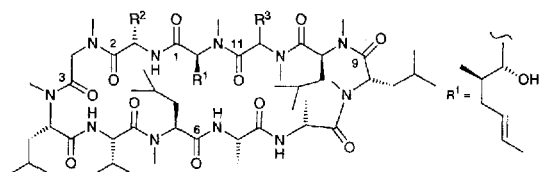


# Cyclosporin – ein Li- und Ca-spezifischer Ionophor! \*\*

H. Michael Bürger und Dieter Seebach \*

Das cyclische Undecapeptid Cyclosporin A **1** hat als Immunsuppressivum die Organtransplantation revolutioniert<sup>[1]</sup>. Trotz intensiver Forschung versteht man seine biologische Wirkung im komplexen Ablauf der Ereignisse bei der Immunreaktion im Säugetier noch lange nicht im Detail<sup>[2, 3]</sup>. Es gilt als erwiesen, daß Cyclosporin und FK506 (ein anderes, nicht peptidisches Immunsuppressivum) die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalübertragung in T- und Mast-Zellen inhibieren. Die Struktur von Cyclosporin in organischen Lösungsmitteln<sup>[4]</sup>, im Kristall<sup>[5]</sup> und im Komplex mit seinem cytoplasmatischen Bindeprotein Cyclophilin<sup>[6, 7]</sup> ist aus NMR<sup>[4, 6]</sup> und Röntgenstrukturuntersuchungen<sup>[5, 7]</sup> bekannt, aber noch nicht diejenige in Wasser. Wechselwirkungen von Cyclosporin mit Metall-Ionen, vor allem  $\text{Li}^+$ , sind nachgewiesen<sup>[8]</sup>; in Tetrahydrofuran sind sie stark exotherm (bis über  $125 \text{ kJ mol}^{-1}$  mit **1**)<sup>[9]</sup> und bewirken ähnliche Konformationsänderungen<sup>[10]</sup> wie die Komplexbildung mit Cyclophilin<sup>[6, 7]</sup> (z.B. 9,10-*cis*- zu 9,10-*trans*-Peptidbindung). Dies brachte uns auf die Idee zu prüfen, ob Cyclosporin ionophore Eigenschaften aufweist.

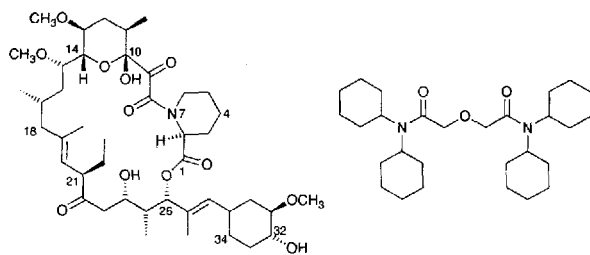
Mit der auch zum Studium des Ionentransports durch Poly(3-hydroxybuttersäure)-Derivate<sup>[11]</sup> verwendeten einfachen U-Rohr-Technik<sup>[12]</sup> haben wir jetzt die Wanderung von Alkalimetall- und Erdalkalimetall-Ionen durch eine organische Lösungsmittelphase unter dem Einfluß von Cyclosporin A **1**, C **2** und H **3** sowie von Ascomycin **4** und des Ca-Ionophors ETH 129 **5** studiert.



**1** Cyclosporin A (CS),  $\text{R}^2 = \text{Et}$ ,  $\text{R}^3 = (\text{S})\text{-i-Pr}$

**2** Cyclosporin C ( $[\text{Thr}^2]\text{CS}$ ),  $\text{R}^2 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ,  $\text{R}^3 = (\text{S})\text{-i-Pr}$

**3** Cyclosporin H ( $[\text{D-MeVal}^{11}]\text{CS}$ ),  $\text{R}^2 = \text{Et}$ ,  $\text{R}^3 = (\text{R})\text{-i-Pr}$



**4** Ascomycin  
(21-Dihydro-*nor*-FK506)

**5** ETH 129

Zur Untersuchung der Transporteigenschaften der Verbindungen **1–5** wurden deren Dichlormethan-Lösungen in einem U-Rohr mit zwei wäßrigen, auf pH 8.1 gepufferten Phasen über-

lagert, von denen eine das entsprechende Metallchlorid und Pikrinsäure enthielt. Die Wanderung wurde UV-spektrometrisch (356 nm) verfolgt (siehe Arbeitsvorschrift). Mit 0.005 M Cyclosporin A **1** ergeben sich für die Alkalimetall- und Erdalkalimetall-Ionen die in Abbildung 1a und 1b gezeigten Wanderungsgeschwindigkeiten. In beiden Fällen folgen diese Geschwindigkeiten der Hofmeister- oder auch lyotropen Reihe (größerer Ionenradius – kleinere Hydratationsenthalpie – größere Trans-

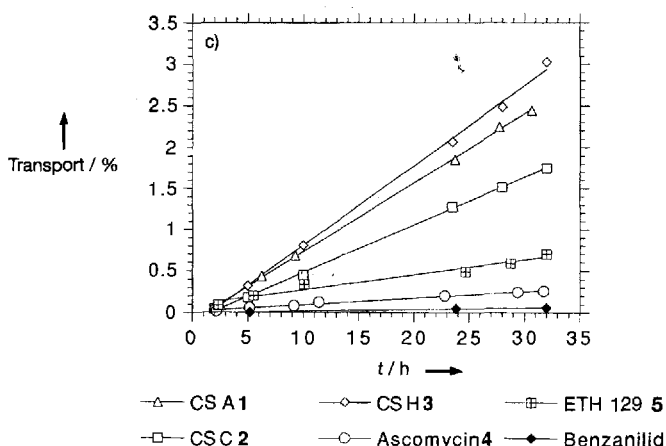
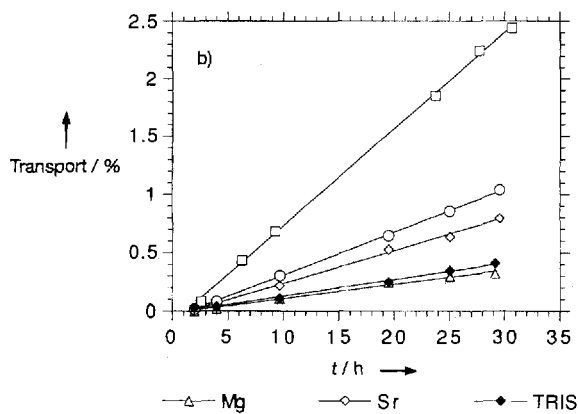
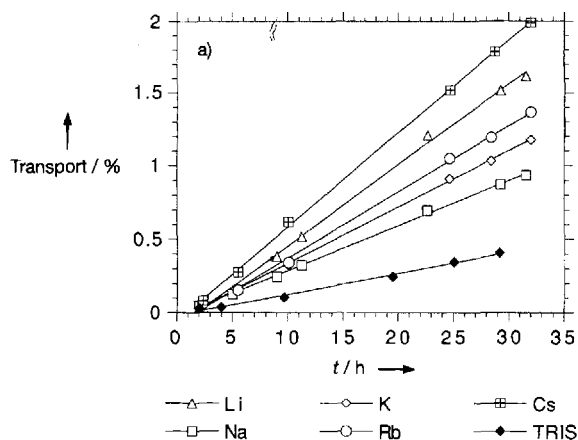


Abb. 1. Wanderungsgeschwindigkeiten von Alkalimetall- und Erdalkalimetallpikraten durch eine  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Flüssigmembran (siehe Arbeitsvorschrift). Im Kontrollversuch (TRIS) wurden der Donorlösung keine Metallchloride zugesetzt. a) Transport der Alkalimetall-Ionen mit Cyclosporin A **1** als Ionophor. b) Transport der Erdalkalimetall-Ionen mit Cyclosporin A **1** als Ionophor. c) Transport von Calcium-Ionen mit den Cyclosporinen (CS) A **1**, C **2**, H **3** sowie Ascomycin **4** und dem ETH-Ligand **5** als Ionophor. Als Referenzverbindung wurde auch Benzanilid untersucht, wobei die gleiche Menge Amidgruppen wie in den Experimenten mit den Cyclosporinen eingesetzt wurde.

[\*] Prof. Dr. D. Seebach, Dr. H. M. Bürger  
Laboratorium für Organische Chemie der  
Eidgenössischen Technischen Hochschule  
ETH-Zentrum, Universitätsstrasse 16, CH-8092 Zürich (Schweiz)  
Telefax: Int. +1/262-0529

[\*\*] Teil der Doktorarbeit von H. M. Bürger, Dissertation Nr. 10436, ETH Zürich, 1993.

Tabelle 1. Vergleich der Transportgeschwindigkeiten  $v$  von Alkalimetall- und Erdalkalimetallpikraten mit Cyclosporin A **1** als Ionophor. Die Fehler in den Transportgeschwindigkeiten betragen etwa  $\pm 10\%$ .  $c$  = Konzentration.

Metall-Ion	$c$ [mM]	$v$ [a]	Metall-Ion	$c$ [mM]	$v$ [a]
Li <sup>+</sup>	5	5.5	Ca <sup>2+</sup>	1	2.5
Na <sup>+</sup>	5	3.1		5	8.4
K <sup>+</sup>	5	3.8		50	39.4
Rb <sup>+</sup>	5	4.5	Sr <sup>2+</sup>	5	2.8
Cs <sup>+</sup>	5	6.4	Ba <sup>2+</sup>	5	3.7
Mg <sup>2+</sup>	5	1.2	(TRIS)	5	1.4

[a] % transportiert in 100 h.

portgeschwindigkeit)<sup>[13]</sup> – mit zwei überraschenden Ausnahmen: erstens wandert Li<sup>+</sup> schneller als Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Rb<sup>+</sup> und zweitens Ca<sup>2+</sup> schneller als alle anderen Erdalkalimetall-Ionen, und die Geschwindigkeit liegt sogar sehr deutlich über der von Ba<sup>2+</sup>! Aus Tabelle 1 geht hervor, daß der Ca<sup>2+</sup>-Transport durch Cyclosporin A stark konzentrationsabhängig ist<sup>[14]</sup>. Wie die physiologische Wirkung<sup>[15]</sup> hängt auch der Ca<sup>2+</sup>-Ionen-transport durch die organische Phase deutlich von der Art der Substituenten des Cyclosporins ab: Der Vergleich der Verbindungen **1**–**5** in Abbildung 1c zeigt, daß Cyclosporin H **3** etwas effizienter und Cyclosporin C **2** deutlich langsamer<sup>[16]</sup> transportiert als Cyclosporin A **1** (die immunsuppressive Wirkungsreihe ist: **1**  $\geq$  **2**  $\gg$  **3**).<sup>[15]</sup> Aus Abbildung 1c ist auch ersichtlich, daß Ascomycin **4** und der ETH-Ligand **5**<sup>[17]</sup> unter diesen Bedingungen viel weniger effiziente Ca<sup>2+</sup>-Transporter sind.

Folgende Kommentare zum Li<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-spezifischen Ionentransport erscheinen uns angebracht: a) Obwohl die Immunsuppressiva **1**–**4** alle die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in den T-Zellen beeinflussen<sup>[2]</sup>, zeigen nur die Cyclosporine **1**–**3** in unseren Experimenten ionophore Eigenschaften. b) An der Kaskade der Immunreaktion sind die Ca<sup>2+</sup>-bindende Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin und der ubiquitäre Ca<sup>2+</sup>-Modulator Calmodulin beteiligt<sup>[1–3, 18]</sup>. c) Die hier beschriebenen Befunde lassen die Rolle des Cyclosporins bei der Immunsuppression in einem neuen Licht erscheinen und dürfen als Anregung für neuartige biochemische, physiologische und medizinische Untersuchungen dienen<sup>[19]</sup>.

### Arbeitsvorschrift

Die Transportexperimente wurden wie bereits für die Poly(3-hydroxybuttersäure)-Derivate beschrieben [12] durchgeführt (siehe auch [11]). Die Donorlösungen waren 0.101 M an Alkalimetallchlorid und 1 mM an Pikrinsäure oder 0.101 M an Erdalkalimetallchlorid und 2 mM an Pikrinsäure in einem 0.1 M TRIS/HCl-Puffer (pH 8.1). Als Acceptorlösung diente die reine Pufferlösung. Zur Untersuchung des Transportverhaltens wurden 15 mL einer CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Lösung (0.005 M) der Verbindungen **1**–**5** in einem Quarzglas-U-Rohr (Durchmesser 15 mm) vorgelegt und in einem Schenkel mit 7.5 mL der Donor- und im anderen mit 7.5 mL der Acceptorlösung überlagert. Die organische Phase wurde mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt (ca. 200 Upm) und der Verlauf des Transports UV-spektrometrisch durch Messung des gewanderten Pikrates ( $\lambda_{\text{max}}$  356 nm) verfolgt.

Eingegangen am 20. August 1993 [Z 6305]

- [5] D. Seebach, S. Y. Ko, H. Kessler, M. Köck, M. Reggeli, P. Schmieder, M. D. Walkinshaw, J. J. Bülsterli, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1953, zit. Lit.
- [6] C. Spitzfaden, H. P. Weber, W. Braun, J. Kallen, G. Wider, H. Widmer, M. D. Walkinshaw, K. Wüthrich, *FEBS Lett.* **1992**, *300*, 291.
- [7] G. Pfügl, J. Kallen, T. Schirmer, J. N. Janssonius, M. G. M. Zurini, M. D. Walkinshaw, *Nature* **1993**, *361*, 91.
- [8] H. Kessler, M. Gehrke, J. Lautz, M. Köck, D. Seebach, A. Thaler, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 169, Erratum, S. 2185.
- [9] D. Seebach, H. G. Bossler, R. Flowers, E. M. Arnett, *Helv. Chim. Acta*, im Druck.
- [10] M. Köck, H. Kessler, D. Seebach, A. Thaler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2676.
- [11] H.-M. Müller, D. Seebach, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 483; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 477.
- [12] H. M. Bürger, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2570.
- [13] S. G. A. McLaughlin, G. Szabo, S. Ciani, G. Eisenman, *J. Membr. Biol.* **1972**, *9*, 3; F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, *24*, 247.
- [14] R. M. Izatt, G. A. Clark, J. S. Bradshaw, J. D. Lamb, J. J. Christensen, *Sep. Purif. Methods* **1986**, *15*, 21.
- [15] A. von Wartburg, R. Traber, *Prog. Med. Chem.* **1988**, *25*, 1; R. M. Wenger, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 88; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 77.
- [16] Überraschenderweise transportiert **2** trotz seiner zusätzlichen Hydroxygruppe in der Seitenkette der Aminosäure Nr. 2 langsamer als das lipophile **1**.
- [17] Der Ca-Ionophor ETH 129 **5** ist ein starker Komplexbildner für Ca (E. Bakker, M. Willer, M. Lerchi, K. Seiler, E. Pretsch, *Anal. Chem.* **1994**, *66* (4), im Druck. Starke Komplexbildner sind für Transportexperimente wenig geeignet, da die Freisetzung in die Empfängerphase langsam ist und die gesamte Transportgeschwindigkeit bestimmen kann (M. Kirch, J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 542; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 555). In einem getrennten Extraktionsexperiment mit gleichen Volumina der beschriebenen Lösungen (CaCl<sub>2</sub> + Pikrinsäure in Puffer sowie **5** in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Pikrat nahezu vollständig in die organische Phase extrahiert, ein Effekt, der bei den Immunsuppressiva **1**–**4** nicht beobachtet wurde.
- [18] Bezüglich der gefundenen Li<sup>+</sup>-Selektivität der Wechselwirkung [9] von Cyclosporin **1** in der Reihe der Alkalimetall-Ionen ist es interessant darauf hinzuweisen, daß der Effekt von Li<sup>+</sup> bei der Behandlung von Depressionen mit der Hemmung einer Mg<sup>2+</sup>-abhängigen Inosit-Phosphatase im Neurotransmitter-System zusammenhängt: A. J. Wood, G. M. Goodwin, *Psychol. Med.* **1987**, *17*, 579.
- [19] Die Verwendung von Cyclosporinen in ionensensitiven Elektroden wird momentan von Prof. E. Pretsch, Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich, untersucht. Selektivitäten von bestimmten cyclischen Octa- und Dodecapeptiden für Mg-Ionen wurden schon vor längerer Zeit von dieser Arbeitsgruppe gefunden (F. Behm, D. Ammann, W. Simon, K. Brunfeldt, J. Halström, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 110). Synthetische Li-selektive Ionophore für den Einsatz in ionensensitiven Elektroden wurden von dieser (E. Metzger, D. Ammann, R. Asper, W. Simon, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 132; E. Metzger, R. Aeschmann, M. Egli, G. Suter, R. Dohner, D. Ammann, M. Dobler, W. Simon, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 1821) und auch anderen Arbeitsgruppen untersucht (R. Katakya, P. E. Nicholson, D. Parker, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 321; R. Katakya, P. E. Nicholson, D. Parker, A. K. Covington, *Analyst* **1991**, *116*, 135; M. Bocheńska, J. F. Biernat, J. S. Bradshaw, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1991**, *10*, 19).

## Enantioselektive Reaktionen im statischen Magnetfeld

Guido Zadel, Catja Eisenbraun, Gerd-Joachim Wolff und Eberhard Breitmaier\*

Als absolute asymmetrische Synthese (AAS)<sup>[1]</sup> bezeichnet man eine enantioselektive Synthese aus achiralen Edukten ohne Hilfe chiraler Reagentien. Ein Beispiel ist die Synthese von Hepta- und Octahelicen in circular polarisiertem Licht mit Enantiomerenüberschüssen bis zu 7.3%<sup>[2, 3]</sup>. Die AAS wird als Ursache für das Auftreten optischer Aktivität in der Evolution disku-

[\*] Prof. Dr. E. Breitmaier, Dr. G. Zadel, Dipl.-Chem. C. Eisenbraun Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Gerhard-Domagk-Straße 1, D-53121 Bonn  
Telefax: Int. + 228/73-5683  
Dr. G.-J. Wolff  
Bruker Analytische Meßtechnik, D-76287 Rheinstetten

- [1] J. F. Borel, F. D. Padova, J. Mason, V. Quesinaux, B. Ryffel, R. Wenger, *Pharmacol. Rev.* **1989**, *41*, 239 und folgende Artikel in Heft 3.
- [2] M. K. Rosen, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 413; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 384; S. L. Schreiber, M. W. Albers, E. J. Brown, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 412.
- [3] „Immunophilins als Drug Targets“: A. Stütz, M. A. Grassberger, K. Baumann, A. J. F. Edmunds, P. Hiestand, J. F. Meingassner, P. Nussbaumer, W. Schuler, G. Zenke in *Perspectives in Medicinal Chemistry* (Hrsg.: B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer, R. Giger), Verlag Helv. Chim. Acta, Basel/VCH, Weinheim, **1993**, Kap. 27, S. 427.
- [4] „Investigations of peptides by two-dimensional NMR spectroscopy – The conformation of cyclosporin A in solution“: H. Kessler, H. R. Loosli, H. Oschkinat in *Peptides* (Hrsg.: U. Ragnarsson), Almquist & Wiksell International, Stockholm, **1984**, S. 65.