aktivität**

Von Roland Maurice Wenger*

Cyclosporin ist ein neues immunsuppressives Medikament, das 1983 unter dem Namen Sandimmun® auf den Markt kam. Diese Verbindung, die neue Aspekte in der selektiven Immunmodulation eröffnet, wurde aus einer Pilzkultur isoliert und als cyclisches Undecapeptid charakterisiert, das neben einer neuen Aminosäure mehrere *N*-methylierte Aminosäuren enthält. Die neue Aminosäure (4*R*)-4-[(*E*)-2-Butenyl]-4,*N*-dimethyl-L-threonin (MeBmt) ließ sich nicht isolieren. Weil es möglich schien, daß diese Aminosäure für die pharmakologische Wirkung von Cyclosporin entscheidend ist, wurde sie enantiomerenrein synthetisiert. Der nächste Schritt war die Totalsynthese von Cyclosporin, die nicht nur als solche interessierte, sondern auch den Aufbau von Cyclosporin-Analoga ermöglichte; damit wurde der Weg zur Untersuchung der Beziehungen zwischen Struktur und immunsuppressiver Wirkung geebnet. Wesentlich für die Immunsuppression sind die Aminosäuren MeBmt, α -Aminobuttersäure (Abu), Sarcosin (Sar) und *N*-Methylvalin (MeVal) in den Positionen 1, 2, 3 und 11, vielleicht aber auch noch größere Teile des Moleküls. Diese Information könnte genutzt werden, um neue chemische Leitstrukturen zu erkennen oder Pharmaka mit neuem Aktivitätsprofil zu finden.

1. Einleitung

1.1. Pharmakologische Aktivität und klinische Verwendung von Cyclosporin

Cyclosporin ist, wie Borel et al. berichten^[2-6], ein selektiv immunsuppressives Medikament mit fungiziden und entzündungshemmenden Eigenschaften. Bei Mäusen hemmt es die Produktion von hämagglutinierenden Antikörpern gegen Schaf-Erythrocyten in starkem Ausmaß; es hemmt sowohl die humorale als auch die zellvermittelte Immunantwort. Die Wirkung von Cyclosporin ist reversibel und für T-Lymphocyten spezifisch; die blutbildenden Gewebe der behandelten Tiere werden nicht beeinflusst. In neuerer Zeit wiesen Bueding et al.^[7] eine antischistosomale Wirkung und Thommen-Scott^[8] einen Antimalaria-Effekt von Cyclosporin nach; diese beiden Wirkungen sind unabhängig von der Immunsuppression.

Über die ersten Transplantationen an Menschen unter Verwendung von Cyclosporin wurde 1978 von Calne et al.^[9] (Nieren) und Powles et al.^[10] (Knochenmark) berichtet. Heute wird Cyclosporin mit Erfolg eingesetzt, um Transplantat-Abstoßungen nach Knochenmark- und Organtransplantationen zu verhindern. Seine Verwendung bei Autoimmun- und anderen Krankheiten wird gegenwärtig untersucht.

1.2. Gewinnung von Cyclosporin

Cyclosporin^{***}, ursprünglich von Rüeegg et al.^[13] als „Cyclosporin A“ bezeichnet, wird von Pilzen der Art *Tolypocladium* in Submersionskulturen, wie Dreyfuss et al.^[14]**** beschreiben, erzeugt. In normalen Kulturmedien

ist es die Hauptkomponente einer Gruppe von Cyclopeptiden aus jeweils elf Aminosäuren. Diese natürlich vorkommenden Cyclosporin-Analoga, zum Teil von Traber et al.^[17-19] besprochen, unterscheiden sich im allgemeinen in ihrer chemischen Struktur nur durch Variationen an einer Aminosäure. Die Biosynthese der Analoga kann durch externe Versorgung mit entsprechenden Vorläufern gesteuert werden. Nach Kobel et al.^[20] ist es beispielsweise möglich, durch Zugabe von L-Norvalin zum Kulturmedium die selektive Produktion von (Norvalin²)cyclosporin zu steigern. Durch Zugabe von D,L- α -Aminobuttersäure wird die Bildung von unerwünschten Cyclosporin-Analoga fast vollständig unterdrückt und der Anteil an Cyclosporin im Rohprodukt erhöht.

1.3. Strukturaufklärung von Cyclosporin

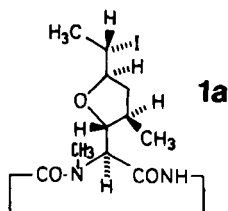
Die Struktur von Cyclosporin 1 (Abb. 1) bestimmten Petcher et al.^[21] durch chemischen Abbau^[13] in Kombination mit der Röntgen-Strukturanalyse des Iodderivats 1a. Durch diese Analyse wurde nicht nur die Sequenz des natürlichen Peptids erkannt, sondern auch ein Eindruck von seiner Gestalt gewonnen. In der Zwischenzeit gelang es Loosli et al.^[22], durch Röntgen-Strukturanalyse sowie durch zweidimensionale NMR-spektroskopische Studien auch die Struktur von unverändertem Cyclosporin zu er-

[*] Dr. R. M. Wenger
Präklinische Forschung, Pharmazeutisches Departement
Sandoz AG, CH-4002 Basel (Schweiz)

[**] Teilweise auf dem International Symposium on Cyclosporine in Houston, TX (USA), 16.-20. Mai 1983, vorgetragen; siehe [1].

[***] Aus praktischen Gründen wurde vorgeschlagen, als „Cyclosporin“ das früher als „Cyclosporin A“ bezeichnete cyclische Undecapeptid zu definieren [11, 12]. Nachdem „cyclosporine“ als USAN-Name, „cyclosporin“ als INN-Name (WHO), „cyclosporin“ als BAN-Name und „cyclosporine“ als französischer Name für die *therapeutische Verbindung* akzeptiert worden sind, wird der Name „Cyclosporin“ hier als *wissenschaftlicher Name* für die Stammverbindung verwendet.

[****] Der Cyclosporin-erzeugende Organismus – zunächst als *Trichoderma polysporum* [14] identifiziert, dann der von Gams [15] beschriebenen Art *Tolypocladium* zugeordnet – wird jetzt *Tolypocladium inflatum* Gams [16] genannt.



mitteln. Cyclosporin ist ein neutrales, hydrophobes Cyclopeptid aus elf Aminosäuren, die mit Ausnahme von D-Alanin in Position 8 und dem nicht chiralen Sarcosin (*N*-Methylglycin) in Position 3 alle die *L*-Konfiguration der natürlichen Aminosäuren haben. Sieben Aminosäuren – in den Positionen 1, 3, 4, 6, 9, 10 und 11 – liegen als *N*-Methylderivate vor. Zehn der elf Ringglieder sind Derivate bekannter aliphatischer Aminosäuren: α -Aminobuttersäure (Abu) in Position 2, Sarcosin (Sar) in Position 3, *N*-Methylleucin (MeLeu) in den Positionen 4, 6, 9 und 10,

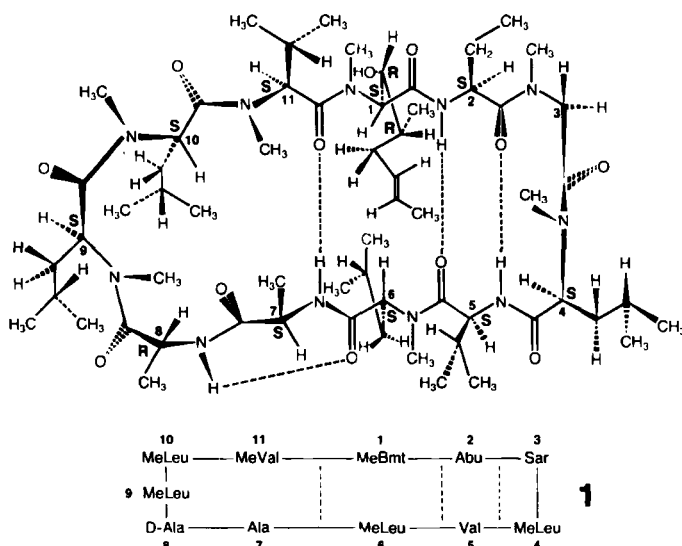
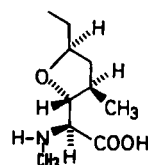
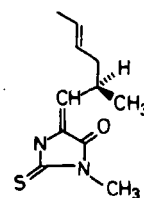


Abb. 1. Struktur von Cyclosporin 1 (schematisch). MeBmt = (4*R*)-4-[(*E*)-2-Butenyl]-4,*N*-dimethyl-*L*-threonin (siehe Text).

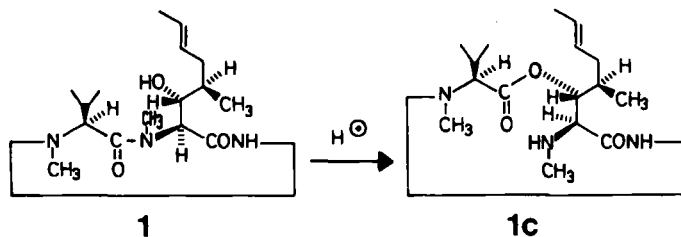
Valin (Val) in Position 5, Alanin (Ala) in Position 7, D-Alanin (D-Ala) in Position 8 und *N*-Methylvalin (MeVal) in Position 11. Diese Aminosäuren ließen sich nach der sauren Hydrolyse von Cyclosporin leicht charakterisieren. Eine Aminosäure war bisher unbekannt, und zwar die Aminosäure in Position 1, über die unter dem Namen „C-9-Aminosäure“^[13] berichtet wurde. Es handelt sich um (2*S*,3*R*,4*R*,6*E*)-3-Hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-6-octensäure, in Anlehnung an die Aminosäurenomenklatur (4*R*)-4-[(*E*)-2-Butenyl]-4,*N*-dimethyl-*L*-threonin oder abgekürzt MeBmt genannt. Diese Aminosäure hat die polaren Eigenschaften eines *N*-Methyl-*L*-threonins, das am Kettenende durch eine Methyl- und eine Butenylgruppe substituiert ist. Freies MeBmt war bisher nicht bekannt; beim Abbau von Cyclosporin^[13] konnten nur Artefakte oder MeBmt-Derivate isoliert werden. Ionenaustauschchromatographie des Hydrolysats von Cyclosporin ergab von MeBmt nur das cyclische Derivat 1b. Mit wasserfreier Säure lagert sich Cyclosporin 1 unter *N,O*-Acylwanderung der Methylvalylgruppe zu Isocyclosporin 1c um. Durch



1b



1d



Edman-Abbau von Isocyclosporin 1c mit Methylisothiocyanat konnte 1d als einziges isolierbares MeBmt-Derivat erhalten werden. Damit war MeBmt als erste Aminosäure in der Peptidsequenz festgelegt. Die komplette Sequenz wurde durch wiederholten Edman-Abbau bestimmt.

Aus Röntgen-Strukturanalyse und NMR-Daten geht hervor, daß sowohl kristallines als auch gelöstes Cyclosporin in einer ziemlich starren Konformation vorliegt (Abb. 2). Ein großer Teil des Gerüsts (Rest 1–6) nimmt eine β -

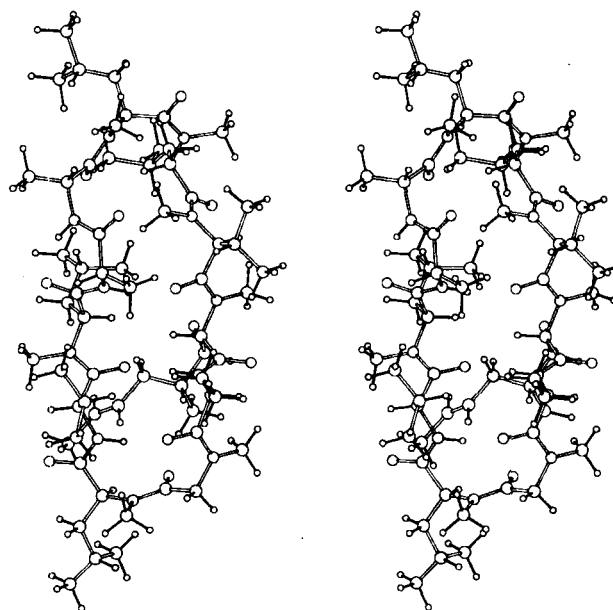


Abb. 2. Konformation von Cyclosporin 1 im Kristall (Stereobild).

Faltblattkonformation mit antiparallelen Ketten ein, die drei transannuläre Wasserstoffbrücken enthält und deutlich verdreht ist. Bei Sarcosin in Position 3 und *N*-Methylleucin in Position 4 biegt die Kette um („ β -turn“ vom Typ II^[23–25]). Die CO-Gruppe von Abu-2 und die *N*-CH₃-Gruppe von MeLeu-4 stehen somit bei der in Abbildung 1 und 2 gewählten Orientierung nach oben und die CO-Gruppe von Sar-3 und die NH-Gruppe von Val-5 nach unten. Das *pro-S*-Proton der Methylengruppe von Sar-3 ist axial, die Seitenkette von MeLeu-4 äquatorial angeordnet. Die Reste 7 bis 11 bilden eine Schleife, in der sich zwischen den beiden

benachbarten *N*-Methyleucin-Resten 9 und 10 die einzige *cis*-Amidbindung des Moleküls befindet. Die verbleibende Wasserstoffbrücke ist vom γ -Typ und fixiert das Gerüst in gefalteter, länglicher Form.

Als Konsequenz dieser ziemlich starren Konformation des Cyclosporinskeletts sind die Seitenketten von sechs Aminosäuren quasi senkrecht zur Ebene des Peptidgerüsts gerichtet: Bei Abu-2, Val-5, Ala-7 und MeVal-11 zeigen sie nach oben, bei MeBmt-1 und MeLeu-6 nach unten. Die Seitenketten der restlichen fünf Aminosäuren liegen mehr oder weniger in der Ringebene.

1.4. Biosynthese von Cyclosporin

Bei den ersten biosynthetischen Untersuchungen gaben Kobel et al.^[26] ^3H - und ^{13}C -markierte Vorstufen zur Pilzkultur und bestimmten NMR-spektroskopisch die Einbaustelle der Vorstufe im Cyclosporin. Demnach stammen sämtliche *N*-Methylgruppen des Moleküls und die MeBmt- γ -Methylgruppe von Methionin; die verbleibenden C-Atome des MeBmt-Restes werden durch Kopf-Schwanz-Kondensation von vier Acetateinheiten gebildet. Im ^{13}C -NMR-Spektrum des angereicherten Cyclosporins aus $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat sind vier stärkere Signale zu sehen, die C-1,3,5,7 der MeBmt-Einheit zuzuordnen sind. Alle anderen Aminosäuren enthielten kein ^{13}C .

Zoher und Kleinkauf^[27] untersuchten an Enniatin, einem analogen Beispiel für die nichtribosomale Synthese von Cyclopeptiden in Pilzen die biosynthetische *N*-Methylierung der Aminosäuren. Dieser Vorgang wird von einem multifunktionellen Enzym bewirkt, das die Aminosäuren zunächst als Thioester bindet und dadurch aktiviert. Beobachtungen von Zoher et al.^[28] stützen einen ähnlichen Mechanismus für die Biosynthese von Cyclosporin. Sie stellten fest, daß $[^{14}\text{C}]$ Sarcosin nicht aufgenommen wird und daß die Radioaktivität von $[\text{Me}-^{14}\text{C}]$ Methionin, das in jede *N*-methylierte Aminosäure eingebaut wird, direkt proportional zur Anzahl der entsprechenden Aminosäurereste in Cyclosporin ist. Demnach werden die Aminosäuren simultan *N*-methyliert.

Die Befunde von Kobel et al.^[26] ermöglichen keine klare Aussage über den Ort der Biosynthese des Bmt-Restes. Nach Kurzzeit-Fütterungsversuchen von Kleinkauf et al.^[28] mit markiertem Acetat und Methionin, die wahrscheinlich nur zu radioaktivem Einbau in die *N*-Methylgruppe führten, wird Bmt nicht am Multienzymkomplex, sondern an anderer Stelle vor dem Einbau in Cyclosporin biosynthetisiert.

2. Enantioselektive Synthese der Aminosäure MeBmt aus (*R,R*)-Weinsäure^[1]

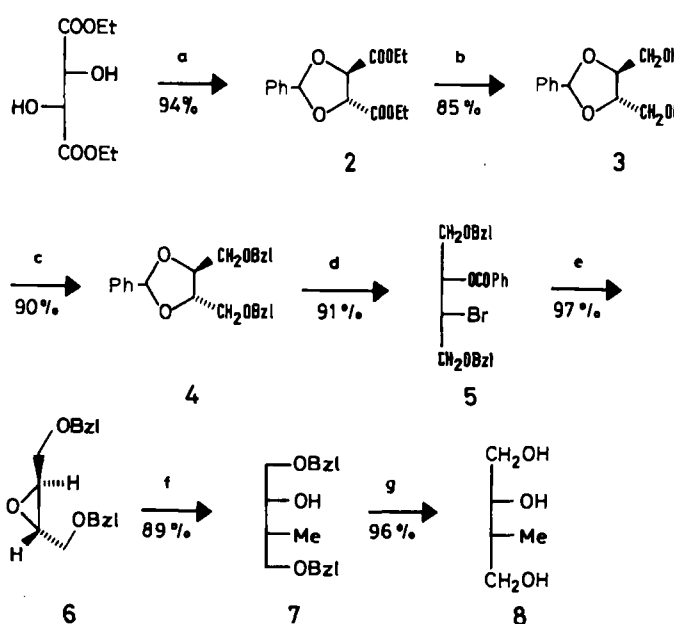
In der Aminosäure (4*R*)-4-[(*E*)-2-Butenyl]-4,*N*-dimethyl-L-threonin (MeBmt) 25 sind die MeNH- und die OH-Gruppe *threo*-, die OH- und die CH₃-Gruppe *erythro*-konfiguriert; die Doppelbindung liegt in *trans*-(oder *E*-)Form vor. Die systematische Bezeichnung (siehe [30]) lautet (2*S*,3*R*,4*R*,6*E*)-3-Hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-6-oxotensäure.

Als chirales Ausgangsmaterial diente (*R,R*)-(+)-Weinsäure, über deren Verwendung als nützliche Quelle für chirale Synthesebausteine Seebach und Hungerbühler^[31] zusammenfassend berichteten. In drei Hauptschritten wurde die Weinsäure in die Aminosäure MeBmt umgewandelt. Der erste Schritt ist in Schema 1 aufgeführt. C2 und C3 von (*R,R*)-(+)-Weinsäure haben dieselbe Konfiguration wie C3 von MeBmt. Eine der beiden OH-Gruppe war somit direkt verwendbar, die andere wurde unter Inversion durch eine Methylgruppe ersetzt; auf diese Weise wurden die Asymmetriezentren an C3 und C4 der Aminosäure erhalten.

Der zweite Schritt, die Einführung des (*E*)-Butenylrestes (Schema 2), bestand im Anbau einer Formylgruppe, der sich die Kettenverlängerung durch Wittig-Reaktion unter den von Schlosser und Christmann empfohlenen Bedingungen^[32] anschloß. Der dritte Schritt umfaßte die Oxidation des Diols 14 zum Hydroxyaldehyd 19 (Schema 3) sowie die Einführung der MeNH- und der COOH-Gruppe über eine cyclische Zwischenverbindung, die eine stereochemische Kontrolle der Bildung des Asymmetriezentrums C2 ermöglichte (Schema 4).

2.1. Synthese von (2*R*,3*R*)-3-Methyl-1,2,4-butantriol 8; Bildung der Asymmetriezentren C3 und C4

Wie Schema 1 zeigt, werden zunächst die OH-Gruppen des (*R,R*)-Weinsäurediethylesters mit Benzaldehyd in das Acetal 2 überführt. Durch Reduktion mit LiAlH₄ zum Diol 3 und anschließende Benzylierung erhält man das Dioxolan 4. Für den Austausch einer der OH-Gruppen der Weinsäure durch eine CH₃-Gruppe unter Inversion wird aus 4 nach Seeley und McElwee^[33] das Epoxid 6 hergestellt; wegen der Symmetrie von 4 ist es gleichgültig, an welchem der beiden sekundären C-Atome der Austausch stattfindet. Umsetzung von 4 mit *N*-Bromsuccinimid ergibt



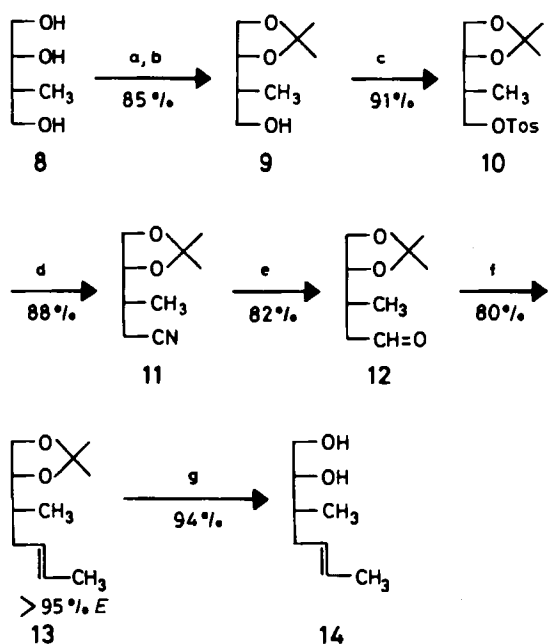
Schema 1. Synthese von 8. a: PhCHO/HC(OEt)₂/TosOH·H₂O. b: LiAlH₄/Tetrahydrofuran (THF). c: BzBr/Toluol/KOH. d: *N*-Bromsuccinimid (NBS)/CCl₄. e: KOH/EtOH. f: 2 MeLi (CuI)/Et₂O, -15°C. g: Pd/H₂. - Bzl = Benzyl.

[*] Einzelheiten der Synthese von MeBmt siehe [29].

den Bromester 5, der bei alkalischer Hydrolyse direkt das optisch aktive und somit *trans*-disubstituierte Oxiran 6 ergibt. Die Methylierung des Epoxids (C_2 -Symmetrie) nach Johnson et al.^[34] liefert das einheitliche Produkt 7. Hydrogenolyse der Schutzgruppen führt zum Triol 8 in 56% Gesamtausbeute aus Weinsäurediethylester (sieben Stufen).

2.2. Synthese von (2*R*,3*R*,5*E*)-3-Methyl-5-hepten-1,2-diol 14; Kettenverlängerung unter Einführung der *trans*-Doppelbindung

Die beiden vicinalen OH-Gruppen im Triol 8 werden, wie aus Schema 2 hervorgeht, durch Herstellung des Acetals 9 selektiv geschützt. Dabei kann die Bildung von 10–15% des isomeren 1,3-Dioxans als Nebenprodukt nicht vermieden werden. Das Dioxolan 9 wird in das Tosylat 10

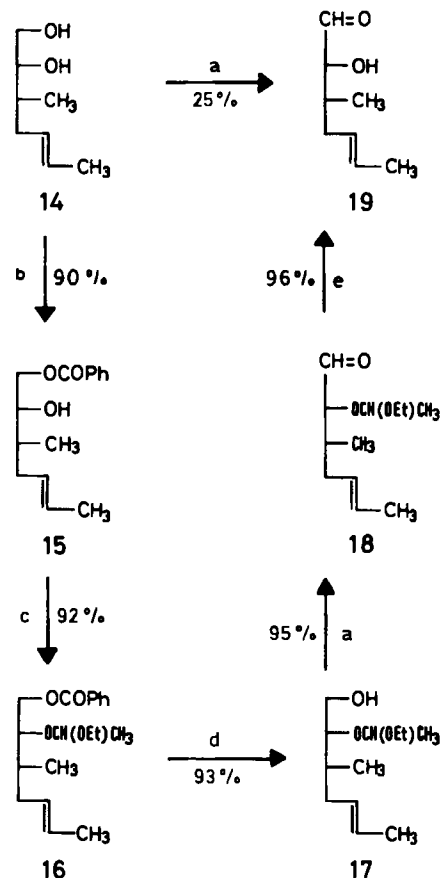


Schema 2. Synthese von 14. a: $Me_2C(OMe)_2/TsOH \cdot H_2O/C_6H_6$, 2 h Rückfluß. b: $Me_2CO/TsOH \cdot H_2O$, 15 h Rückfluß. c: $TsCl/Pyridin$, 35°C, 4 h. d: $KCN/Dimethylsulfoxid$ (DMSO), 20°C, 3 d. e: Diisobutylaluminiumhydrid/Hexan, –75°C, 2 h. f: $Ph_3EtPBr/BuLi$, Schlosser-Bedingungen [32]. g: 1.1 Äquiv. 1 N HCl/(THF/ H_2O 4:1), 20°C, 2 d.

überführt. Zur Kettenverlängerung wird 10 mit Kaliumcyanid zum Nitril 11 umgesetzt, das man in den Aldehyd 12 umwandelt. Durch Wittig-Reaktion^[32] wird 12 zu 13 umgesetzt. Nach Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppe wird das Diol 14 in 42% Gesamtausbeute aus dem Triol 8 erhalten (sechs Stufen).

2.3. Synthese von (2*R*,3*R*,5*E*)-2-Hydroxy-3-methyl-5-heptenal 19; Oxidation von 14 zu 19

Die Oxidation des Diols 14 (Schema 3) kann nach der Pfitzner-Moffatt-Methode^[35] in einer Stufe durchgeführt werden, dann allerdings nur in 25% Ausbeute. Will man den Hydroxyaldehyd 19 in hoher Ausbeute erhalten, muß zunächst die sekundäre OH-Gruppe von 14 geschützt wer-

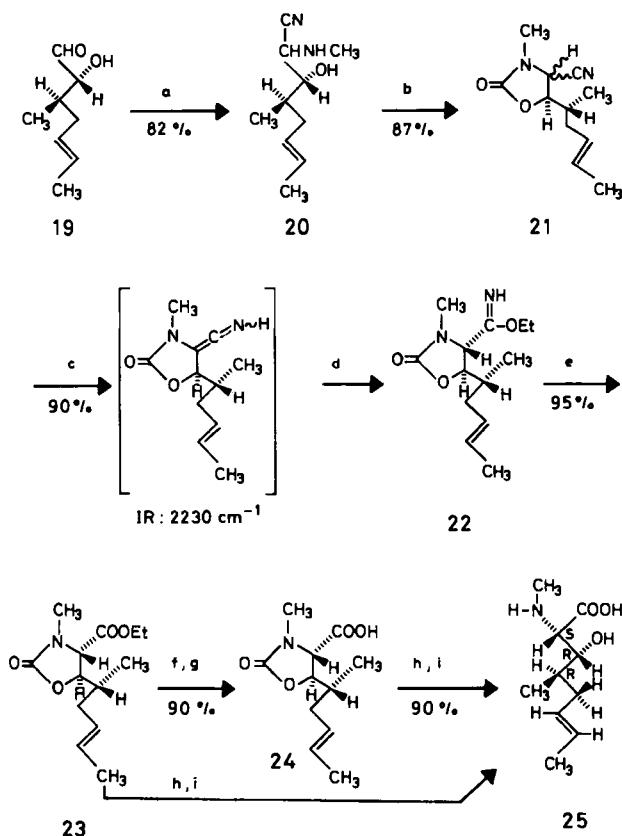


Schema 3. Synthese von 19. a: Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI)/DMSO/ C_6H_6 /Pyridin/Trifluoressigsäure (TFA), 20°C, 2 h. b: $PhCOCl/Pyridin$, 20°C, 1 h. c: $CH_2=CHOEt/TFA$, 20°C, 1–3 d. d: 10 N KOH/EtOH, 20°C. e: 1 N HCl/THF, 20°C, 2 h.

den. Dies gelingt durch Monobenzoylierung zu 15, Umsetzung zum Ethoxyethylderivat 16 und alkalische Hydrolyse des Benzoats unter Bildung des primären Alkohols 17. Nach Pfitzner-Moffatt^[35] läßt sich 17 nun in 95% Ausbeute zum Aldehyd 18 oxidieren. Abspaltung der Schutzgruppe ergibt den Hydroxyaldehyd 19 in 70% Gesamtausbeute (fünf Stufen).

2.4. Synthese von (2*S*,3*R*,4*R*,6*E*)-3-Hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-6-octensäure (MeBmt) 25; Einführung der Methylamino- und der Carboxygruppe

Schema 4 zeigt die letzten Schritte der MeBmt-Synthese. Aus frisch hergestelltem Hydroxyaldehyd 19 erhält man mit Kaliumcyanid und Methylammoniumchlorid das Cyanhydrin 20 als Diastereomergemisch. Dieses wird zum 2-Oxazolidinon 21 umgesetzt (Diastereomergemisch (6:1) *cis*:*trans*, bezogen auf den Ring). Mit Kaliumcarbonat in Ethanol wird in hoher Ausbeute der einheitliche Imidsäureester 22 erhalten. Hierbei reagiert das intermediäre Iminomethylenderivat (IR-Bande bei 2230 cm^{-1} in Ethanol) stereospezifisch zum thermodynamisch stabileren *trans*-Imidsäureester 22. Hydrolyse von 22 ergibt das enantiomerenreine *N*-Methylaminosäurederivat 23, in welchem die geschützte Hydroxy- und die *N*-Methylamino-gruppe in der gewünschten *threo*-Konfiguration vorliegen. Beide Schutzgruppen von 23 können in einem Schritt oder



Schema 4. Synthese von MeBmt 25. a: KCN/MeNH₂·HCl/MeOH/H₂O, 20°C, 2 h. b: 1,1'-Carbonyldiimidazol/CH₂Cl₂, 20°C, 16 h. c: K₂CO₃/EtOH, 20°C, 6 h. d: EtOH. e: 1 Äquiv. 1 N HCl/EtOH, 20°C, 1.5 h. f: 0.1 N KOH/Dioxan, 20°C, 1 h. g: HCl (pH 2). h: 2 N KOH/H₂O, 80°C, 3 h. i: HCl (pH 5).

stufenweise über **24** abgespalten werden. Aus der Reaktionsmischung kristallisiert die gewünschte *N*-Methylamino-säure MeBmt **25** nach Ansäuern auf pH 5. Ausgehend vom Aldehyd **19** beträgt die Ausbeute 48% (sechs Stufen), ausgehend von (*R,R*)-Weinsäurediethylester 7.8% (24 Stufen). Dies entspricht einer Durchschnittsausbeute von 90% pro Stufe.

Die hier beschriebene stereospezifische Synthese ermöglichte zum ersten Mal die Charakterisierung der neuen Aminosäure MeBmt **25** und darüber hinaus die Totalsynthese von Cyclosporin.

3. Totalsynthese von Cyclosporin^[*]

3.1. Synthesekonzept

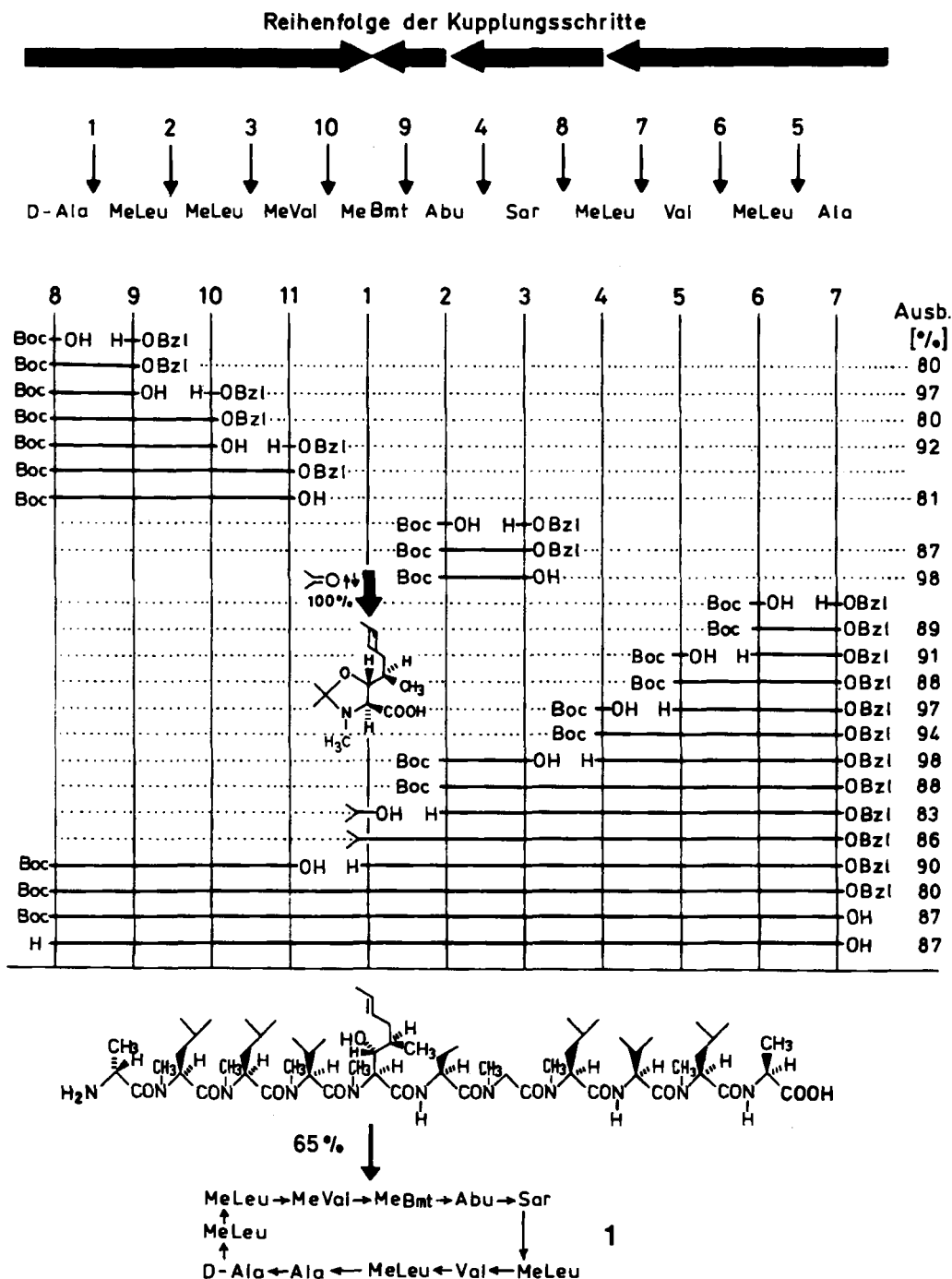
Bei der Synthese von Cyclosporin **1** (Abb. 1) wurde für den Ringschluß die Knüpfung der Peptidbindung zwischen L-Alanin in Position 7 und D-Alanin in Position 8 vorgesehen. Dies hatte zwei Hauptgründe: 1. Die intramolekularen Wasserstoffbrücken zwischen den Amidgruppen dieses linearen Undecapeptids könnten gefaltete Konformationen stabilisieren, die der Konformation von Cyclosporin ähneln und dadurch den Ringschluß erleichtern sollten. 2. Die Bindungsknüpfung zwischen *N*-methyl-

ten Aminosäuren ist schwieriger als zwischen nichtmethylierten Aminosäuren (Einzelheiten siehe ^[36,37]), so daß der Ring zwischen den beiden einzigen aufeinanderfolgenden nichtmethylierten Aminosäuren geschlossen werden sollte.

Für die Synthese des Undecapeptids wurde eine Fragmentkondensationstechnik angewendet, bei der die Aminosäure MeBmt am Ende der Synthese angebaut wurde. Auf diese Weise ließ sich die Anzahl der noch folgenden Reaktionsschritte minimieren. Schema 5 zeigt, wie die (geschützten) Peptidfragmente zusammengefügt wurden. Zur Aktivierung der Carbonsäurefunktion diente eine Variante der Methode von *Zaoral*^[38] über die gemischten Pivalinsäureanhydride, die von uns auf *N*-Methylaminosäuren übertragen wurde^[36]. Dabei wird mit Pivaloylchlorid in Chloroform bei -20°C zunächst langsam das gemischte Anhydrid in Gegenwart einer tertiären Base wie *N*-Methylmorpholin (2 Äquiv.) erzeugt und unmittelbar mit den *N*-ungeschützten Aminosäure- oder Peptidestern gekuppelt. Die freien Basen wurden durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure bei -20°C und anschließende Neutralisation mit Natriumhydrogencarbonat erhalten; die Benzylester wurden hydrogenolytisch mit Palladium/Kohle in Ethanol gespalten.

Das Tetrapeptid Boc-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-OBzl wurde entsprechend Schema 5 von links nach rechts durch Knüpfen der Bindungen 1, 2 und 3 aufgebaut. Durch Synthese des Dipeptids Boc-Abu-Sar-OBzl entstand Bindung 4. Das Tetrapeptid Boc-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-OBzl wurde von rechts nach links durch Bildung der Bindungen 5, 6 und 7 hergestellt. Durch anschließende Kupplung (Bindung 8) mit dem zuvor synthetisierten Dipeptid erhielt man das Hexapeptid Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-OBzl. Beim Einbau der Aminosäure MeBmt waren Hydroxy- und *N*-Methylaminofunktion als Dimethyloxazolidinderivat geschützt. Diese Isopropyliden-Schutzgruppe läßt sich leicht durch Erhitzen der Aminosäure in Aceton einführen und hat den Vorteil, daß bei der Peptidknüpfung keine Epimerisierung eintritt. Das bedeutet, daß der Oxazolidinring die thermodynamisch stabilere *trans*-Konfiguration während der Aktivierung der Carboxygruppe und der Peptidbildung behält. Schon während der Herstellung, auf jeden Fall aber vor der Aktivierung, wurde MeBmt durch Zugabe von *N*-Methylmorpholin (1 Äquiv.) geschützt. Zur Gewinnung des geschützten Heptapeptids wurden geschütztes MeBmt und das Hexapeptid nach der Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI)-Methode in Gegenwart von *N*-Hydroxybenzotriazol^[39] verknüpft. Nach der Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppe (1 Äquiv. 1 N HCl/MeOH) wurde als letzte die Amidbindung 10 durch Verknüpfen des Heptapeptids mit Boc-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-OH in Gegenwart von *N*-Methylmorpholin in CH₂Cl₂ bei Raumtemperatur geknüpft. Als Verknüpfungsreagens diente das von *Castro et al.*^[40] entwickelte (1*H*-1,2,3-Benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BtOP(NMe₂)₃⁺PF₆⁻). Nach der Hydrolyse der Estergruppe (NaOH, 0°C) und Abspaltung der Boc-Gruppe (CF₃COOH, -20°C) wurde das ungeschützte Undecapeptid bei Raumtemperatur zu Cyclosporin **1** cyclisiert (0.0002 M CH₂Cl₂, 1 Äquiv. BtOP(NMe₂)₃⁺PF₆⁻^[40], *N*-Methylmorpholin). Die Ausbeute an kristallinem Material be-

[*] Einzelheiten der Synthese von Cyclosporin siehe [12, 36].



Schema 5. Synthese von Cyclosporin 1. Dicke Pfeile: Strategie für die Synthese der Peptide. Einzelheiten siehe Text. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Bzl = Benzyl, >OH = Isopropyliden-geschütztes MeBmt.

trug 62%. Durch Cyclisierung über das gemischte Phosphorsäureanhydrid nach *Wissmann und Kleiner*^[41] oder über den Pentafluorphenol-DCCI-Komplex nach *Kovacs*^[42] konnte die Ausbeute auf 65% erhöht werden.

Die hier beschriebene Fragmentkondensationstechnik ermöglicht somit eine sehr leistungsfähige Synthese von Cyclosporin in einer Gesamtausbeute von 27.5% bezogen auf die eingesetzte Aminosäure MeBmt. Aus 1 g MeBmt lassen sich 1.6 g Cyclosporin herstellen. Darüber hinaus eröffnet diese Synthese den Weg zum Aufbau von Analoga, mit denen die vielen unbeantworteten Fragen über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieses Präparates untersucht werden können.

4. Cyclosporin-Analoga

4.1. Auswahl der Variationen

Rüegger et al.^[13] und *Traber et al.*^[17-19] isolierten einige mit Cyclosporin eng verwandte natürliche Cycloundecapeptide, die zum Verständnis von Struktur-Wirkungs-Beziehungen beitrugen (siehe Abschnitt 5). Das neu entwickelte Synthesekonzept ermöglicht es im Prinzip, jede Aminosäure in Cyclosporin zu modifizieren, so daß spezifische Aspekte der Struktur-Wirkungs-Beziehungen sich sukzessive untersuchen lassen. Als erstes wurde geprüft, welche Bedeutung die Umgebung der Aminosäure MeBmt in Po-

sition 1 hat; dazu wurden Veränderungen in den Positionen 1, 2, 3 und 11 vorgenommen. Im folgenden werden sieben dieser Variationen sowie die Synthese des natürlich vorkommenden Isomers (*N*-Methyl-D-Valin¹¹)cyclosporin besprochen.

Um die Bedeutung der ungewöhnlichen Seitenkette von MeBmt in Position 1 zu erforschen, wurde MeBmt durch *N*-Methylthreonin (MeThr) ersetzt. Dadurch blieben zwar die polaren Eigenschaften von MeBmt erhalten, nicht aber der ausgeprägte lipophile Charakter der Seitenkette.

(Threonin²)cyclosporin [(Thr²)CS], ein natürliches Cyclosporin-Analogon, ist ein wirkungsvolles Immunsuppressivum. Im Gegensatz zu den anderen natürlichen Analoga mit Abweichungen in Position 2 enthält (Thr²)CS eine Hydroxygruppe. Um herauszufinden, ob diese Gruppe an speziellen Wechselwirkungen mit dem Rezeptor beteiligt ist, wurde α -Aminobuttersäure in Position 2 von Cyclosporin durch Serin ersetzt.

Wie die Röntgen-Strukturanalyse von Cyclosporin ergab, beginnt die Peptidkette bei Sarcosin in Position 3 umzubiegen (siehe Abschnitt 1.3). Es ist zu erwarten, daß diese Teilstruktur durch den Austausch von Sarcosin durch D-Prolin stabiler und starrer wird. Dabei sollte der Prolinring äquatorial zum Peptidring angeordnet sein und die Konformation des Peptidgerüsts nicht verändern.

Eine weitere Modifizierung des Cyclosporingerüsts war der Ersatz von MeVal in Position 11 durch MeLeu. Die zusätzliche Methylengruppe dieser Aminosäure sollte die sterische Hinderung in Position 11 vermindern und den Peptidring beweglicher machen.

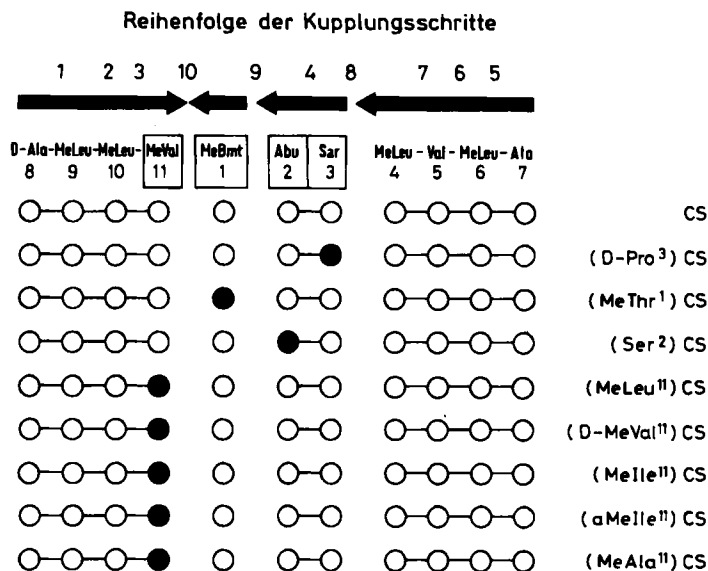
Der Austausch von MeVal durch Melle (*N*-Methyl-L-isoleucin) oder aMelle (*N*-Methyl-L-alloisoleucin), zwei Aminosäuren, die je eine *sec*-Butyl- statt einer Isopropylseitenkette enthalten, ergab dem natürlichen Cyclosporin ähnlichere Modelle. Im Fall von Melle wird ein Wasserstoffatom der *pro-S*-Methylgruppe, im Fall von aMelle ein Wasserstoffatom der *pro-R*-Methylgruppe von Methylvalin jeweils durch eine Methylgruppe ersetzt.

Schließlich wurde MeVal gegen MeAla (*N*-Methylalanin), eine kleinere und sterisch anspruchslosere Aminosäure, ausgetauscht, die anstelle der beiden Methylgruppen von Valin zwei Wasserstoffatome enthält.

Von diesen Cyclosporin-Analoga erwarteten wir Informationen über die Empfindlichkeit der biologischen Aktivität gegenüber geringfügigen Modifikationen in den Positionen 1, 2, 3 und 11 sowie Hinweise, ob und in welchem Maße diese Aminosäuren in die Wechselwirkung mit dem Rezeptor einbezogen werden.

4.2. Synthese von Cyclosporin-Analoga

Wie Schema 6 zeigt, wurde das Konzept der Cyclosporinsynthese (Schema 5) auf die neuen Peptidfragmente übertragen. Die Pfeile geben Richtung und Sequenz des Aufbaus an; durch die schwarzen Punkte sind die modifizierten Aminosäuren gekennzeichnet. Die Undeca-peptide mit freier Amino- und Carboxyfunktion wurden mit (PrPO₂)₃^[41] in Gegenwart von 4-Dimethylaminopyridin in CH₂Cl₂ cyclisiert.



Schema 6. Konzept für die Synthese von Cyclosporin-Analoga (siehe auch Schema 5). Schwarze Punkte: Modifizierte Aminosäuren. CS = Cyclosporin.

4.3. Strukturbestimmung der Cyclosporin-Analoga

Die Strukturzuordnung der Analoga (Schema 6) wurde durch NMR-Daten gestützt. Alle Analoga außer (D-MeVal¹¹)Cyclosporin, dessen kompliziertes Spektrum mindestens sieben Konformationen des Peptidrings nahelegt, haben ähnliche NMR-Spektren wie natürliches Cyclosporin, das in CDCl₃ überwiegend in einer Konformation vorliegt. Somit ließ sich voraussagen, daß die neuen Cyclosporin-Analoga eine ähnliche Konformation wie Cyclosporin haben. Im Fall von (MeLeu¹¹)Cyclosporin konnte die aufgrund der Synthese und der physikalischen Daten erwartete Struktur durch eine Röntgen-Strukturanalyse gesichert werden. Diese zeigte auch, daß das Gerüst von (MeLeu¹¹)Cyclosporin im Kristall praktisch die gleiche Konformation wie das Gerüst von Cyclosporin hat. Die geometrische Anordnung der β -C-Atome von *N*-Methylvalin und *N*-Methylleucin in Position 11 stimmt überein.

5. Biologische Aktivität und Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Cyclosporin-Analoga

Die relative Wirksamkeit einiger synthetischer und natürlich vorkommender Cyclosporin-Analoga ist in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Verbindungen wurden unter Verwendung pharmakologischer Modelle charakterisiert, die man auch beim Test von Cyclosporin verwendet hatte. Die Hemmung der humoralen Immunantwort wurde durch Bestimmung antikörperbildender Zellen in der Milz von Mäusen ermittelt, die mit Schaf-Erythrocyten immunisiert worden waren (Jerne-Test). Die Hemmung der zellvermittelten Immunantwort wurde in einer Immunreaktion vom verzögerten Typ (delayed-type hypersensitivity, DTH) bestimmt, indem die Suppression eines durch Oxazolone ausgelösten Hautausschlags bei Mäusen gemessen wurde. Der Hemmungsindex in vitro ergab sich durch quantitative Erfassung des Hemmeffekts auf die durch Mitogene oder Alloantigene ausgelöste Proliferation lymphoider Zellen.

Tabelle 1. Immunsuppressive Wirkung einiger Cyclosporin-Analoga und -Derivate. Cyclosporin (CS) gleich welcher Quelle hat stark immunsuppressive Wirkung (***); H-MeBmt-OH hat keine Wirkung (*).

CS enthält	Position	Analogon/Derivat enthält	Quelle [a]	Wirkung [b]
MeBmt	1	(OAc)MeBmt	hs	*
MeBmt	1	(3'-Desoxy)MeBmt	hs	*
MeBmt	1	Dihydro)MeBmt	hs	**
MeBmt	1	MeThr	s	*
Abu	2	Ser	s	**
Abu	2	Ala	n	**
Abu	2	Thr	n	***
Abu	2	Val	n	**
Abu	2	NorVal	n	***
Sar	3	D-Pro	s	*
MeVal	11	MeLeu	s	*
MeVal	11	D-MeVal	n, s	*
MeVal	11	aMelle	s	*
MeVal	11	Melle	s	(*)•
MeVal	11	MeAla	s	*

[a] n = natürlich, hs = halbsynthetisch, s = synthetisch. [b] *** = starke immunsuppressive Wirkung bei Tests mit pharmakologischen Modellen, die auch bei Cyclosporin verwendet wurden [2, 6], ** = durchschnittliche Wirkung, * = wenig oder keine Wirkung.

Aus den Befunden in Tabelle 1 ist klar ersichtlich, daß die Seitenkette der Aminosäure 1 (MeBmt) wichtig für die biologische Aktivität ist. Wenn man den unpolaren Teil der Seitenkette, wie im Fall von (MeThr¹)Cyclosporin, entfernt, wird die immunsuppressive Wirksamkeit drastisch herabgesetzt; dies ist auch bei Veränderungen an der Hydroxygruppe (O-Acetyl- und Desoxycyclosporin) der Fall. Sogar die Doppelbindung trägt zur biologischen Aktivität bei: Dihydroverbindungen wirken im allgemeinen weniger immunsuppressiv. MeBmt allein hat jedoch keine immunsuppressive Wirkung.

Die Alkylkette der Aminosäure 2 (Abu) kann um zwei bis drei C-Atome variiert werden, wobei gute Aktivität gemessen wird. Während (Thr²)Cyclosporin ein wirksames Immunsuppressivum ist, zeigt (Ser²)Cyclosporin bedeutend weniger Aktivität. Dies läßt darauf schließen, daß vor allem hydrophobe Wechselwirkungen für das Zusammenwirken der aliphatischen Seitenkette der Aminosäure 2 und des Rezeptors wichtig sind.

Obwohl (D-Pro³)- und (MeLeu¹¹)Cyclosporin fast dieselbe Konformation wie Cyclosporin haben sollten (ähnliches NMR-Spektrum beider Analoga und ähnliche Struktur von Cyclosporin und (MeLeu¹¹)Cyclosporin im Kristall), wirken sie nicht immunsuppressiv. Vermutlich verhindert die sterische Anhäufung der Seitenketten in Position 3 bzw. 11 eine wirksame Bindung dieser Derivate an den Cyclosporin-Rezeptor. Für die Bedeutung der Seitenkette der Aminosäure 11 für die biologische Aktivität spricht auch der bei (D-MeVal¹¹)Cyclosporin beobachtete Aktivitätsverlust. Bei diesem Derivat ist die Konformation des Peptidrings in Position 11 sicherlich anders (NMR) als bei Cyclosporin.

Kleine Strukturänderungen der Aminosäure 11 vermindern die immunsuppressive Wirkung solcher Cyclosporin-Analoga. Nach Röntgen-Strukturanalysen liegt die *pro*-R-Methyl-Gruppe von *N*-Methylvalin näher an der *N*-Methylgruppe von MeBmt als die *pro*-S-Methylgruppe, und Veränderungen wirken sich etwas stärker auf die Aktivität aus. Die geringere Aktivität des MeAla-Analogons könnte darauf zurückgeführt werden, daß es eine kritische hydro-

phobe Mulde am Rezeptor nicht ausfüllen kann oder daß die Starrheit des Moleküls verringert wird.

6. Zusammenfassung

Einige Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) von Cyclosporin beginnen sich durch Untersuchungen mit speziell modifizierten Derivaten abzuzeichnen; um jedoch ein exakteres Bild zu erhalten und daraufhin Derivate mit verbessertem Aktivitätsprofil zu synthetisieren, muß noch viel getan werden.

Unabhängig davon steht fest, daß die ungewöhnliche MeBmt-Kette eine wesentliche Rolle bei der biologischen Aktivität von Cyclosporin spielt. Trotzdem ist sie allein nicht ausreichend für die immunsuppressive Wirkung: An der biologischen Aktivität ist ein größerer Teil des Cyclosporinmoleküls beteiligt. Aus den in Abschnitt 5 geschilderten Befunden geht hervor, daß dazu sicherlich die Aminosäuren in den Positionen 1, 2, 3 und 11 gehören.

Die Synthese weiterer Derivate sollte dazu beitragen, viele der verbleibenden Fragen über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieses Arzneimittels zu beantworten.

Eingegangen am 17. August 1984 [A 520]

- [1] R. M. Wenger, *Transplant. Proc.* 15 No. 4, Suppl. 1 (1983) 2230.
- [2] J. F. Borel, C. Feurer, H. U. Gubler, H. Stähelin, *Agents Actions* 6 (1976) 468.
- [3] J. F. Borel, C. Feurer, C. Magnée, *Immunology* 31 (1976) 631.
- [4] J. F. Borel, C. Feurer, C. Magnée, H. Stähelin, *Immunology* 32 (1977) 1917.
- [5] J. F. Borel, D. Wiesinger, H. U. Gubler, *Eur. J. Rheumatol. Inflammation* 1 (1978) 97.
- [6] D. Wiesinger, J. F. Borel, *Immunobiology* 156 (1979) 454.
- [7] B. E. Bueding, J. Hawkins, Y. N. Cha, *Agents Actions* 11 (1981) 380.
- [8] K. Thommen-Scott, *Agents Actions* 11 (1981) 770.
- [9] R. J. Calne, D. J. White, S. Thiru, D. B. Evans, P. McMaster, D. C. Dunn, G. N. Craddock, D. B. Pentlow, K. Rolles, *Lancet* ii 1978, 1323.
- [10] R. L. Powles, A. J. Barrett, H. Clink, H. E. M. Kay, J. Sloane, T. J. McElwain, *Lancet* ii 1978, 1327.
- [11] R. M. Wenger in D. J. G. White: *Cyclosporin A*, Biomedical Press, Amsterdam 1982, S. 19.
- [12] R. M. Wenger, *Helv. Chim. Acta* 67 (1984) 502.
- [13] A. Rüegger, M. Kuhn, H. Lichti, H. R. Loosli, R. Huguenin, C. Quikerez, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* 59 (1976) 1072.
- [14] M. Dreyfuss, E. Härr, H. Hofman, H. Kobel, W. Pache, H. Tschertter, *Eur. J. Appl. Microbiol.* 3 (1976) 125.
- [15] W. Gams, *Persoonia* 6 (1971) 185.
- [16] H. Kobel, R. Traber, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14 (1982) 237.
- [17] R. Traber, M. Kuhn, A. Rüegger, H. Lichti, H. R. Loosli, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* 60 (1977) 1247.
- [18] R. Traber, M. Kuhn, H. R. Loosli, W. Pache, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* 60 (1977) 1568.
- [19] R. Traber, H. R. Loosli, H. Hofman, M. Kuhn, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* 65 (1982) 1655.
- [20] H. Kobel, R. Traber, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14 (1982) 237.
- [21] T. J. Petcher, H. P. Weber, A. Rüegger, *Helv. Chim. Acta* 59 (1976) 1480.
- [22] H. R. Loosli, H. Kessler, H. Oschkinat, H. P. Weber, T. J. Petscher, A. Widmer, *Helv. Chim. Acta* 68, im Druck.
- [23] P. Chou, G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.* 115 (1977) 135.
- [24] J. A. Smith, L. G. Pease, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8 (1980) 316.
- [25] J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* 34 (1981) 167.
- [26] H. Kobel, H. R. Loosli, R. Voges, *Experientia* 39 (1983) 873.
- [27] R. Zocher, H. Kleinkauf, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81 (1978) 1162.
- [28] R. Zocher, N. Madry, H. Peeters, H. Kleinkauf, *Phytochemistry* 23 (1984) 549.
- [29] R. M. Wenger, *Helv. Chim. Acta* 66 (1983) 2308.
- [30] R. S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem.* 78 (1966) 413; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 5 (1966) 385.
- [31] D. Seebach, E. Hungerbühler in R. Scheffold: *Modern Synthetic Methods*, Salle & Sauerländer, Frankfurt/Aarau 1980, S. 93.
- [32] M. Schlosser, K. F. Christmann, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 708 (1967) 1.

- [33] D. A. Seeley, H. McElwee, *J. Org. Chem.* 38 (1973) 1691.
 [34] R. W. Herr, D. M. Wieland, C. R. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 3813.
 [35] K. E. Pfitzner, J. G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 5670.
 [36] R. M. Wenger, *Helv. Chim. Acta* 66 (1983) 2672.
 [37] J. R. McDermott, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem.* 51 (1973) 2551, 2562.
 [38] M. Zaoral, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 27 (1962) 1273.

- [39] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* 103 (1970) 788.
 [40] B. Castro, J. R. Dormoy, J. G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* 1975, 1219.
 [41] H. Wissmann, H. J. Kleiner, *Angew. Chem.* 92 (1980) 129; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 133; J. Kovacs in E. Gross, J. Meienhofer: *The Peptides*, Vol. 2, Academic Press, New York 1980, S. 485.

Synthese und biologische Aktivität von α -Methylen- γ -butyrolactonen

Von H. M. R. Hoffmann* und Jürgen Rabe

Dr. Wilhelm A. Schuler zum 70. Geburtstag gewidmet

α -Methylen- γ -butyrolactone [Dihydro-3-methylen-2(3H)furanone] bilden eine wichtige Gruppe von Naturstoffen und haben vielseitige biologische Aktivitäten. Fortschritte in der Synthese des Heterocyclus sowie die Klassifizierung der Synthesemethoden sind nicht nur von praktischem Interesse, sondern auch grundsätzlich wichtig als aktuelles Beispiel für den Aufbau von Verbindungen mit der ungewöhnlichen 1,4-Anordnung der funktionellen Gruppen sowie einer Nucleophil-empfindlichen α -substituierten Acrylester-Einheit.

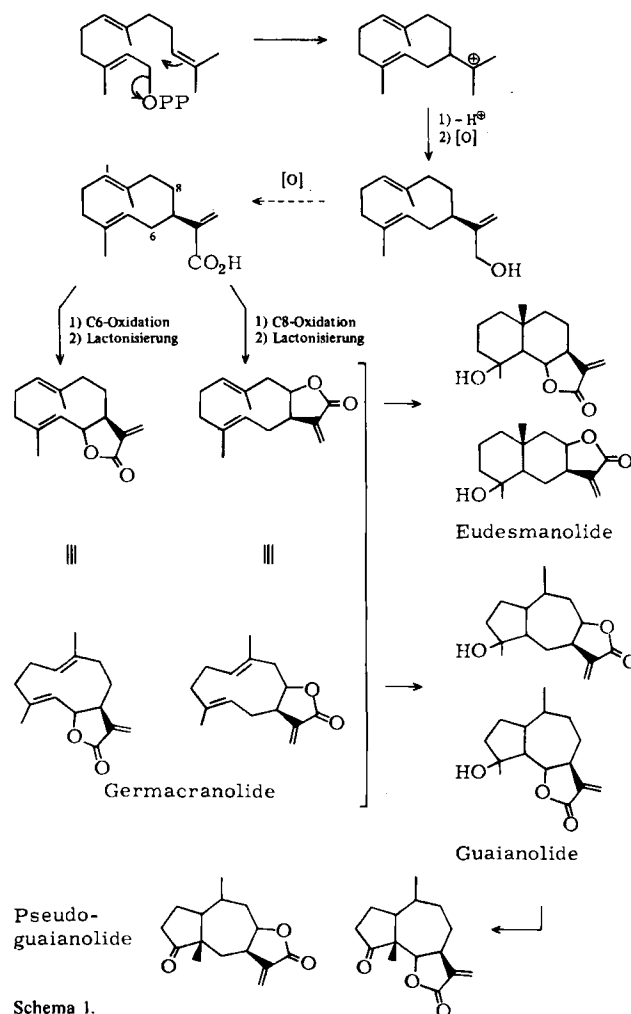
1. Einführung

Der α -Methylen- γ -butyrolacton-Ring ist ein integraler Baustein vieler Naturstoffe, insbesondere der Sesquiterpenlactone, die interessante biologische Eigenschaften aufweisen. In einem 1973 erschienenen Buch^[1a] wurden ca. 200 derartige Substanzen samt ^1H -NMR-Spektren und physikalischen Daten aufgelistet; sechs Jahre später waren bereits ca. 900^[1b] bekannt. Seitdem hat sich die Zahl dieser Verbindungen weiter erhöht: Eine Chemical-Abstracts-Online-Recherche mit Hochrechnung zeigt, daß zur Zeit mindestens 2000–3000 α -Methylen- γ -butyrolactone, vor allem vom Sesquiterpen-Typ, bekannt sind. Bei schätzungsweise derzeit nur 25 000–30 000 strukturell aufgeklärten Naturstoffen^[2] ist der Anteil dieser α -Methylenlactone mit ungefähr 10% beträchtlich. α -Methylen- γ -butyrolactone sind nach der ersten Zusammenfassung von Grieco^[3] in rascher Folge in weiteren Artikeln^[4] behandelt worden. Zweck dieser Übersicht ist, nach einer Beschreibung der biologischen Aktivitäten die unterschiedlichen Konzeptionen zur Synthese des Heterocyclus vorzustellen und in jüngster Zeit entwickelte Synthesen zu beschreiben.

2. Biosynthese

Die Biosynthese der sesquiterpenoiden α -Methylen- γ -butyrolactone ist recht einfach^[1,5]. Die Verbindungen gehen aus *trans,trans*-Farnesylpyrophosphat hervor, welches zunächst zu dem gespannten Cyclodecadiengerüst von Germacradien (oder Germacatrien) cyclisiert und dann intramolekular unter Bildung eines Perhydroazulensystems (z. B. Guaiane und Pseudoguaiane) oder eines Deca-

linsystems (z. B. Eudesmane) weiterreagiert. Über die Sequenz der Oxidationsschritte weiß man weniger. In Einklang mit Schema 1 ist die Lactoneinheit, welche durch



[*] Prof. H. M. R. Hoffmann, Dr. J. Rabe
 Institut für Organische Chemie der Universität
 Schneiderberg 1 B, D-3000 Hannover