

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Synthese des
antimykotisch aktiven Steroid-Alkaloids**

Plakinamin B

***Azasteroide als Inhibitoren der Sterol-
C-24-Methyltransferase***

von

Markus Gans

aus

Blankenburg

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §12 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 5. März 1981 von Prof. Dr. F. Bracher betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 13.08.2003

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Gans', written over a horizontal line.

(Markus Gans)

Dissertation eingereicht am

08.09.2003

1. Gutachter:

Prof. Dr. F. Bracher

2. Gutachter:

Prof. Dr. E. Reimann

Mündliche Prüfung am

02.10.2003

Danksagung

Für die Betreuung dieser Arbeit möchte ich
Prof. Dr. F. Bracher herzlich danken.

Prof. Dr. E. Reimann danke ich für die freundliche
Übernahme des Korreferats.

Ferner danke ich

Dr. H. Lerche und der Analytischen Abteilung für die Anfertigung der
NMR- und Massenspektren,
H. Schulz und G. Käser für die Durchführung der CHN-Analysen,
sowie J. Müller, E. Armbrust und C. Hantelmann für das SBI-Screening;

meinen Kollegen und Freunden im Arbeitskreis
Dr. H.J. Krauss, F. Dombeck, O. Kast, F. Lirk, K. Huber und M. Baltrusch
für gute Zusammenarbeit und das optimale Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt Miriam und Eva, sowie meinen Eltern für
ihre stetige Begleitung und Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Die Ergosterolbiosynthese	2
1.1.1	Der Prä-Squalen-Abschnitt	4
1.1.2	Der Post-Squalen-Abschnitt	7
1.2	Angriffspunkte bekannter Sterolbiosyntheseinhibitoren	14
1.2.1	Allylamine	15
1.2.2	Azole	16
1.2.3	Morpholine	17
1.2.4	Weitere Inhibitoren der Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase und Sterol- Δ^{14} -Reduktase	20
1.2.5	Inhibitoren der Sterol-C-24-Methyltransferase (SMT) und Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase	21
1.3	Plakinamin B - ein Steroid-Alkaloid aus dem Meer	22
2	Themenstellung und Syntheseplanung	24
2.1	Themenstellung	24
2.2	Synthesestrategie	24
3	Synthesen	29
3.1	Steroidgrundgerüst	29
3.1.1	Hydrierung	29
3.1.2	Ozonolyse	30
3.2	Aufbau der Seitenkette	32
3.2.1	Synthese von (3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Acetoxy-20-(2-phenyl-(<i>E</i>)-ethenyl)-pregn-7-en (20)	33

3.2.2	Synthese von (3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Acetoxy-20-[3-(<i>N,N</i> -dimethylamino)-(Z)-prop-1-enyl]-pregn-7-en (23).....	34
3.2.3	Synthese von (3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Acetoxy-20-[4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)-(Z)-but-1-enyl]-pregn-7-en (26).....	36
3.2.4	Synthese von (3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Acetoxy-20-[2-(3-methylpyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en (12)	38
3.2.5	Synthese von (3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-3-hydroxypregn-7-en (15).....	43
3.3	Substitution und Inversion der Stereochemie in Position 3.....	45
3.3.1	Synthese von 3 α -Methylaminoergosta-7,22 <i>E</i> -dien (52)	45
3.3.2	Versuch der Synthese von (3 <i>R</i> ,20 <i>R</i>)- <i>N</i> -{20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en-3-yl]- <i>N</i> -methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid (53).....	49
3.3.3	Synthese von (3 <i>R</i> ,20 <i>R</i>)- <i>N</i> -{20-[2-(3-Methylpyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en-3-yl]- <i>N</i> -methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid (54)	50
3.3.4	Synthese von (3 <i>R</i> ,20 <i>R</i>)-20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-3-methylaminopregn-7-en (<i>Plakinamin B</i>) (17)	51
4	Biologische Testung	53
4.1	Agar-Diffusionstest.....	53
4.1.1	Testergebnisse.....	55
4.2	SBI-Screening.....	58
4.2.1	Testergebnisse.....	60
5	Zusammenfassung.....	63
6	Experimenteller Teil	67
6.1	Allgemeine Angaben.....	67
6.2	Nomenklatur	68
6.3	Beschreibung der Substanzen.....	69

5,6-Dihydroergosterol (3)	69
5,6-Dihydroergosterylacetat (4).....	71
(3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-3-Acetoxypregn-7-en-20-carbaldehyd (5)	73
4-Hydroxymethyl-3-methylpyridin (9)	75
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Acetoxy-20-[2-(3-methylpyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]- pregn-7-en (12)	77
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-4-[2-(3-Acetoxypregn-7-en-20-yl)-(E)-ethenyl]-1,3-dimethyl- pyridiniumiodid (13).....	79
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Acetoxy-20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)- ethenyl]-pregn-7-en (14)	81
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]- 3-hydroxypregn-7-en (15)	83
(3 <i>R</i> ,20 <i>R</i>)-20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]- 3-methylaminopregn-7-en (<i>Plakinamin B</i>) (17)	85
5,6,22,23-Tetrahydroergosterylacetat (19).....	87
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Acetoxy-20-[2-phenyl-(E)-ethenyl]-pregn-7-en (20).....	89
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Hydroxy-20-[2-phenyl-(E)-ethenyl]-pregn-7-en (21).....	91
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Acetoxy-20-[3-(<i>N,N</i> -dimethylamino)-(Z)-prop-1-enyl]- pregn-7-en (23)	93
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Hydroxy-20-[3-(<i>N,N</i> -dimethylamino)-(Z)-prop-1-enyl]- pregn-7-en (24)	95
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Acetoxy-20-[4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)-(Z)-but-1-enyl]- pregn-7-en (26)	97
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Hydroxy-20-[4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)-(Z)-but-1-enyl]- pregn-7-en (27)	99
4-Chlormethyl-3-methylpyridinhydrochlorid (29).....	101
1,3-Dimethyl-4-hydroxymethylpyridiniumiodid (32)	103
(3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-3-Acetoxy-20-[1-Hydroxy-2-(3-methylpyridin-4-yl)-ethyl]- pregn-7-en (38)	105
(3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-3-Hydroxy-20-[1-Hydroxy-2-(3-methylpyridin-4-yl)-ethyl]- pregn-7-en (39)	107
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-3-Hydroxy-20-[2-(3-methylpyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]- pregn-7-en (40)	109
(3 <i>S</i> ,20 <i>R</i>)-4-[2-(3-Hydroxypregn-7-en-20-yl)-(E)-ethenyl]-1,3-dimethyl- pyridiniumiodid (41).....	111

<i>N</i> -[(3 <i>R</i>)-Ergosta-7,22 <i>E</i> -dien-3-yl]- <i>N</i> -methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid (45).....	113
3α-Methylaminoergosta-7,22 <i>E</i> -dien (52).....	115
(3 <i>R</i> ,20 <i>R</i>)- <i>N</i> -{20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en-3-yl}- <i>N</i> -methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid (53)	117
(3 <i>R</i> ,20 <i>R</i>)- <i>N</i> -{20-[2-(3-Methylpyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en-3-yl}- <i>N</i> -methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid (54)	119
(3 <i>R</i> ,20 <i>R</i>)-4-{2-[3-(<i>N</i> -Methyl-2-nitrobenzolsulfamoyl)-pregn-7-en-20-yl]-(E)-ethenyl}-1,3-dimethylpyridiniumiodid (55)	121
6.4 Testsystem: Agar-Diffusionstest	123
6.5 Testsystem: SBI-Screening	123
6.5.1 Datenblätter der getesteten Substanzen	126
Verzeichnis der Abkürzungen	133
Literaturverzeichnis	135

1 Einführung

Systemische Pilzerkrankungen sind weltweit auf dem Vormarsch. Grund dafür ist vor allem eine Bevölkerung, in der Risikogruppen mit geschwächtem Immunsystem verstärkt vertreten sind. Insbesondere betroffen sind HIV-infizierte Personen, Senioren sowie Patienten, deren Immunsystem wegen einer Organtransplantation künstlich unterdrückt werden muß.

Man unterscheidet generell zwischen oberflächlichen, lokalisierten und generalisierten Pilzerkrankungen. Während die zuerst genannten auch bei ansonsten gesunden Patienten vorkommen, meist mehr unangenehm als gefährlich und im Allgemeinen auch gut therapierbar sind, führen lokalisierte und generalisierte Pilzerkrankungen häufig zum Tod des Erkrankten. Als „lokalisiert“ bezeichnet man Pilzerkrankungen, die den Gastrointestinaltrakt, das genitourinäre System oder die Atemwege befallen. Bei generalisierten Pilzerkrankungen sind auch innere Organe und/oder das Zentrale Nervensystem betroffen.¹

Während derzeit eine Vielzahl leistungsfähiger antibakterieller Wirkstoffe zur Verfügung stehen, gibt es kaum eine Handvoll antimykotischer Substanzen zur systemischen Therapie. Die aktuellen Standardantimykotika zeichnen sich zudem durch eine geringe therapeutische Breite aus, so daß mit schweren Nebenwirkungen gerechnet werden muß. Andere Probleme der bekannten Arzneistoffe liegen in ihrer nur fungistatischen Wirkungsweise, Resistenzentwicklung, schlechter Pharmakokinetik bzw. ungünstigen physikochemischen Eigenschaften (z.B. Photolabilität).

Es besteht somit ein dringender Bedarf an neuartigen antimykotisch wirksamen Substanzen. Ein Weg zu potenten neuen Wirkstoffen ist die Strukturvariation bekannter Substanzen bzw. die Synthese von Analoga. Weitere Möglichkeiten liegen in der Synthese und Variation von Naturstoffen, deren antimykotische Aktivität bereits bekannt ist.

Das große Problem bei der Bekämpfung von pathogenen Pilzen im menschlichen Körper ist die große Ähnlichkeit zwischen dem Metabolismus der Pilz- und der menschlichen Zelle. Dies hat zur Folge, daß die meisten Substanzen, die sich auf den ersten Blick für die Bekämpfung von Pilzen eignen könnten, auch für den menschlichen Körper giftig sind.

Da Ergosterol für das Wachstum und die Vermehrung von Pilzzellen essentiell ist, jedoch die begrenzte Hemmung der (sehr ähnlichen) Cholesterolsynthese beim Menschen kaum negative Auswirkungen hat, bietet es sich an, auf diese Achillesferse der Pilze zu zielen. Der Eingriff in die Ergosterolsynthese ist daher der klassische Wirkmechanismus der Antimykotika.

1.1 Die Ergosterolsynthese

Mit sehr wenigen Ausnahmen sind Sterole in allen eukaryontischen Organismen enthalten.² Allerdings haben Säugetiere, Pilze und Pflanzen im Laufe der Evolution verschiedene Wege im Sterolmetabolismus beschritten und nach der letzten gemeinsamen Sterolvorstufe, dem Squalen bzw. dessen Epoxid, die für ihre Klasse jeweils typischen Sterole gebildet (Abb. 1). Bei Mensch und Tier ist das Hauptsterol das Cholesterin, während das der meisten Pilze und Hefen das Ergosterin ist. Pflanzen hingegen haben einen Cocktail aus drei Sterolen anstelle eines Hauptsterols: Campesterin, Sitosterin und Stigmasterin.³

Das Ausnutzen der Unterschiede im sogenannten Post-Squalen-Abschnitt der Sterolsynthese bildet einen mächtigen Stützpunkt bei der Entwicklung von Antimykotika, denn es eröffnet die Möglichkeit, Pilzinfektionen gezielt zu behandeln, ohne dabei den Patienten zu schädigen.

Ergosterin stellt für Pilze und Hefen einen wichtigen Baustein dar. Die drei Arbeitsgruppen um *Nes*, *Bloch* und *Parks* haben übereinstimmend herausgefunden, daß Ergosterin zumindest zwei Hauptfunktionen in der Zellmembran hat:

Zum einen erfüllt Ergosterin eine wichtige Funktion in der Modulation der Membranfluidität, indem es in den Phospholipid-Bilayer der Zellwand eingebaut wird. In diesem auch als „*fluid-mosaic*“ beschriebenen Modell sorgt Ergosterin für die nötige Fluidität, um eine optimale Funktion der zahlreichen membranständigen Enzyme und der Membranpermeabilität zu gewährleisten. Zur Erfüllung dieser strukturellen Funktion werden offensichtlich große Mengen an Sterol benötigt, daher spricht man auch von einer „*bulk*“-Funktion des Ergosterins.

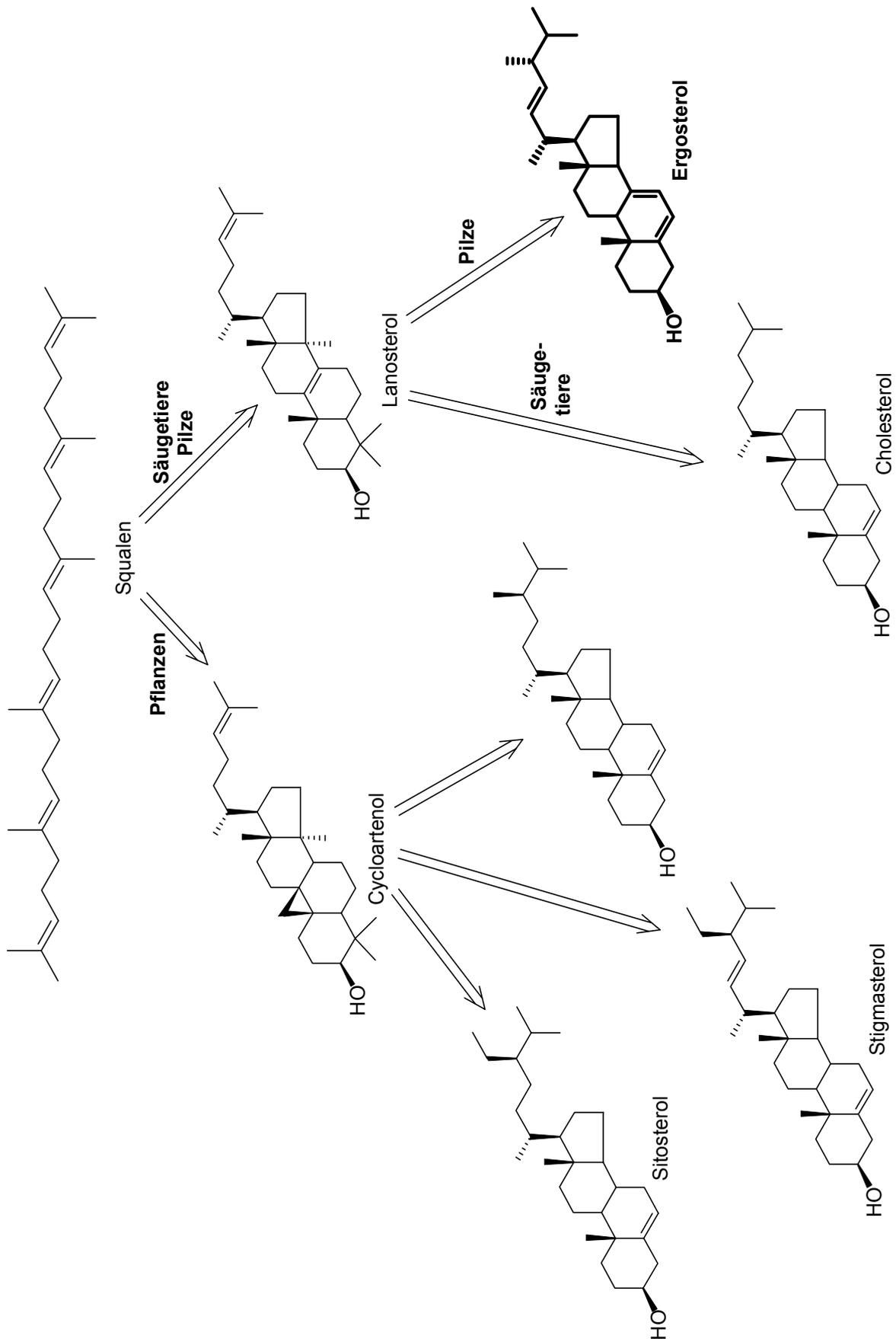


Abb. 1: Unterschiede in der Sterolbiosynthese bei Pflanzen, Säugtieren und Pilzen

Zahlreiche Untersuchungen,^{4,5,6} ob Ergosterol in dieser Funktion ersetzbar ist, zeigten, daß diese benötigte große Menge mit einer verhältnismäßig großen Strukturtoleranz einhergeht.

Beinahe jedes Sterol ist dazu in der Lage, wenn seine Struktur die nachfolgenden Bedingungen erfüllt: Demnach ist die 3 β -OH-Gruppe essentiell, die Länge der Alkylkette an C-20 soll nicht mehr als 6 C-Atome betragen und die Konfiguration an C-20 muß *R* sein. Obligatorisch ist auch das Fehlen der geminalen Methylgruppen an C-4. Wichtig jedoch ist, daß in vielen Experimenten gefunden wurde, daß Spuren von Ergosterol notwendig waren, um das Pilzwachstum überhaupt zu initiieren.

Damit wird eine zweite Aufgabe des Ergosterols als Wachstumspromotor aufgezeigt. Im Unterschied zu der genannten „*bulk*“-Funktion erfordert die hormonelle Funktion nur geringste Mengen an Sterol, allerdings mit höheren Anforderungen an die Struktur. Diese Funktion wird in der Literatur wahlweise als „*sparkling*“-Funktion,⁴ „*synergistic*“-Funktion⁷ oder „*sparing*“-Funktion⁸ bezeichnet.

Über die genauen Aufgaben des Ergosterols im Wachstumsprozeß des Pilzes ist noch nicht viel bekannt, es sind jedoch einige Vorschläge gemacht worden,⁹ die im Zusammenhang mit dem Wachstum stehen: Ergosterol könnte das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren kontrollieren, ebenso wie die Umwandlung von Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin, es könnte den Polyphosphoinositolmetabolismus anregen oder eine Proteinkinase, die eine Kontrollfunktion im Zellzyklus wahrnimmt.

Die Biosynthese von Ergosterol läßt sich in einen Prä- und einen Post-Squalen-Abschnitt unterteilen. Der Prä-Squalen-Abschnitt verläuft ausgehend von Acetyl-CoA über Squalen zu Squalenepoxid. Daran anschließend wird im Post-Squalen-Abschnitt nach der Cyclisierung zu Lanosterol über acht Zwischenstufen schließlich Ergosterol gebildet.^{3,10}

1.1.1 Der Prä-Squalen-Abschnitt

Drei Einheiten Acetyl-CoA kondensieren unter Beteiligung der Thiokinase (a) und der Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase (b) zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-

CoA), das durch die HMG-CoA-Reduktase (c) zu Mevalonat reduziert wird. Dieses Enzym stellt das erste Schlüsselenzym zur Regulation der Sterolbiosynthese in Pflanzen, Pilzen und Säugetieren dar.

Aus Mevalonsäure entsteht nach doppelter Phosphorylierung durch die Mevalonatkinase (d) und Mevalonatphosphatkinase (e) und Abspaltung der Carboxylgruppe mit Hilfe der Mevalonatsdiphosphatdecarboxylase (f) der eigentliche Isoprenbaustein, das „aktive Isopren“ Isopentenylidiphosphat (IPP).

Dieses steht vermittelt durch die IPP-DMAPP-Isomerase (g) im Gleichgewicht mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) (Abb. 2).

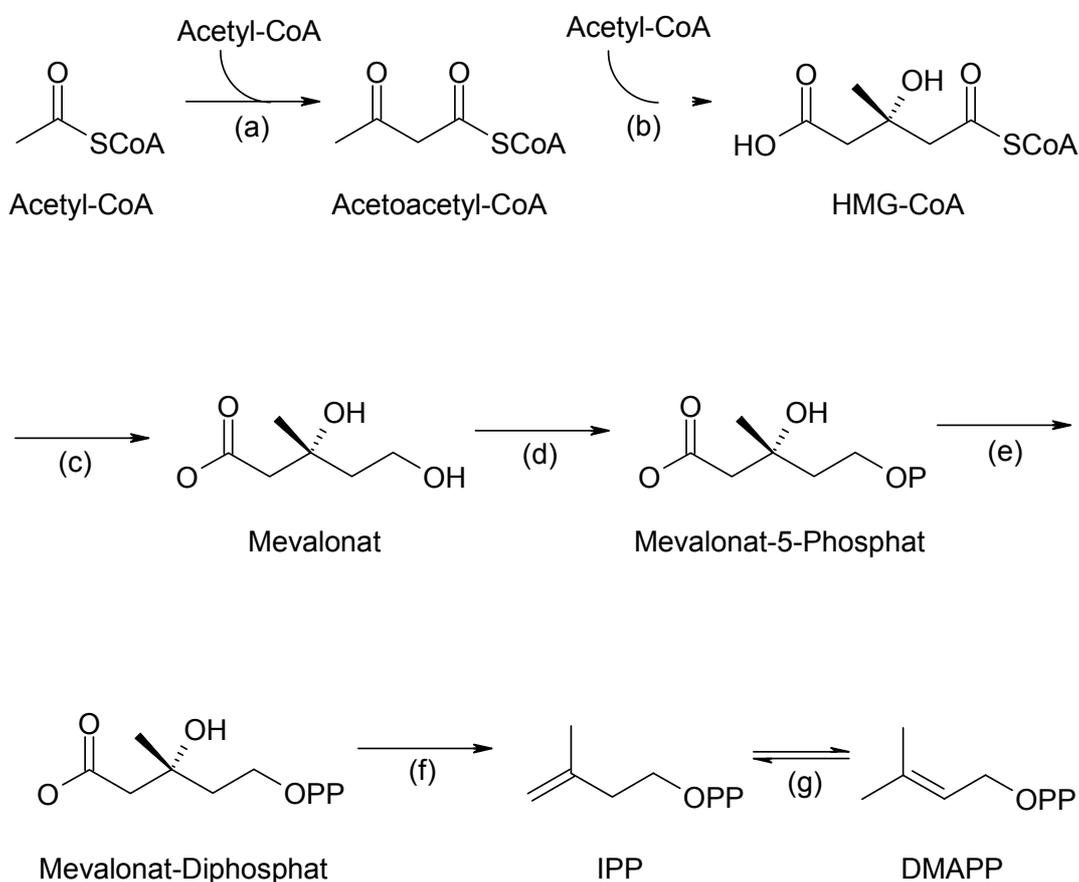


Abb. 2: Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IPP)

Ein Molekül IPP reagiert unter Verlust von Diphosphat mit dem isomeren DMAPP zu Geranyldiphosphat (GPP), einem Monoterpen. Nach Addition eines weiteren IPP

entsteht das Sesquiterpen Farnesyldiphosphat (FPP). Beide Reaktionen, (h) und (i), katalysiert die Isoprenyltransferase (Abb. 3).

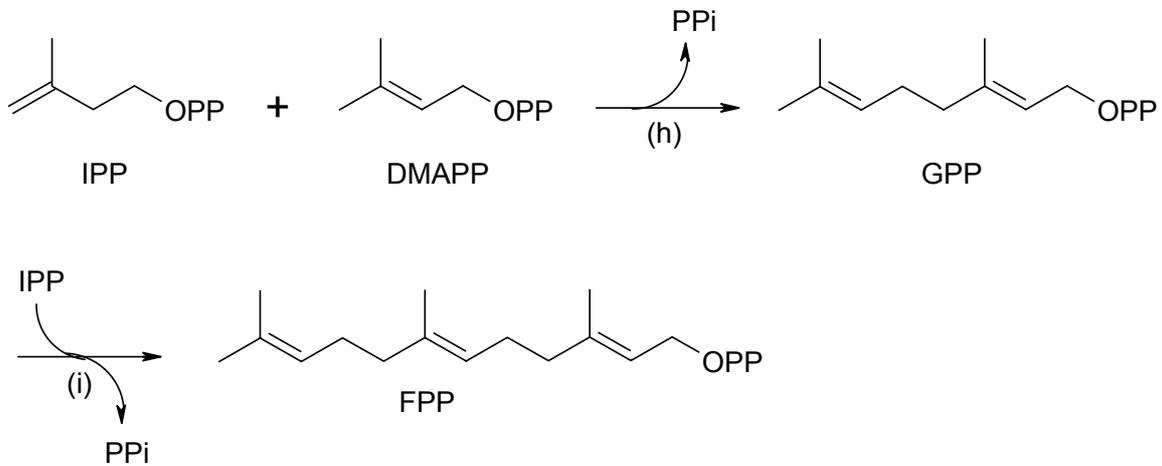
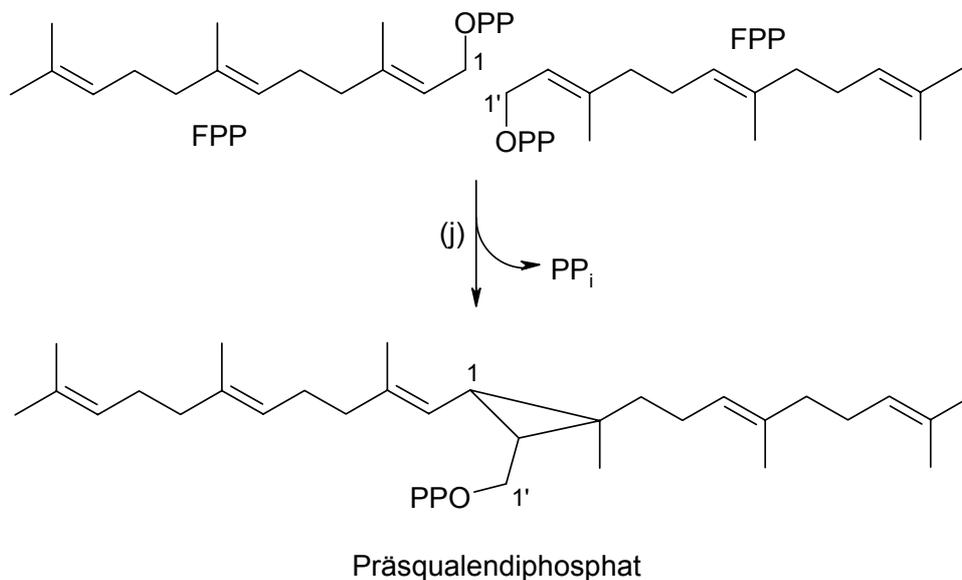


Abb. 3: Biosynthese von Farnesyldiphosphat (FPP)

Durch Verknüpfung von zwei dieser C_{15} -Einheiten entsteht in einer „Kopf-an-Kopf-Kupplung“ das Triterpen Squalen. Die Squalensynthese (j) katalysiert unter Abspaltung von Diphosphat die Kupplung von zwei Molekülen FPP zu Präsqalendiphosphat. Nach Eliminierung eines zweiten Äquivalents Diphosphat wird dieses zu einem Cyclobutyl-Kation umgelagert³ (nicht gezeigt), welches unter Verbrauch von NADPH zu Squalen reduziert wird (Abb. 4).



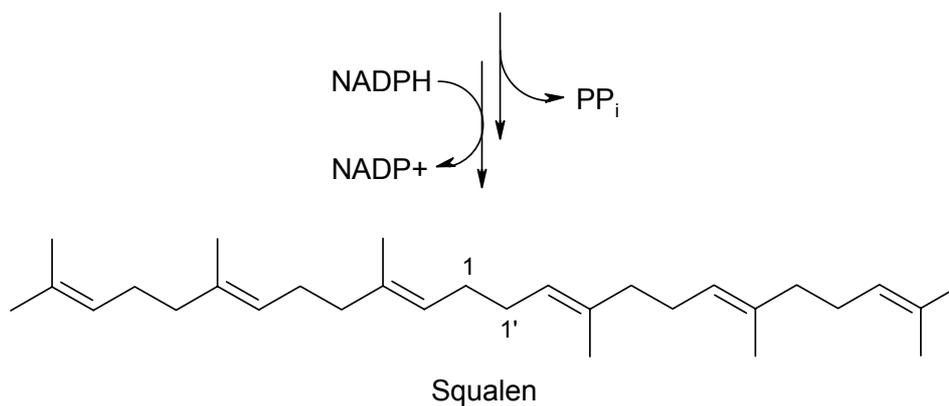


Abb. 4: Biosynthese von Squalen

1.1.2 Der Post-Squalen-Abschnitt

Abb. 6 zeigt die Ergosterolbiosynthese im Post-Squalen-Abschnitt am Beispiel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die Sterolbiosynthesewege der meisten eukaryontischen Organismen zwar beschrieben sind, es sich jedoch teilweise um Postulate handelt, für deren Richtigkeit noch keine ausreichenden Beweise vorliegen. Darüber hinaus ist zwar das Biosyntheseprinzip immer gleich, allerdings zeigen sich Unterschiede in den Details. Somit sollten die Mechanismen und vor allem die postulierte Reihenfolge der einzelnen Biosyntheseschritte nicht vorbehaltlos auf andere Organismen übertragen werden. Zum besseren Verständnis der „Ortsangaben“ am Sterolgerüst wird nachfolgend Ergosterol entsprechend des Nummerierungsvorschlages der IUPAC sowie die übliche Benennung der Ringe dargestellt.

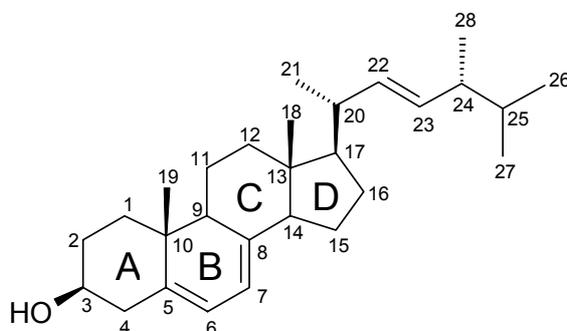


Abb. 5: Nummerierung von Ergosterol

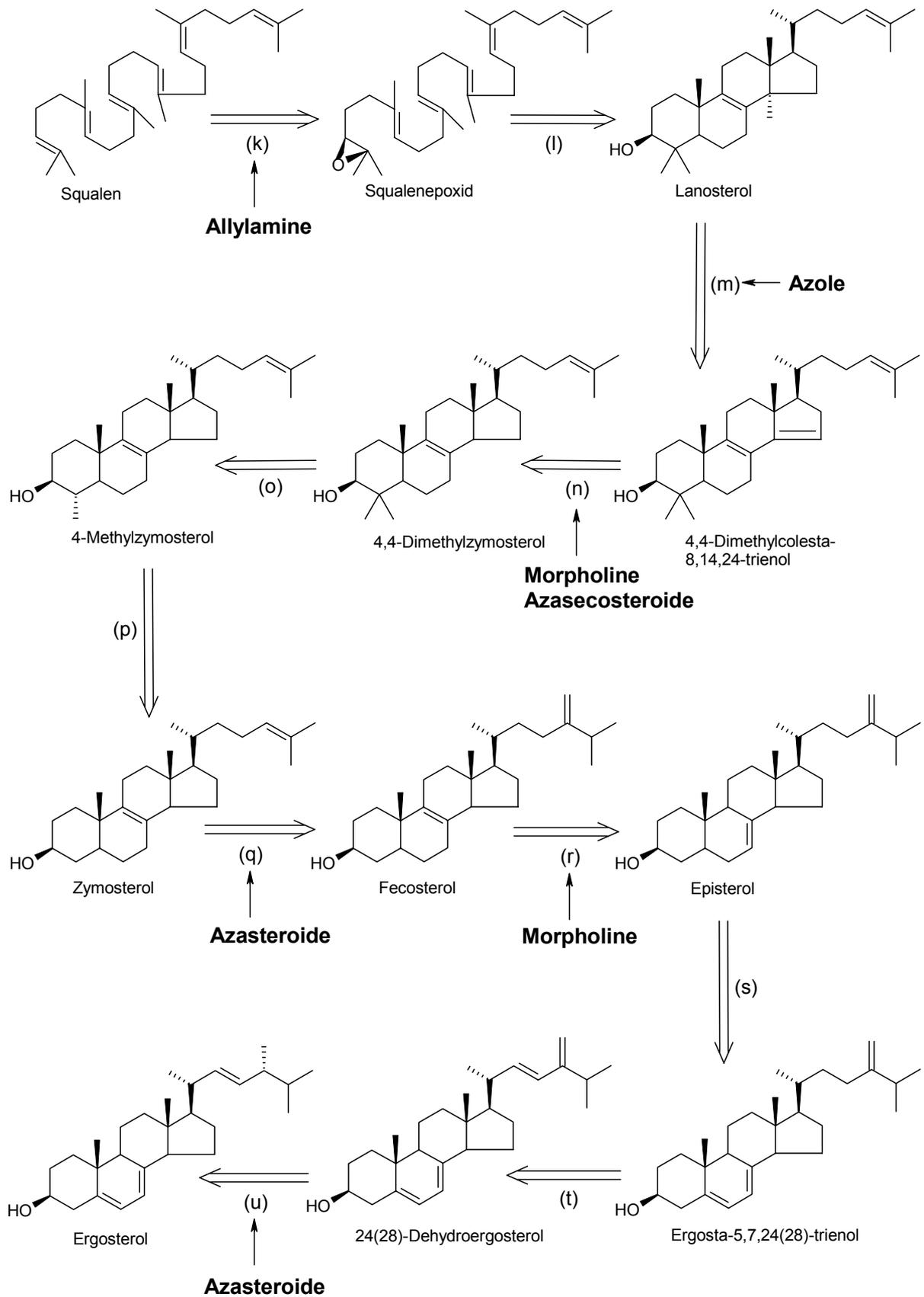


Abb. 6: Ergosterolbiosynthese bei *Saccharomyces cerevisiae* und Angriffspunkte von Sterolbiosynthese-Inhibitoren (SBI's)

Die nachfolgende Übersicht faßt die Reaktionsschritte und die beteiligten Enzyme zusammen:

	Reaktionsschritt	Enzym(-system)
(k)	Oxidation von Squalen zu 2,3-Squalenepoxid	Squalenepoxidase
(l)	Cyclisierung von Squalenepoxid zu Lanosterol	Squalenepoxidcyclase
(m)	Demethylierung an C-14 von Lanosterol	CytochromP ₄₅₀ -Sterol-C-14-Demethylase
(n)	Reduktion der Δ^{14} -Doppelbindung zu Dimethylzymosterol	Sterol- Δ^{14} -Reduktase
(o)	Abspaltung der 4 α -Methylgruppe zu Methylzymosterol und Konversion von 4 β -Methyl zu 4 α -Methyl	Sterol-C-4-Demethylase-Komplex → Sterol-C-4-Methyl-Mono-Oxygenase → Sterol-C-4-Decarboxylase → Sterol-3-Keto-Reduktase
(p)	Abspaltung der 4 α -Methylgruppe zu Zymosterol	Sterol-C-4-Demethylase-Komplex → Sterol-C-4-Methyl-Mono-Oxygenase → Sterol-C-4-Decarboxylase → Sterol-3-Keto-Reduktase
(q)	Methylierung an C-24 zu Fecosterol	Sterol-C-24-Methyltransferase (SMT)
(r)	Isomerisierung der Δ^8 -Doppelbindung zu Episterol (Δ^7)	Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase
(s)	Einführung der Δ^5 -Doppelbindung zu Ergosta-5,7,24(28)-trienol	„Sterol-C-5-Desaturase“ → Sterol-C-6(5)-Hydroxylase → 6(5) α -Hydroxysterol-Dehydratase
(t)	Einführung der Δ^{22} -Doppelbindung zu 24(28)-Dehydroergosterol	CytochromP ₄₅₀ -Sterol-C-22-Desaturase
(u)	Reduktion der $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung zu Ergosterol	Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

Tabelle 1: Übersicht über die an der Ergosterolbiosynthese beteiligten Enzyme

1.1.2.1 Sterol- Δ^{14} -Reduktase

Diese membranständige Oxidoreduktase katalysiert die Reduktion der von der CytochromP₄₅₀-Sterol-C-14-Demethylase eingeführten Doppelbindung. In Hefen ist das bevorzugte Substrat 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol. Als Reduktionsmittel dient NADPH. Nach enzymvermittelter Protonenübertragung aus dem Wasser des Mediums an C-15 wird ein Hydridäquivalent auf das intermediär auftretende *High Energy Intermediate (HEI)* an C-14 übertragen.

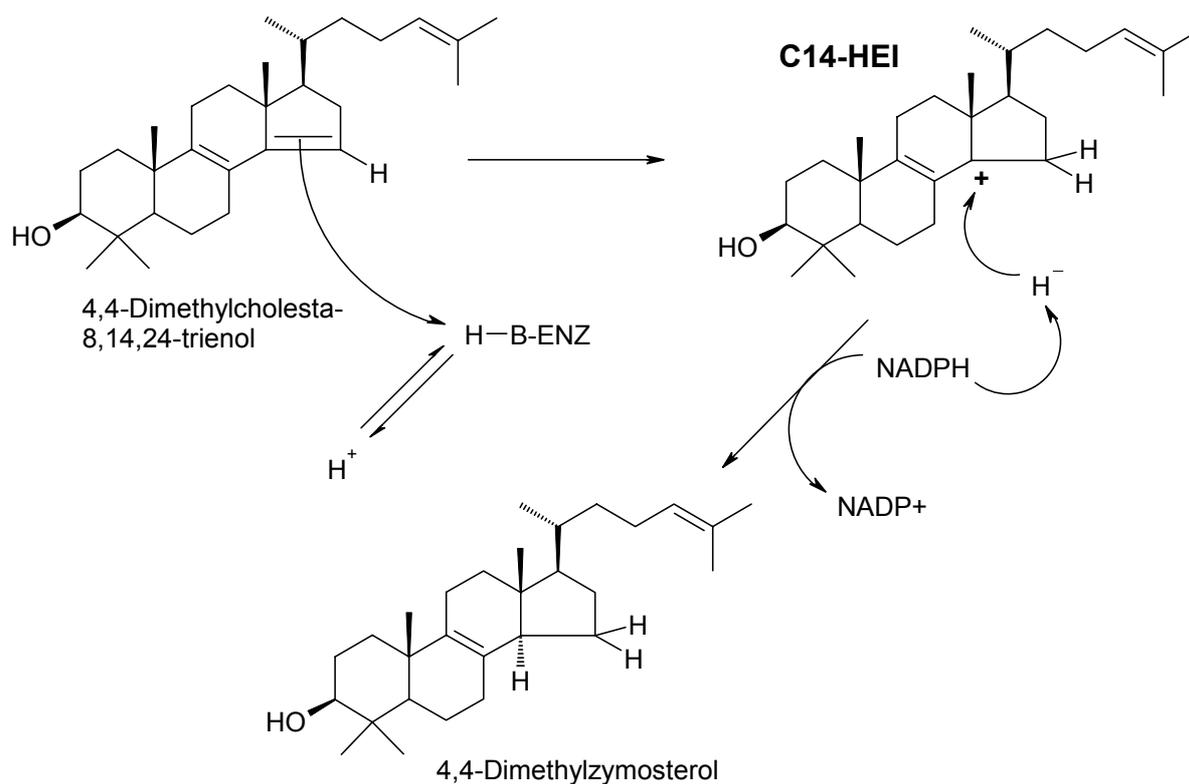


Abb. 7: Mechanismus der Reduktion durch die Sterol- Δ^{14} -Reduktase

1.1.2.2 Sterol-C-24-Methyltransferase (SMT)

Das bei Hefen bevorzugte Substrat der SMT ist Zymosterol.¹¹ Damit unterscheidet sich hier der Ergosterolbiosyntheseweg von dem der Pilze, wo meist Lanosterol als Substrat dient.³ Im tierischen Organismus fehlt dieses Enzym, welches im Endoplasmatischen Reticulum, in Lipidtröpfchen und als integrales Membranprotein anzutreffen ist, völlig.^{12,13}

Dieser wesentliche Unterschied im Stoffwechsel von Pathogen und Wirt könnte ein attraktives Target für die Entwicklung neuer Antimykotika eröffnen.

Das methylübertragende Agens ist hierbei S-Adenosyl-L-methionin, welches unter Abspaltung von Triphosphat aus ATP und Methionin gebildet wird.

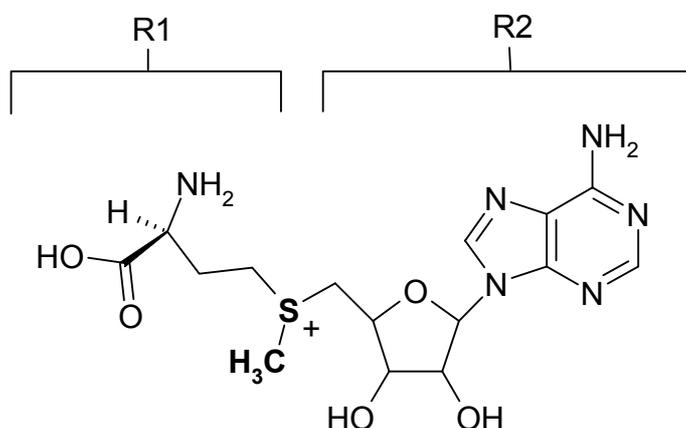


Abb. 8: S-Adenosyl-L-methionin (SAM)

Über den genauen enzymatischen Mechanismus besteht noch keine völlige Klarheit.¹³

Beispielsweise ist noch nicht geklärt, ob die Methylierung in einem zweistufigen Prozeß abläuft (a) und dabei zwei carbokationische HEI's an C-25 bzw. C-24 erzeugt werden, oder ob nach einer konzertierten Additions-Umlagerungs-Aktion nur ein cyclischer Übergangszustand (b) existiert (Abb. 9).

Auch wird noch darüber debattiert, welche Auswirkungen damit für die räumliche Lage des Protonenakzeptors im Enzym einhergehen, oder ob es sogar zwei basische Stellen im aktiven Zentrum gibt, wobei die zweite Base das C-25-HEI durch intermediäre kovalente Bindung stabilisiert („X-group mechanism“), was den Weg a) untermauern würde.

Eine ebenfalls diskutierte Überlegung ist das sogenannte *steric-electric plug model*¹⁴, nach welchem eine zweite Base die Verankerung des Zymosterols im Enzym-Substrat-Komplex durch H-Brückenbindungen mit der 3 β -OH-Gruppe des Sterols unterstützt. In dieser Variante wird ein Methylierungsmechanismus nach b) favorisiert.

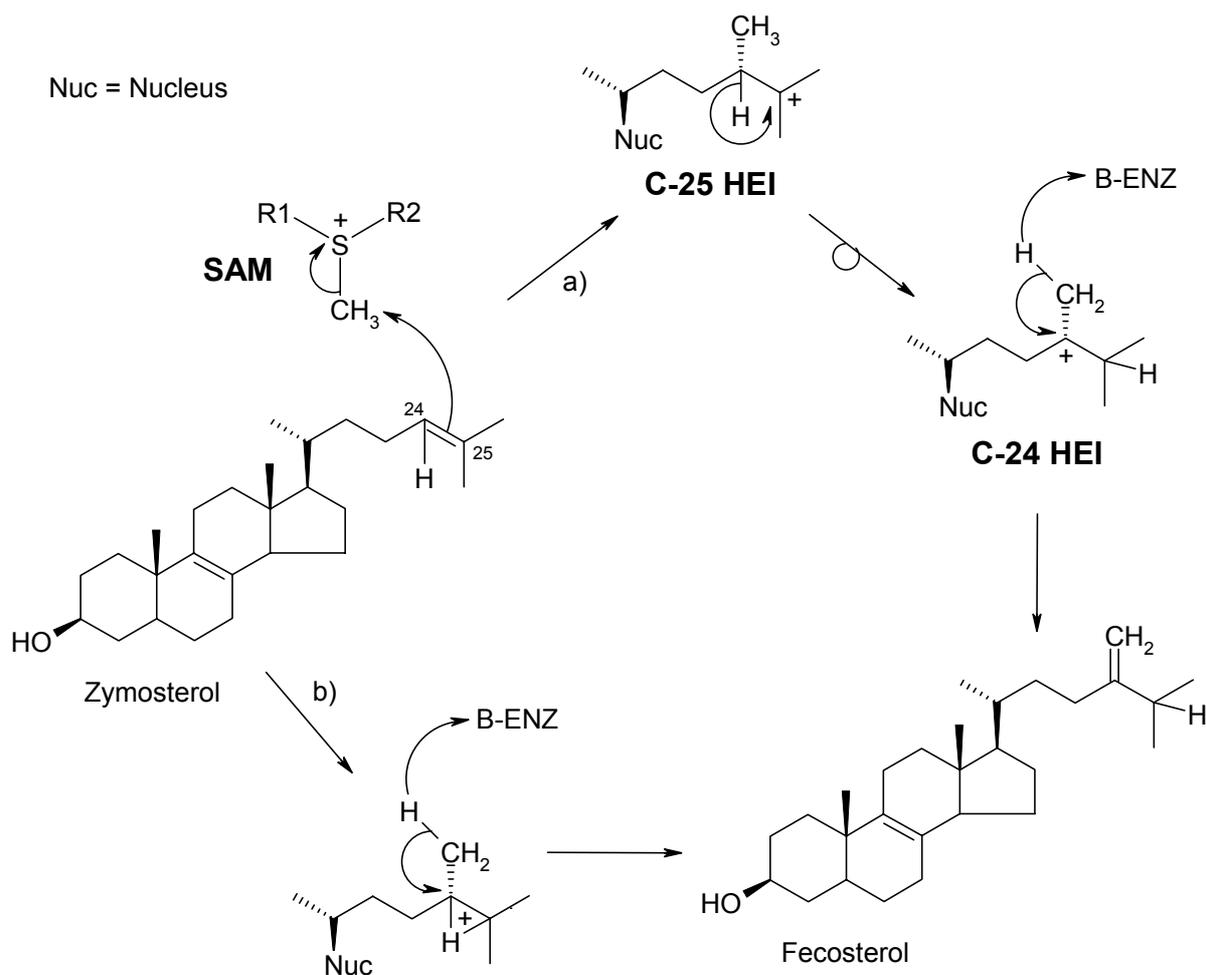


Abb. 9: SAM und Sterol-C-24-Methyltransferase-katalysierte Methylierung von Zymosterol

Dieser Reaktionsschritt erzeugt das erste Sterol der „Ergostan-Reihe“, Fecosterol (= *Ergosta-8,24(28)*-dienol). Im Unterschied zur „Lanostan-Reihe“ mit den Attributen Dimethylierung an C-4, sowie C-14-Methylierung und dem einzigen Vertreter Lanosterol, sowie der „Cholestan-Reihe“, weist die „Ergostan-Reihe“ eine C-24-Methylen- oder C-24 β -Methylgruppe auf. Im Vergleich dazu wird in der Pflanzenwelt, wo Cycloartenol (Abb. 1) als Substrat der SMT dient, nach Methylierung und Reduktion ein 24 α -Methylsterol erzeugt („Campestan-Reihe“).

In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, daß die Bezeichnungen „ α “ und „ β “ als Angaben für die räumliche Orientierung im Nucleus (z.B. 3 β -OH zeigt nach *vorne*) und der Seitenkette (z.B. 24 β -CH₃ zeigt nach *hinten*) vertauscht sind! Diese eigenartige Regelung in der Benennung sollte deshalb auch eher vor einem historischen, als einem logischen Hintergrund gesehen werden.¹³

1.1.2.3 Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase

Als membranständiges Enzym ist die Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase zuständig für die Isomerisierung von Fecosterol zu Episterol, sowohl bei Hefen als auch bei Pilzen.

Hierbei wird - in Analogie zur Sterol- Δ^{14} -Reduktase-Reaktion - in einem ersten Schritt zunächst protoniert, und zwar an C-9, wobei ein enzymstabilisiertes carbokationisches C-8-HEI gebildet wird. Dieses stabilisiert sich durch 7α -H⁺-Eliminierung zu Episterol (Abb. 10).

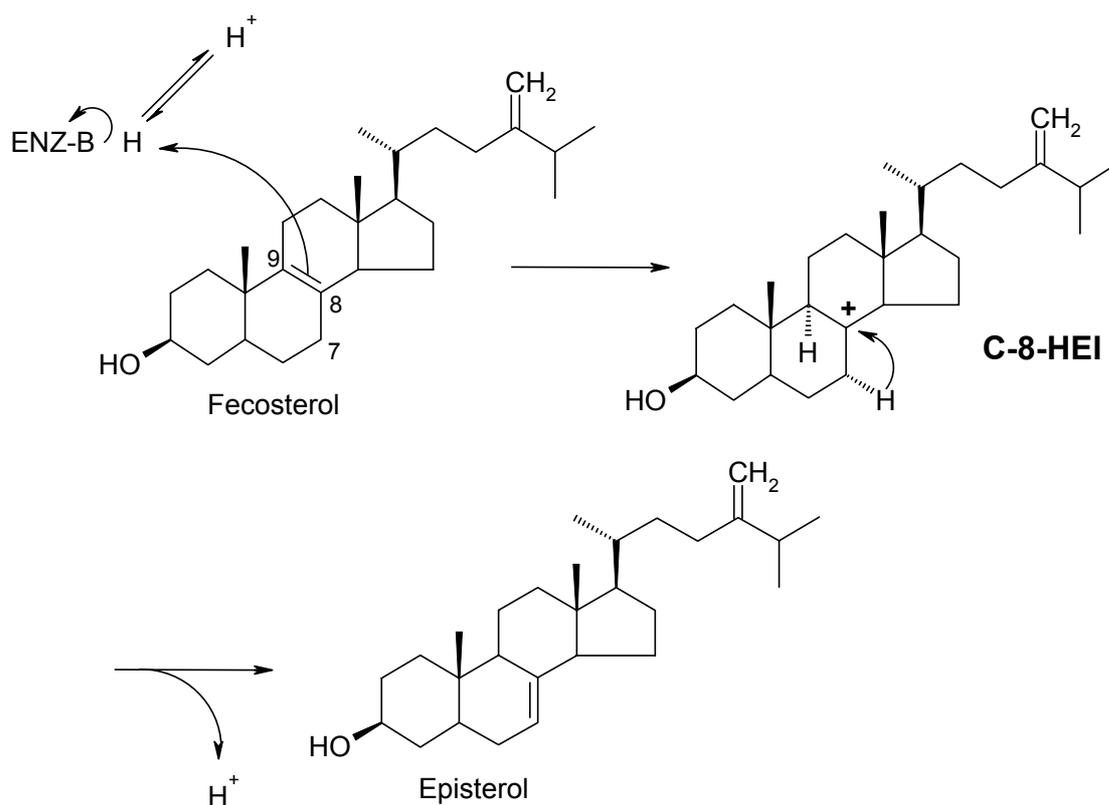


Abb. 10: Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Reaktion

1.1.2.4 Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

Der finale Schritt in der Biosynthese von Ergosterol ist die Reduktion der $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung. Da bei Säugetieren keine C-24-Methylierung stattfindet, kommt dieses Enzym nur bei Pilzen und Pflanzen vor. Diese Oxidoreduktase wurde im Endoplasmatischen Reticulum und in der Microsomenfraktion gefunden. Die

stereoselektive Reduktion zu Ergosterol erfolgt unter Verbrauch von NADPH und erzeugt eine 24 β -Methylgruppe (Abb. 11).

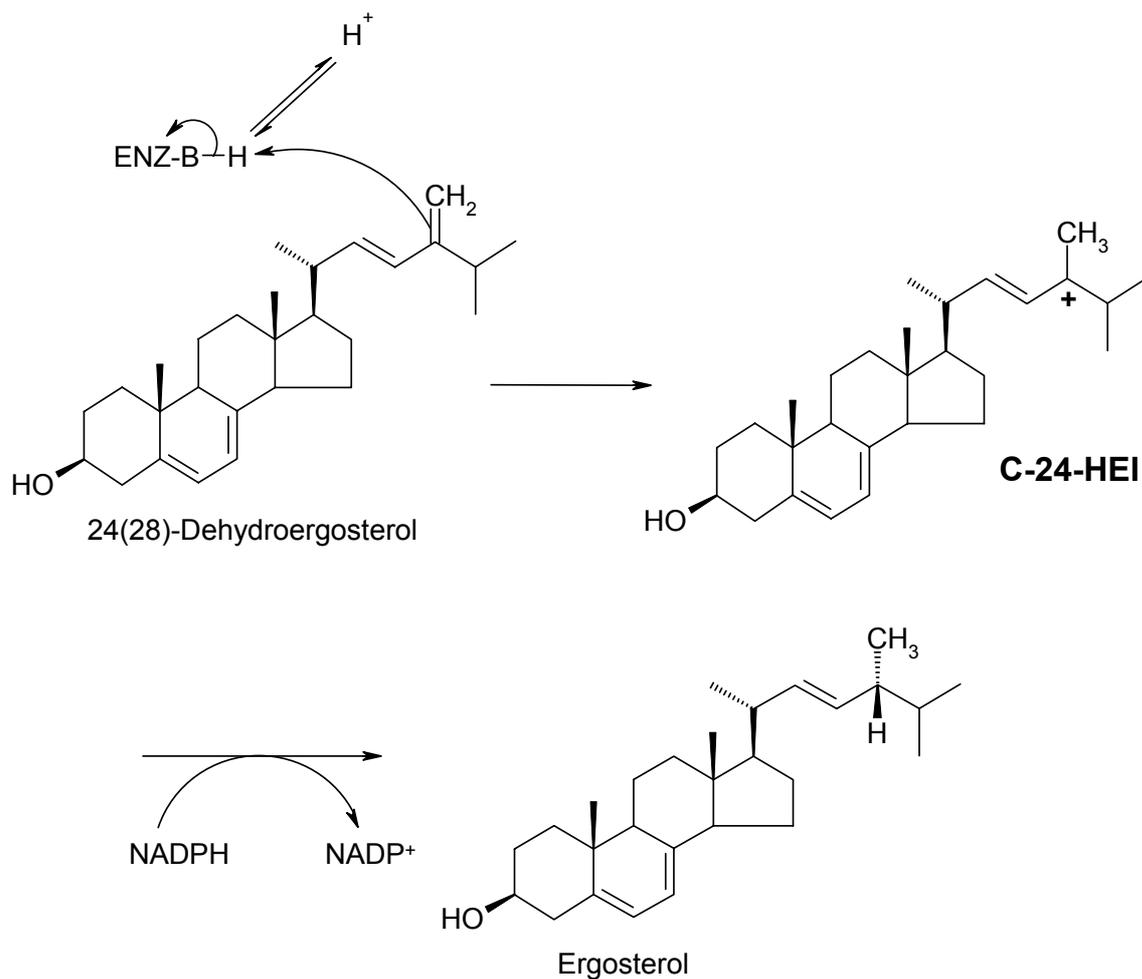


Abb. 11: Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase-Reaktion

1.2 Angriffspunkte bekannter Sterolbiosyntheseinhibitoren

Die vorangegangenen Abschnitte haben die essentielle Bedeutung von Ergosterol für Pilze aufgezeigt, sowie einen Überblick über die enzymatischen Reaktionen, die zu seiner Synthese erforderlich sind, gegeben.

Einige der enzymatischen Schritte des Post-Squalen-Abschnittes bieten auf Grund ihres exklusiven Vorkommens in Pilzen oder auf Grund mechanistischer Unterschiede in der Substratumsetzung gegenüber den Sterolsynthesen in Säugetier

und Pflanze geeignete Ansatzpunkte für die Entwicklung sogenannter „Sterol-Biosynthese-Inhibitoren“ (SBI's) als Antimykotika.

In Abb. 6 wurde bereits eine erste Übersicht über Targets von Antimykotika in der Ergosterolbiosynthese gegeben. Hieraus wird deutlich, daß es schon gelungen ist, an zahlreichen Stellen der Biosynthese inhibierend einzugreifen.¹⁵ Trotz der Vielfalt an Substanzklassen und Targets ist die Zahl der therapeutisch verwendeten Antimykotika jedoch recht überschaubar. Insbesondere sind dies die Allylamine, die Azole und die Morpholine.

Die teilweise in der Übersicht auftretenden Mehrfachnennungen lassen ein besonderes Charakteristikum der SBI's erkennen: Insbesondere bei Hemmstoffen der Sterol- Δ^{14} -Reduktase und Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase, bzw. der Sterol-C-24-Methyltransferase und der Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase, ist oft ein von strukturellen Details abhängiger Wechsel des Zielenzym zu beobachten.

Es kann sich also selbst bei kleineren Strukturänderungen der molekulare Angriffspunkt von einem zum anderen Enzym verschieben, oder sich gar auf zwei Enzyme gleichzeitig erstrecken, was angesichts der relativen Ähnlichkeit der Sterole, die als Substrate der Enzyme der Ergosterolbiosynthese dienen, auch verständlich ist.¹⁶

Nachfolgend werden einige der in Abb. 6 genannten Wirkstoffklassen genauer beleuchtet, Vertreter daraus vorgestellt, sowie ihr Einfluß auf die von ihnen inhibierten Enzyme („*Mode of action*“) und die dabei auftretenden Veränderungen im Sterolmuster diskutiert.

1.2.1 Allylamine

Die Allylamine mit ihren bekanntesten Vertretern Terbinafin (Lamisil[®]) und Naftifin (Exoderil[®]) sind als Inhibitoren der Squalenepoxidase bekannt. Obwohl die Squalenepoxidierung auch bei der Cholesterol-Biosynthese bei Säugetieren abläuft, wirken die Allylamine recht selektiv gegen Pilze. Terbinafin hemmt die Squalenepoxidase der Säugerzelle erst in 10.000-fach höherer Konzentration als die von Pilzen. Bei Naftifin ist die Selektivität nicht ganz so stark ausgeprägt.¹⁷

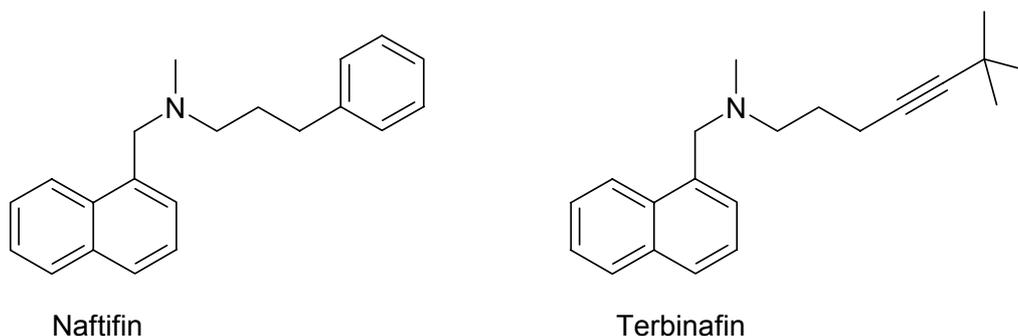


Abb. 12: Allylamine

Da Allylamine offensichtlich keine Substratanaloga des Squalens darstellen, wird als ein möglicher Wirkungsmechanismus der Allylamine eine Interaktion mit der Bindungsstelle des Flavin-Cofaktors oder mit einer Lipid-bindenden Domäne der Squalenepoxidase diskutiert, die zu einer Konformationsänderung und damit zu einer reversiblen, nicht-kompetitiven Blockade des Enzyms führen soll.¹⁸

Dies hat einerseits einen Mangel an Ergosterol, andererseits aber auch eine Akkumulation von toxischem Squalen in der Pilzzelle zur Folge.

1.2.2 Azole

Die große und für die Therapie besonders bedeutsame Klasse der Azole stellt zahlenmäßig die meisten Vertreter der auf dem Markt befindlichen antimykotischen Wirkstoffe.¹⁷ Der Überbegriff „Azole“ vereint die Stoffklassen der Imidazole und Triazole. Derzeit sind 14 Vertreter der Azol-Antimykotika auf dem Markt, z.B. Clotrimazol (Canesten[®]), Ketoconazol (Nizoral[®]) und das systemisch anwendbare Fluconazol (Diflucan[®]) (Abb. 13).

Die Wirkung der Azole kommt zustande durch die hohe Affinität des Stickstoff-Heterocyclus zum Häm-Eisen von Cytochrom P450. Da dieses essentiell für die Funktion der Sterol-C-14-Demethylase ist, werden diese „**demethylation-inhibiting fungicides**“ auch *DMI's* genannt. Die Wechselwirkungen des Stickstoff-Heterocyclus mit dem Häm-Eisen sind gepaart mit Interaktionen der lipophilen Teilstrukturen der Wirkstoffe mit der lipophilen Tasche des Enzyms.³ Nur so ist zu erklären, warum es

Unterschiede in der Inhibitionsintensität gegenüber Pilzen verglichen mit Pflanzen oder Säugetieren gibt, welche dieses Enzym ebenfalls besitzen.

Die fungistatische Wirkung soll auf die Störung der Membranfunktion durch akkumuliertes Lanosterol zurückzuführen sein. Bei höherer Dosierung wirken die Azole durch direkte Einlagerung in die Zellmembran fungizid. Diese Konzentrationen werden bei der systemischen Therapie jedoch nicht erreicht.

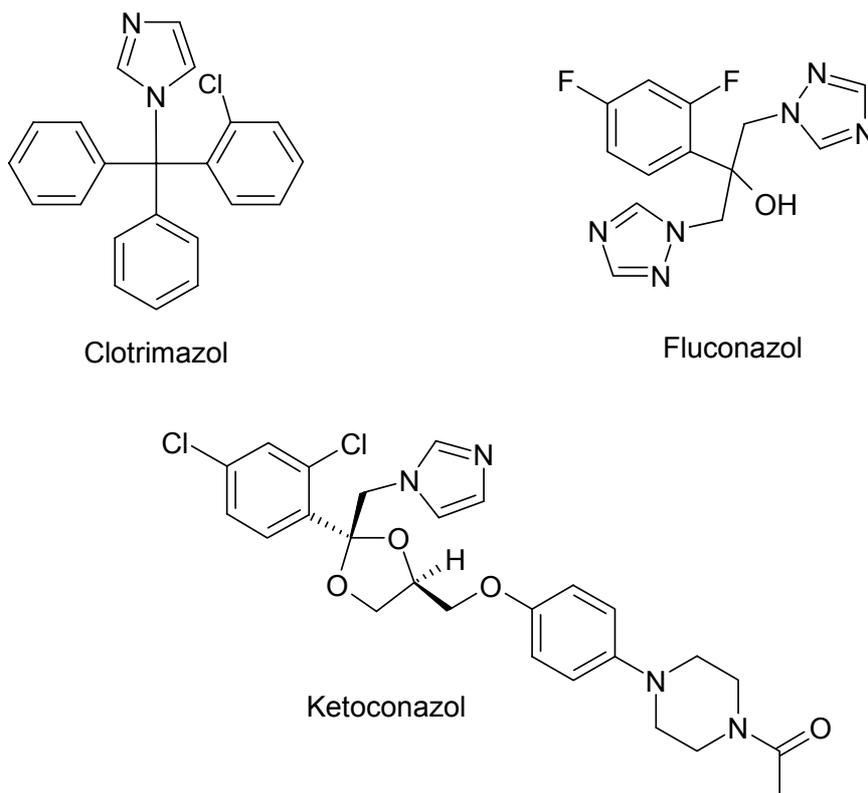


Abb. 13: Imidazol- und Triazol-Antimykotika (Auswahl)

1.2.3 Morpholine

Die Morpholine sind neben den Allylaminen und den Azolen die dritte pharmazeutisch relevante Stoffklasse, welche inhibierend in die Ergosterolbiosynthese eingreift. Dabei ist Amorolfiin (Loceryl[®]) derzeit das einzige humanmedizinisch genutzte Antimykotikum, während eine Vielzahl anderer Morpholine, wie Fenpropidin, Fenpropimorph oder Tridemorph in der Tiermedizin und im Pflanzenschutz gegen den echten Mehltau oder in Kombination mit Azol-

Fungiziden gegen Braunrost, Zwergrost oder andere Pflanzenpathogene eingesetzt werden (Abb. 14).¹⁹

Die Bezeichnung „Morpholine“ ist streng genommen nicht für alle dieser Klasse zugeordneten Wirkstoffe zutreffend. Das bereits erwähnte Fenpropidin enthält an Stelle des Morpholinringes einen Piperidinring, ist ansonsten aber strukturell mit dem „echten“ Morpholin Fenpropimorph identisch und dem Amorolfin nahe verwandt. Diese drei Wirkstoffe werden auch zur Untergruppe der 3-Phenylpropylamin-Fungizide gerechnet. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß bislang nicht herausgefunden werden konnte, warum sich die Wirkspektren von Amorolfin und Fenpropimorph trotz fast identischer Struktur so stark unterscheiden. Während Amorolfin besser wirksam gegen humanpathogene als gegen pflanzenpathogene Pilze ist, verhält es sich bei Fenpropimorph genau umgekehrt.²⁰

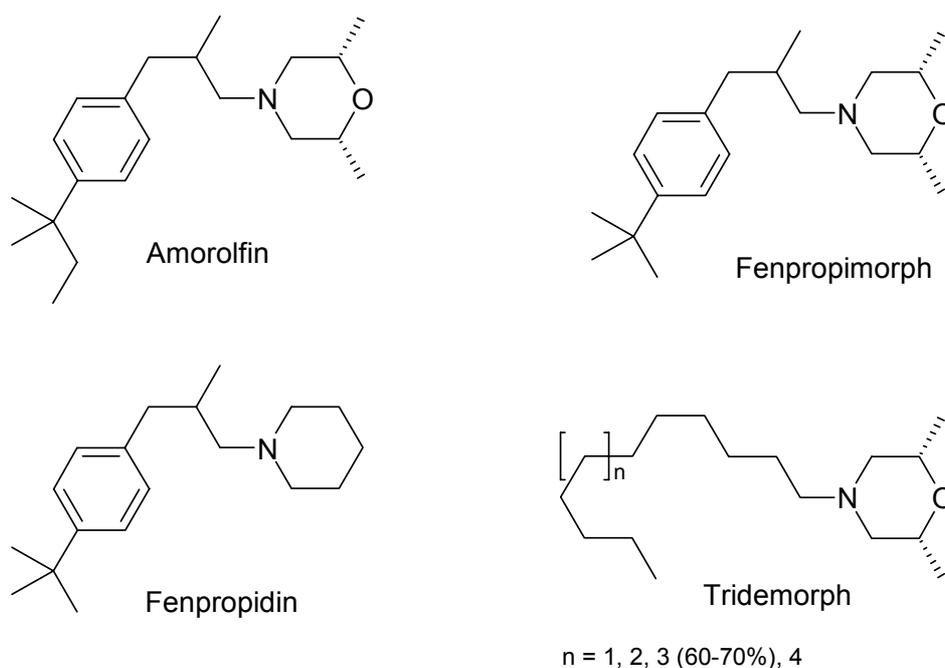


Abb. 14: Morpholin-Antimykotika

Die Besonderheit der Morpholin-Antimykotika liegt im Wirkmechanismus begründet. Man postuliert sowohl bei der Reaktion der Sterol- Δ^{14} -Reduktase als auch der Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase carbokationische Übergangszustände (HEI's). Dies betrifft bei der Sterol- Δ^{14} -Reduktase-Reaktion die Positionen C-9 und C-14 (Mesomerie des Allylkations) und bei der Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase die Position C-8. Betrachtet man diese

HEI's, so ist festzustellen, daß die auftretenden positiven Ladungen alle in benachbarten Bereichen auftreten, nämlich entlang des Ringes C des Sterolgrundkörpers. Morpholin-Antimykotika sind unter physiologischen Bedingungen am Stickstoff protoniert und damit sowohl strukturell als auch elektronisch in der Lage, die genannten HEI's zu imitieren (Mimikry) (Abb. 15).¹⁹

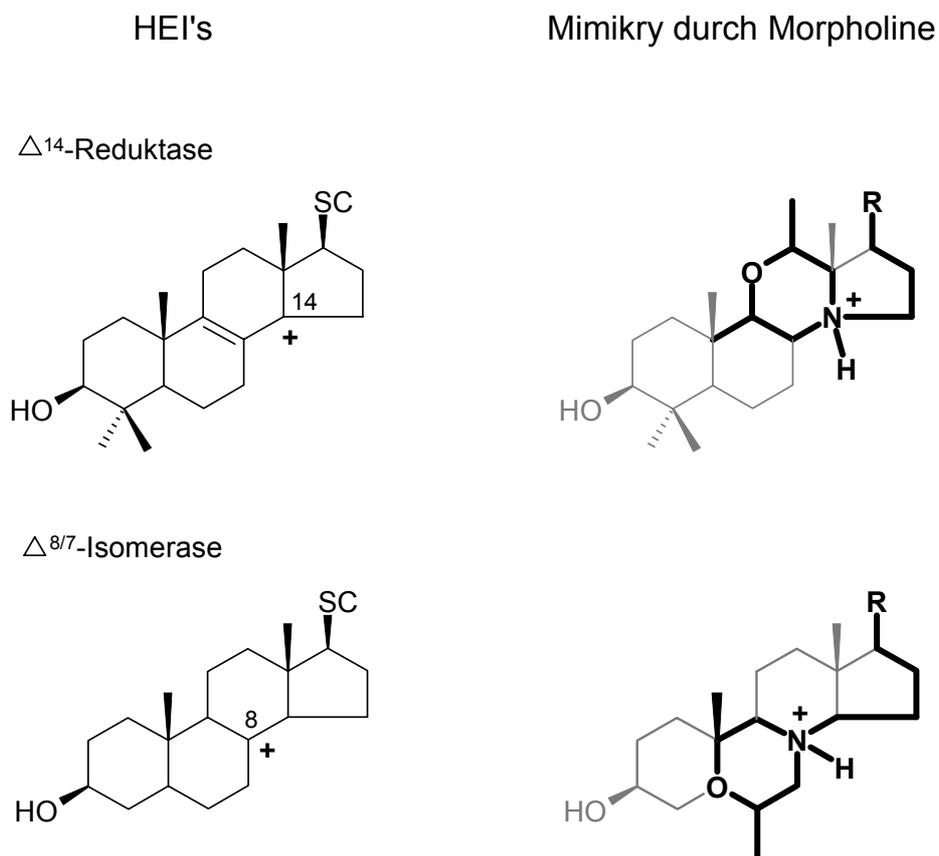


Abb. 15: Mimikry der HEI's durch Morpholin-Antimykotika

Es können also potentiell zwei Enzyme in der Ergosterolbiosynthese durch Morpholine inhibiert werden: die Sterol- Δ^{14} -Reduktase und die Stero- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase. Tatsächlich aber gibt es auch innerhalb der Morpholin-Antimykotika Präferenzen bezüglich der Affinitäten zu dem einen oder anderen Enzym.

Amorolfin und Fenpropimorph verursachen nach Inhibierungsversuchen in Hefen und Pilzen sowohl eine Akkumulation von Δ^8 -Sterolen, als auch von $\Delta^{8,14}$ -Sterolen, was den Schluß zuläßt, daß sowohl die Sterol- Δ^{14} -Reduktase als auch die Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase inhibiert werden.²¹ Bei Tridemorph wurde eine sehr viel stärkere Inhibitionswirkung auf die Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase gefunden, während Fenpropidin

ähnliche Präferenzen wie Fenpropimorph zeigte, jedoch war der Anteil an gefundenen $\Delta^{8,14}$ -Sterolen im Allgemeinen deutlich höher.²¹

1.2.4 Weitere Inhibitoren der Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase und - Δ^{14} -Reduktase

Neben der großen Gruppe der Morpholine sind auch weitere Stoffklassen gefunden worden, welche dieselben Zielenzyme hemmen.

Basierend auf dem postulierten Wirkmechanismus der Mimikry der High Energy Intermediates hat die Gruppe um *Benveniste* eine Reihe von Substanzen synthetisiert, welche sich vom 8-Aza-4 α ,10-dimethyl-trans-decal-3 β -ol (in Analogie zur Sterolnummerierung) ableiten.^{22,23} Diese imitieren die Ringe A und B des Sterolgrundgerüsts und tragen bei physiologischem pH eine positive Ladung am Stickstoffatom an der „C-8-Position“ des Sterolgerüsts. Weiterhin besitzen diese Substanzen relativ große N-Substituenten, welche derart positioniert sind, daß sie die Ringe C und D, sowie die Seitenkette mehr oder weniger imitieren. In Inhibitionsversuchen an Mais-Embryonen konnten einige davon als potente Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase- bzw. - Δ^{14} -Reduktase-Inhibitoren charakterisiert werden (Abb. 16).

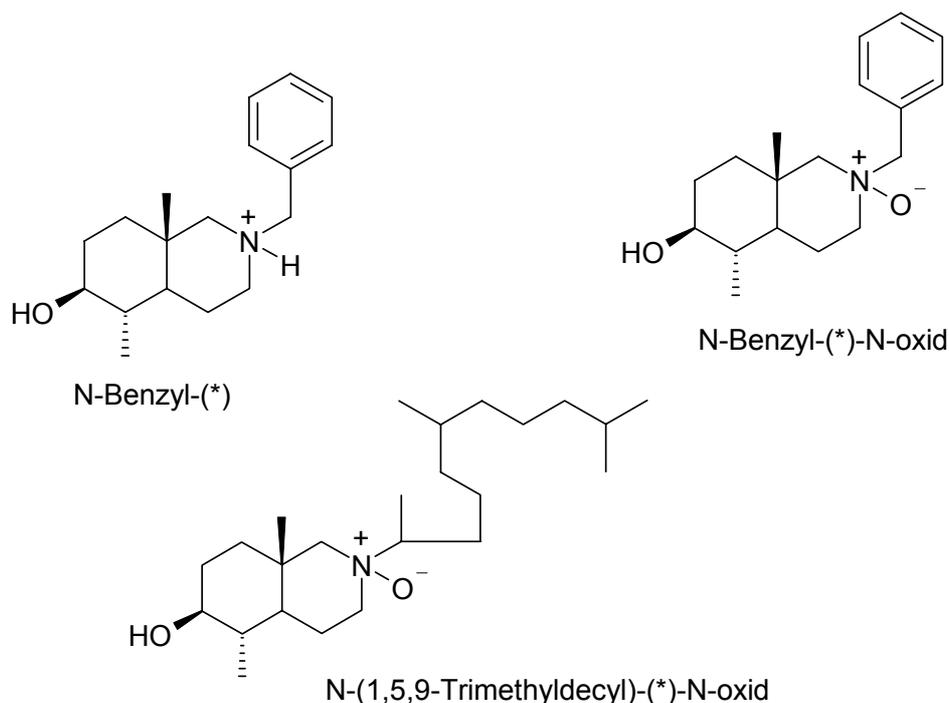


Abb. 16: Azasecosteroide von Benveniste: 8-Aza-4 α ,10-dimethyl-trans-decal-3 β -ol*-Derivate

Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden von Burbiel und Salman etliche antimykotisch aktive Azasecosteroide (substituierte 2-Azabicyclo[5.3.0]decane) synthetisiert und mit Hilfe einer Screening-Methode konnte eindeutig bestätigt werden, daß der molekulare Angriffsort die Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase der Ergosterolbiosynthese ist.

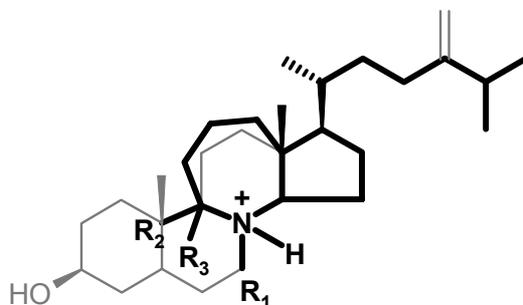


Abb. 17: Mimikry des HEI der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Reaktion durch Azasecosteroide aus unserer Arbeitsgruppe

1.2.5 Inhibitoren der Sterol-C-24-Methyltransferase (SMT) und Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

Die C-24-Methylierung der Sterolseitenkette (vgl. 1.1.2.2) ist ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal zwischen den Sterolbiosynthesewegen von Pilz und Säugetier. Durch Einbringen einer positiven Ladung in die Seitenkette, z.B. durch N- oder S-Substituenten, oder durch Konstruktion von Substratanaloga konnten wirksame Inhibitoren dieses Enzyms entwickelt werden.¹³ Ähnlich wie bei den Morpholinen setzt man auch hier auf das Prinzip der Mimikry von High Energy Intermediates (HEI's). Wie in Abb. 9 gezeigt, postuliert man sowohl an C-24 als auch an C-25 carbokationische Zwischenstufen, die man durch Synthese geeigneter „Transition-State-Analogues“ zu imitieren versucht.¹⁵

Erste Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an 25-Azasterolen und verwandten SMT-Inhibitoren (Abb. 18) haben ergeben, daß diese Verbindungen auch toxisch für menschliche und tierische Zellen sind.¹⁵ Aus diesem Grund sind bisher keine Substanzen mit diesem Zielenzym auf den Markt gekommen. Trotzdem waren die ersten Resultate durchaus vielversprechend und es besteht daher weiterhin großes Interesse an der Entwicklung neuer und vor allem selektiv wirksamer Substanzen aus dieser Klasse von Enzyminhibitoren.

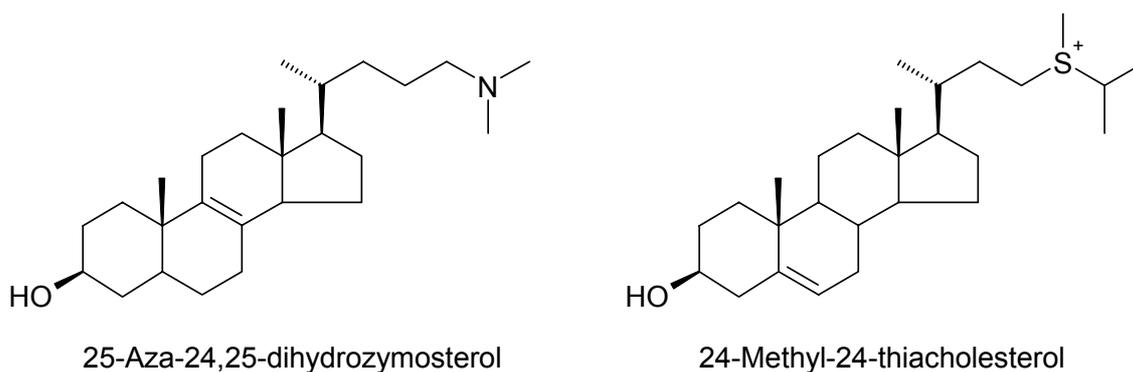


Abb. 18: Bekannte Inhibitoren der C-24-SMT und $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

Die gezeigten Verbindungen und weitere Derivate haben sich zudem auch als Inhibitoren der Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase erwiesen. Eine exakte Charakterisierung des Inhibitionserfolges an der Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase ist jedoch schwierig, wenn eine Substanz bereits ein potenter SMT-Inhibitor ist und damit fast kein Substrat mehr für die Reduktase zur Verfügung steht.

1.3 *Plakinamin B* - ein Steroid-Alkaloid aus dem Meer

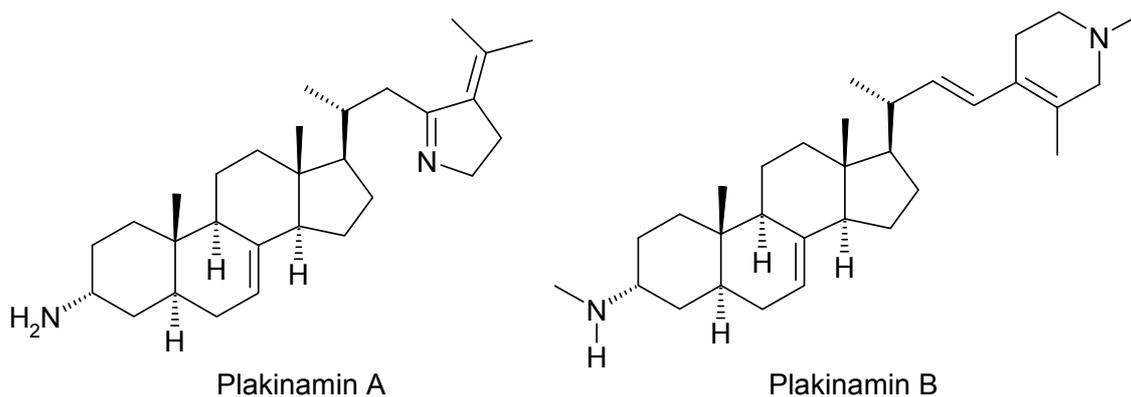
Steroid-Alkaloide sind bekannte Metaboliten terrestrischer Pflanzen,²⁴ aber nur wenige Beispiele derartiger Verbindungen aus marinen Organismen sind bis heute beschrieben worden.

1984 veröffentlichten *Faulkner* und *Rosser* vom *Scripps Institut für Ozeanographie* in La Jolla, Kalifornien, eine Arbeit, in der sie über die Isolierung von zwei neuen Steroid-Alkaloiden aus einem marinen Schwamm berichten.²⁵

Der Schwamm aus der Familie *Plakinidae* (Abb. 19) wurde beim Tauchen auf Korallenbänken in den flachen Gewässern vor Mant Island, Ponape (Karolinen-Inseln, Micronesien), entdeckt, wo man beobachten konnte, daß er Korallen überwuchert und abtötet.

**Abb. 19:** Plakina sp.

Ein methanolischer Extrakt des gefriergetrockneten Materials zeigte antimikrobielle Aktivität. Als Hauptbestandteile des Extrakts konnten zwei Steroid-Alkaloide isoliert werden, von denen das eine, *Plakinamin A*, in Konzentrationen von 25 µg/disk bzw. 10 µg/disk wachstumshemmend auf *S. aureus* und *C. albicans* wirkte. Noch stärker war die Aktivität des zweiten Metaboliten, *Plakinamin B*, mit 10 µg/disk bzw. 2 µg/disk.

**Abb. 20**

Das Alkaloid *Plakinamin B* stellt die Leitstruktur für die vorliegende Dissertation dar.

2 Themenstellung und Syntheseplanung

2.1 Themenstellung

Thema der vorliegenden Arbeit war es, das antimykotisch aktive marine Steroid-Alkaloid *Plakinamin B* und Strukturanaloga zu synthetisieren. Dieser Naturstoff bzw. die Analoga könnten als Leitstrukturen für eine neue Klasse antimykotischer Wirkstoffe dienen.

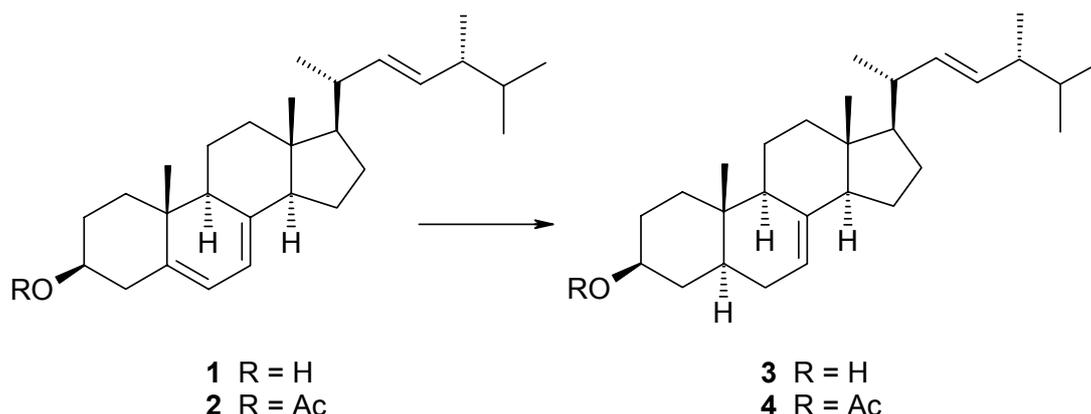
Die Struktur von *Plakinamin B* (Steroidgrundkörper mit basischen funktionellen Gruppen an Ring A und in der Seitenkette) ließ vermuten, daß diese Substanz ihre antimykotische Aktivität über einen Eingriff in die Ergosterolbiosynthese ausübt.

Plakinamin B und alle synthetisierten Derivate sollten zunächst in einem Agar-Diffusionstest auf antimikrobielle Aktivität getestet und die wirksamsten Substanzen in einem anschließenden Screening auf Hemmung der Ergosterolbiosynthese untersucht werden. Hierbei ging es insbesondere darum, das jeweilige Zielenzym herauszufinden.

Auf der Grundlage der Ergebnisse der biologischen Testung sollten erste Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden.

2.2 Synthesestrategie

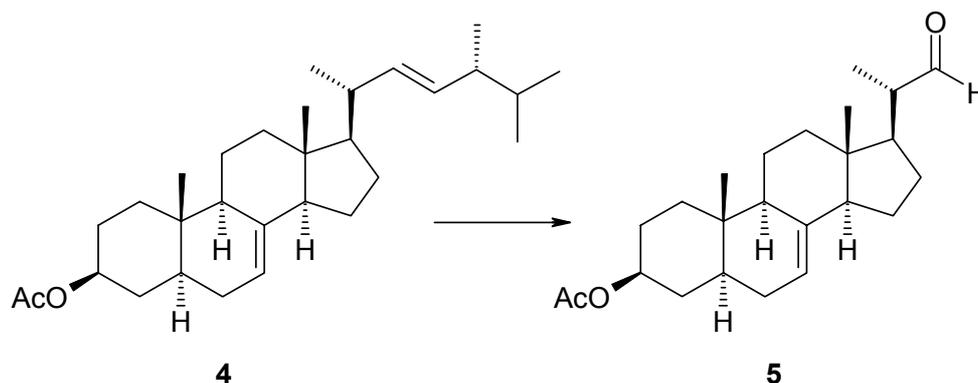
Das im *Plakinamin B* vorliegende Steroidgrundgerüst sollte ausgehend von Ergosterol (**1**) bzw. Ergosterylacetat (**2**) synthetisiert werden. Hierzu muß zunächst die Δ^5 -Doppelbindung neben der Δ^7 - sowie der Δ^{22} -Doppelbindung in der Seitenkette regio- und stereoselektiv hydriert werden.



Die selektive katalytische Hydrierung von Ergosterol und Ergosterylacetat wurde bereits mehrfach beschrieben.^{26,27,28,29,30}

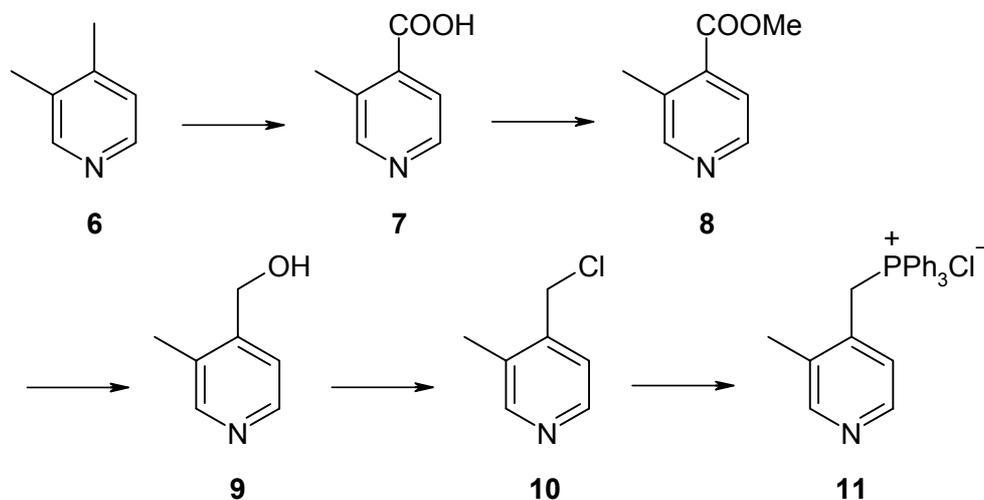
Vor allem die von *Tadros* und *Boulos* entwickelte Methode schien besonders vielversprechend zu sein. Als Katalysator dient hier Raney-Nickel und die Hydrierung in Ethylacetat unter Zusatz von 4-(*N,N*-Dimethylamino)-benzaldehyd liefert **3** bzw. **4** in hoher Ausbeute.³⁰

Eine anschließende selektive Ozonolyse der Doppelbindung in Δ^{22} -Position sollte den Aldehyd **5** liefern. Auch hier konnte auf die Ergebnisse früherer Arbeiten zurückgegriffen werden.^{31,32,33}

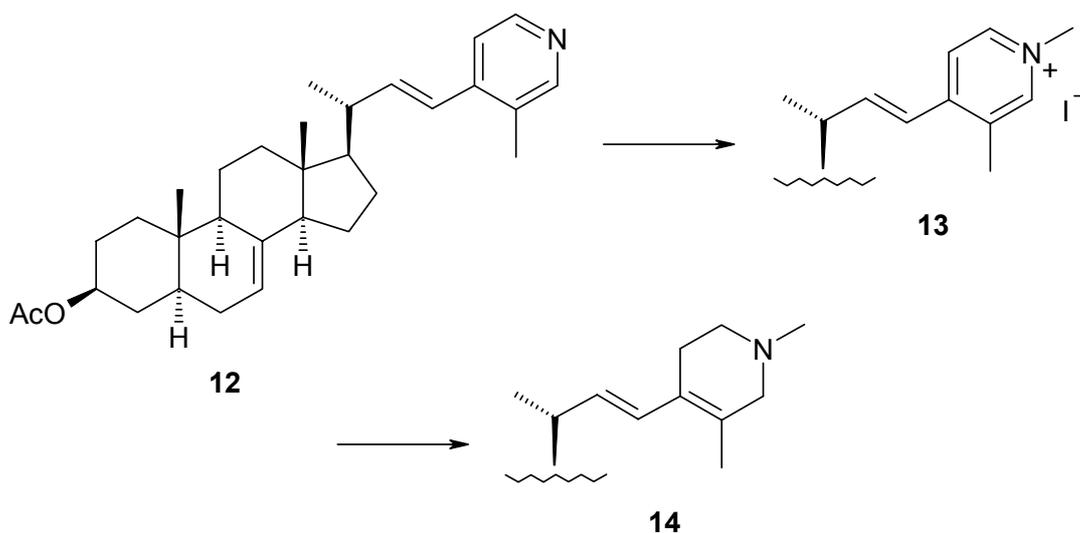


Anschließend war vorgesehen, die Pyridin-Seitenkette mit einer Wittig-Reaktion³⁴ einzuführen. Das entsprechende Wittig-Reagenz **11** sollte ausgehend von 3,4-Lutidin (**6**) dargestellt werden. Zunächst kann durch selektive Oxidation der 4-Methylgruppe mit Selendioxid in Diphenylether die Carbonsäure **7** dargestellt werden.³⁵

Nach Veresterung und Reduktion zum Alkohol **9** sowie anschließender Halogen-Substitution sollte es dann möglich sein, aus **10** das Wittig-Reagenz **11** zu erhalten.

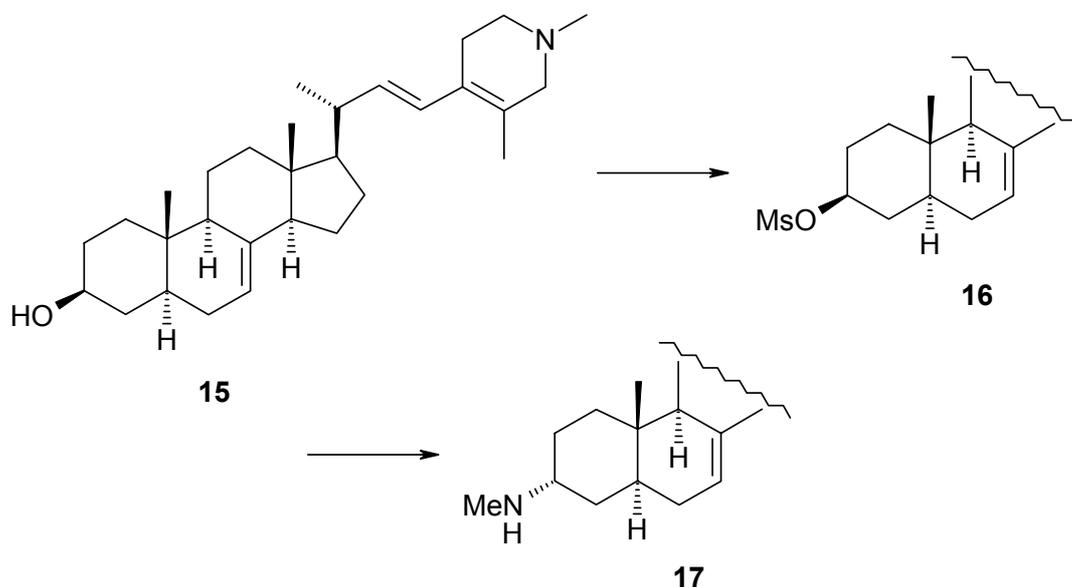


Das aus der Wittig-Reaktion mit **5** resultierende Olefin **12** sollte anschließend zum Tetrahydropyridin-Derivat **14** umgesetzt werden. Arbeiten von *Reimann et al.*^{36,37,38} haben gezeigt, daß 1,2,5,6-Tetrahydropyridine aus den jeweiligen Methiodiden in guten Ausbeuten durch Reduktion mit NaBH₄ zugänglich sind. Bei 3,4-substituierten Pyridinen entsteht dabei in der Regel das Produkt, bei dem die Doppelbindung höchstmöglich substituiert ist.

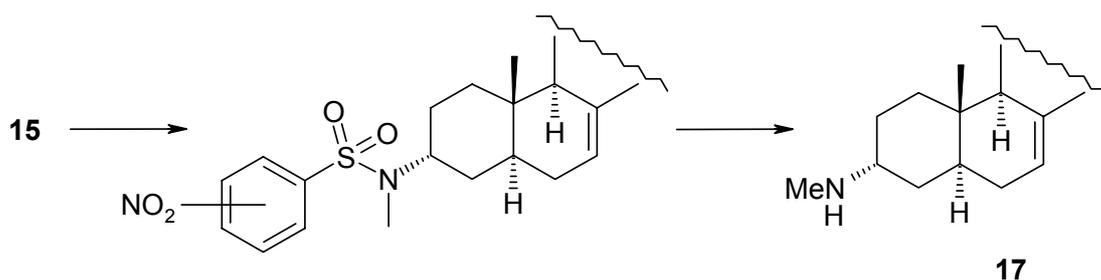


Abschließend sollte die Methylamino-Funktion unter Inversion der Stereochemie in Position 3 eingeführt werden. Hier gibt es mehrere Möglichkeiten, wobei zunächst der Ester gespalten werden muß, um den sekundären Alkohol **15** zu erhalten.

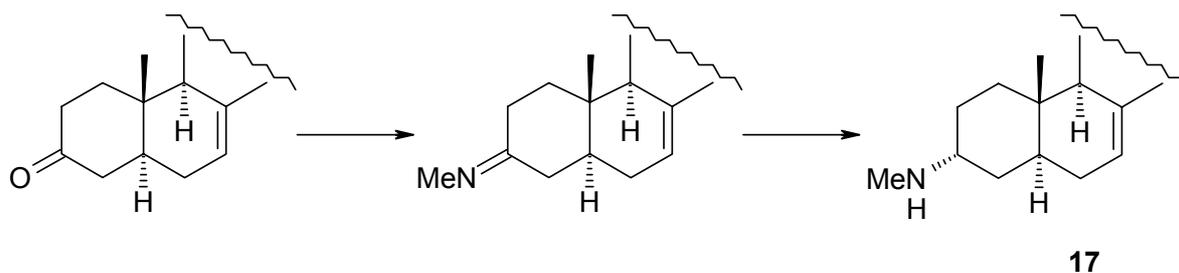
Über das Mesylat **16** sollte mit Methylamin in einer S_N2 -Reaktion versucht werden, zum Alkaloid *Plakinamin B* (**17**) zu gelangen. Denkbar, wenn auch umständlicher, wäre auch die Substitution des Mesylats durch Azid mit nachfolgender Reduktion²⁵ und Mono-*N*-Methylierung.



Sekundäre Amine lassen sich aus Alkoholen auch mit alkylierten 2- und 4-Nitrobenzolsulfonamiden in guten Ausbeuten darstellen.³⁹ **15** könnte so alternativ in einer Mitsunobu-Reaktion^{40,41} (unter Inversion an C-3) mit einem *N*-Methylnitrobenzolsulfonsäureamid umgesetzt werden; anschließende Spaltung des Sulfonamids mit Thiolat würde ebenfalls zu **17** führen.



Eine weitere Möglichkeit wäre der Versuch einer reduktiven Aminierung mit Methylamin und Natriumborhydrid oder Natriumcyanoborhydrid nach Oxidation des Alkohols **15** zum Keton. Allerdings ist hierbei nicht eindeutig vorherzusehen, ob die neu eingeführte Methylaminogruppe an C-3 α - oder β -orientiert ist oder ob ein Isomeren-Gemisch entsteht.



Für die Synthese von Strukturanaloga von *Plakinamin B* boten sich prinzipiell zwei Möglichkeiten an:

1. Modifizierung der Seitenkette ausgehend vom Aldehyd **5** zur Optimierung der Struktur hinsichtlich einer möglichen Funktion als Mimikry der C-24- bzw. C-25-HEI's der Sterol-C-24-Methyltransferase (SMT). Hierzu sollten mit geeigneten Reagenzien (bevorzugt durch Wittig-Reaktionen) weitere basische, aber auch nicht-basische Seitenketten eingeführt werden.
2. Variation der Substituenten (andere N-haltige oder N-freie Reste) bzw. der Stereochemie (α - oder β -Stellung) in Position 3 mit dem Ziel, ggf. die antimikrobielle Aktivität weiter zu steigern oder zumindest Erkenntnisse zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu gewinnen.

3 Synthesen

3.1 Steroidgrundgerüst

3.1.1 Hydrierung

Zunächst wurde Ergosterylacetat (**2**) durch Acetylierung mit Acetanhydrid und Pyridin aus Ergosterol (**1**) synthetisiert.

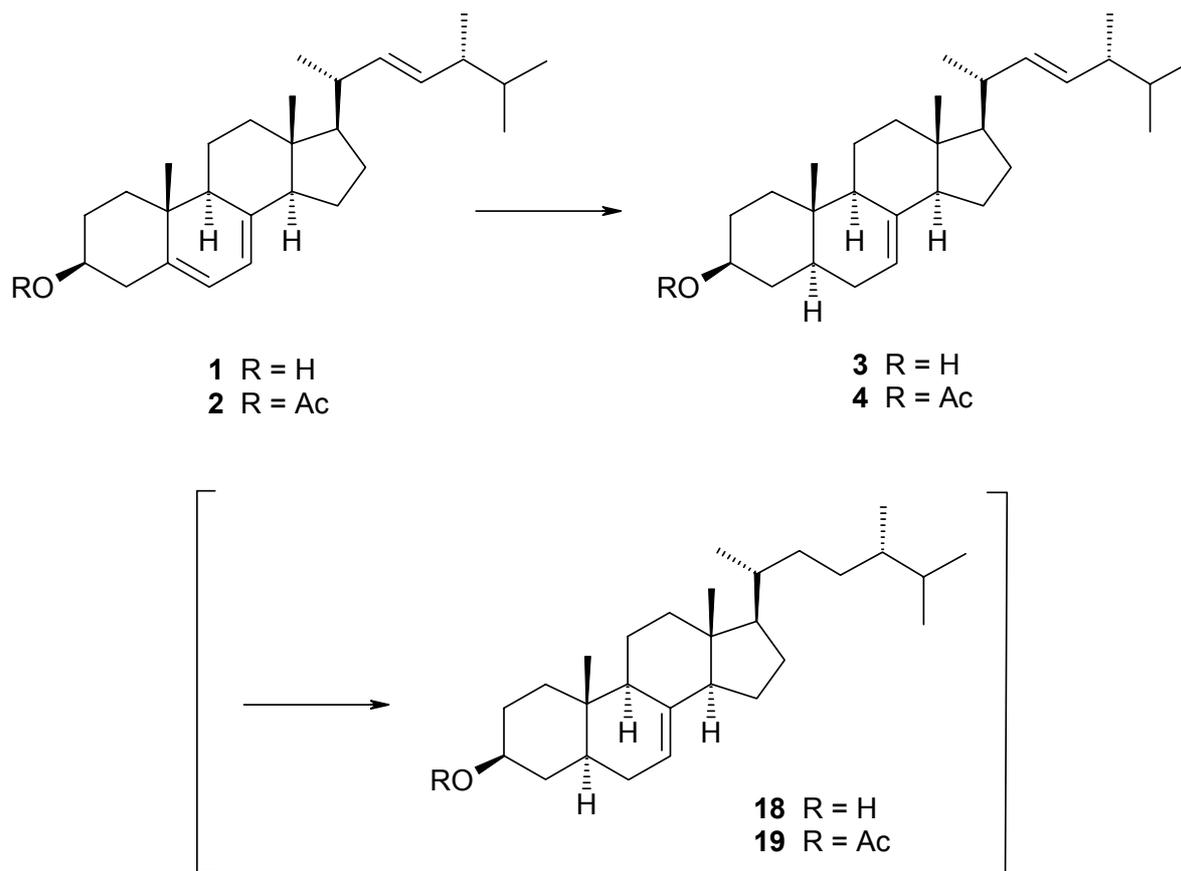
Die nun folgende selektive katalytische Hydrierung von **1** und **2** mit Raney-Nickel wurde in Anlehnung an die Untersuchungen von *Tadros* und *Boulos* durchgeführt.³⁰ Diese hatten gezeigt, daß unterschiedliche Ergebnisse früherer Arbeiten^{26,27,29} u.a. auch auf Verunreinigungen der verwendeten Lösungsmittel zurückzuführen sind.

So ergab sich, daß durch Zusatz von geringen Mengen *N,N*-Dimethylanilin, Paraformaldehyd oder 4-(*N,N*-Dimethylamino)-benzaldehyd zum jeweiligen Lösungsmittel eine nahezu quantitative Umsetzung zu 5,6-Dihydroergosterol (**3**) bzw. 5,6-Dihydroergosterylacetat (**4**) erzielt werden kann.

Verwendet man reine Lösungsmittel, so erhält man nach 30 Minuten ca. 50% des gewünschten Produkts. Hydriert man weiter, so entsteht ein Gemisch mit 5,6,22,23-Tetrahydroergosterol (**18**) bzw. 5,6,22,23-Tetrahydroergosterylacetat (**19**) und nach 6 Stunden reines **18** bzw. **19**.

Die Δ^{22} -Doppelbindung in der Seitenkette zwischen zwei sekundären C-Atomen sollte eigentlich verhältnismäßig leicht abgesättigt werden. Die Tatsache, daß die Doppelbindungen in Ring B durch ihre Konjugation gesteigerte Reaktionsbereitschaft zeigen, gestattet hier jedoch eine selektive Hydrierung in guten Ausbeuten.

Der inhibierende Effekt verschiedener Verbindungen auf die katalytische Hydrierung von Olefinen wird zurückgeführt auf das Vorhandensein von freien Elektronenpaaren in den Zusätzen.⁴² *N,N*-Dimethylanilin und 4-(*N,N*-Dimethylamino)-benzaldehyd, welche die besten Ausbeuten liefern, besitzen ein solches freies Elektronenpaar in der Aminogruppe (gezielte Katalysatorvergiftung).

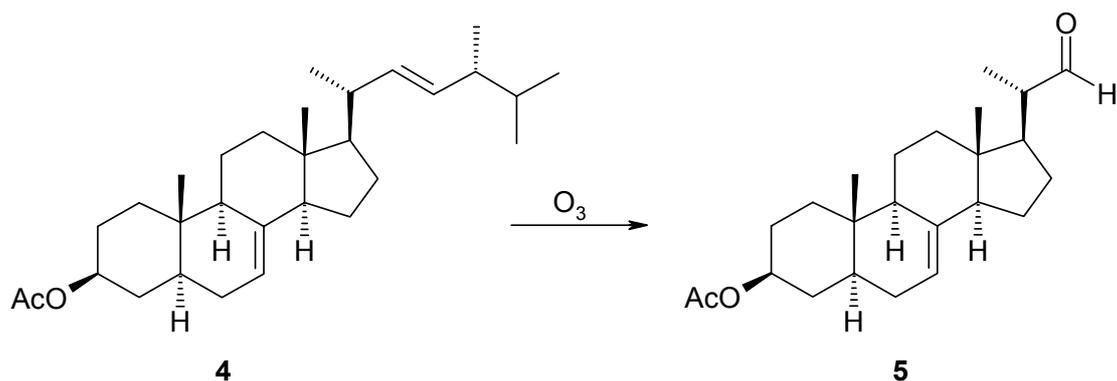


Da diese selektive katalytische Hydrierung als erster Schritt für die geplante Synthese von *Plakinamin B* überaus bedeutsam war, wurde das Verfahren im Hinblick auf die Umsetzung großer Mengen in zahlreichen Versuchen optimiert.

Die Methode mit Ethylacetat / THF im Verhältnis 1 : 1 als Lösungsmittel, Raney-Nickel W-2,⁴³ sowie Zusatz von 0.5% 4-(*N,N*-Dimethylamino)-benzaldehyd und einer Hydrierdauer von 6 Stunden unter Normalbedingungen lieferte dabei die besten Ergebnisse.

3.1.2 Ozonolyse

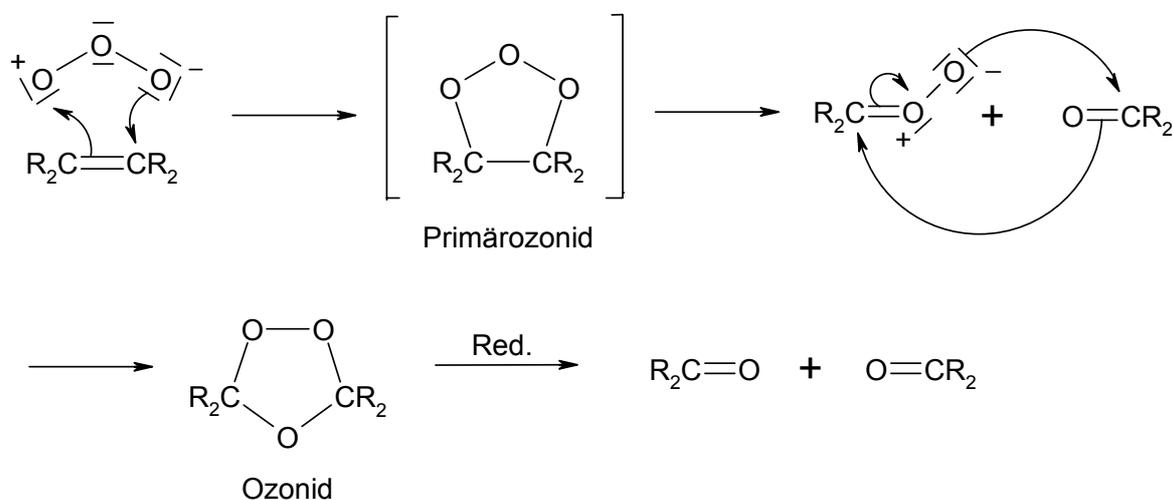
Eine weitere Schlüsselreaktion stellt die anschließende selektive Ozonolyse der Δ^{22} -Doppelbindung in der Seitenkette dar. Der dabei entstehende Aldehyd **5** spielt eine zentrale Rolle sowohl im weiteren Verlauf der Synthese von *Plakinamin B* als auch als Ausgangsverbindung für die Synthese diverser Strukturanaloga.



Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich bereits mit diesem Thema befaßt. Die Ausbeuten lagen hierbei jeweils im Bereich zwischen 20% und 40%.^{31,32,33} Gemeinsam ist allen Arbeiten die Durchführung der Ozonolyse in Dichlormethan als Lösungsmittel unter Zusatz von Pyridin bei niedrigen Temperaturen. Die anschließende reduktive Aufarbeitung kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. So kamen beispielsweise Zink / Eisessig oder auch Dimethylsulfid / Methanol zum Einsatz.

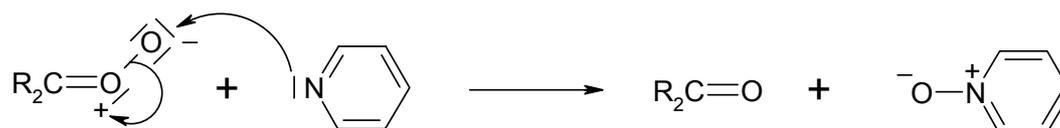
Der Einfluß von Pyridin auf die Ozonolyse von mehrfach ungesättigten Sterolen wurde schon von *Slomp* und *Johnson* am Beispiel von 4,22-Stigmastadien-3-on beschrieben.⁴⁴ Demnach wird durch den Zusatz von Pyridin zum Lösungsmittel Selektivität und Ausbeute der Ozonolyse erhöht. Zurückgeführt wird dies auf einen veränderten Reaktionsverlauf.

Der von *Criegee* postulierte und nach ihm benannte Mechanismus der Ozonolyse ist allgemein anerkannt.⁴⁵



Der erste Schritt liefert in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition das instabile Primärozonid; nach Cycloreversion wird in einer erneuten Cycloaddition schließlich das Ozonid gebildet. Anschließende Reduktion führt je nach Reaktionsbedingungen zu verschiedenen Produkten.

Pyridin reagiert vermutlich mit dem intermediär entstehenden Carbonyloxid unter Bildung von Pyridin-N-oxid und der entsprechenden Carbonylverbindung:



Bei Zusatz von Pyridin werden also beide Enden der Doppelbindung während der Ozonolyse zur jeweiligen Carbonylverbindung umgesetzt und zwar noch vor der anschließenden reduktiven Aufarbeitung.

Während der Versuche, den Aldehyd **5** zu synthetisieren, wurden alle Reaktionsparameter (Ozon-Menge, -Flußrate, Lösungsmittel, Lösungsmittelmenge, Pyridin-Anteil, Temperatur, Reduktionsmittel, Aufarbeitung) systematisch variiert. Es gelang dabei, die Methode so zu optimieren, daß der Aldehyd **5** in nahezu quantitativer Ausbeute gewonnen werden konnte. Dies war für den weiteren Fortgang dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung.

Als optimal erwies sich die Versuchsdurchführung bei hoher Verdünnung in Methylenechlorid mit Zusatz von 0.5 Vol.% Pyridin bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Mit einer Flußrate von 60 Liter pro Stunde werden 1.6 Äquivalente Ozon in das Reaktionsgemisch eingeleitet, überschüssiges Ozon wird vertrieben und anschließend sofort mit Dimethylsulfid / Methanol reduziert.

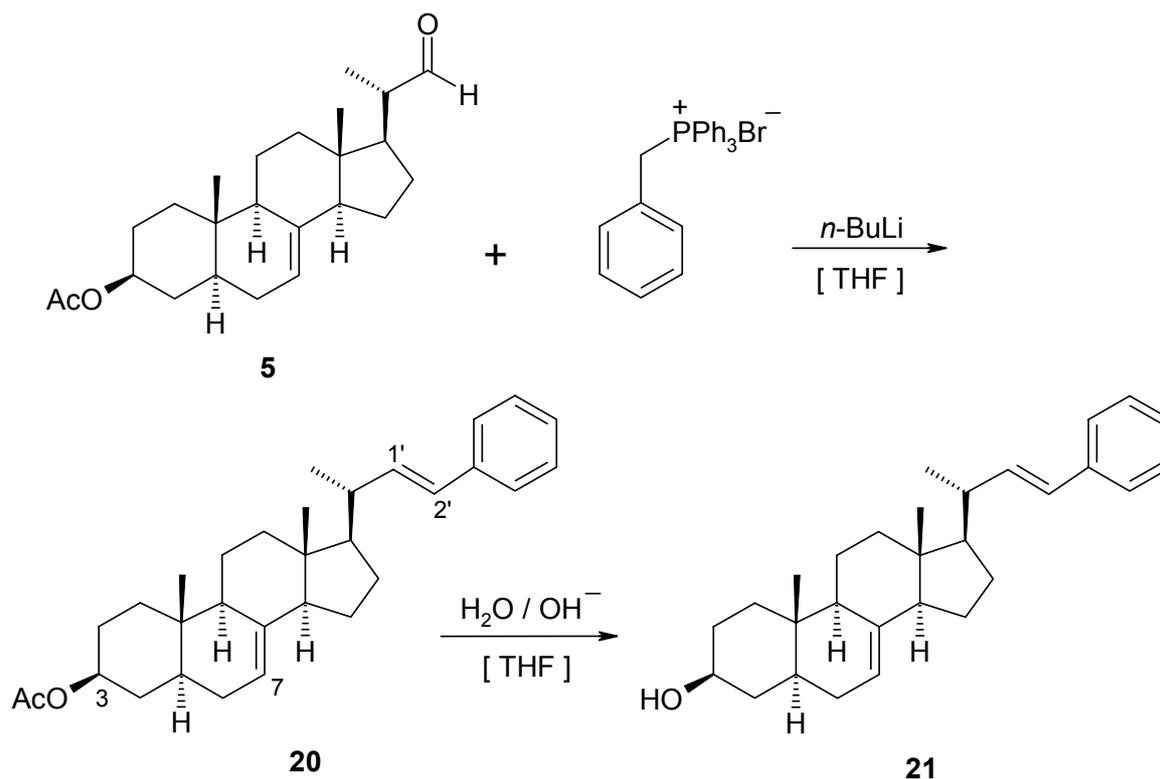
3.2 Aufbau der Seitenkette

Es war geplant, die Pyridin-Seitenkette mit Hilfe einer Wittig-Reaktion einzuführen. Vor der Synthese des dazu benötigten Wittig-Reagenz **11** wurden die Reaktions-

bedingungen zunächst in Modellversuchen mit leicht zugänglichen Reagenzien optimiert und dabei gleichzeitig einige für die biologische Testung interessante Verbindungen synthetisiert.

3.2.1 Synthese von (3*S*,20*R*)-3-Acetoxy-20-[2-phenyl-(*E*)-ethenyl]-pregn-7-en (20)

Die Wittig-Reaktion des Aldehyds **5** mit Benzyltriphenylphosphoniumbromid lieferte die Verbindung **20** in guter Ausbeute. Die Ylid-Bildung erfolgte mit *n*-Buli in THF unter Stickstoff und Eiskühlung. Die Einführung eines Aromaten war für die DC-Kontrolle des Reaktionsverlaufs in diesem Modellversuch sehr hilfreich. Alkalische Hydrolyse von **20** mit 6 N-NaOH / THF lieferte den Alkohol **21**.



Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **20** konnte die Konfiguration der neu entstandenen Doppelbindung anhand der Kopplungskonstante der beiden olefinischen Protonen 1'-H und 2'-H ($J = 15.8 \text{ Hz}$) eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 21).

Die Kopplungskonstante von *E*-Olefinen liegt im Bereich von 12 bis 18 Hz, beim *Z*-Olefin wäre die Kopplungskonstante in einer Größenordnung von 6 bis 12 Hz zu erwarten.

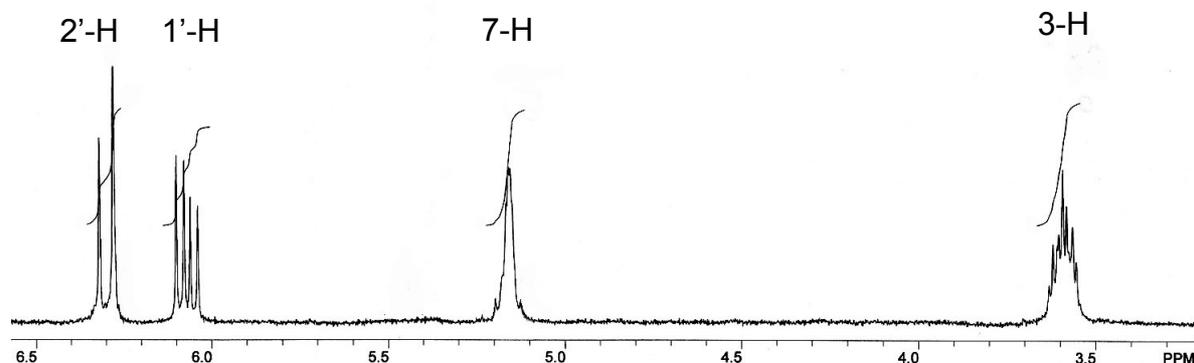


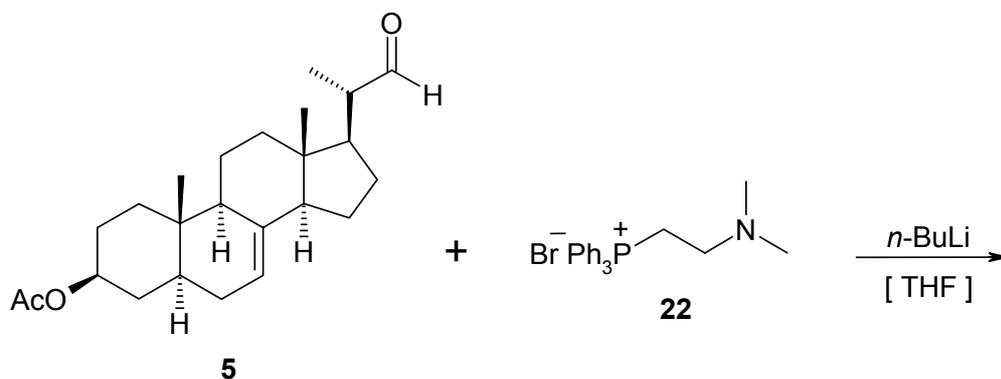
Abb. 21: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **20** (Ausschnitt)

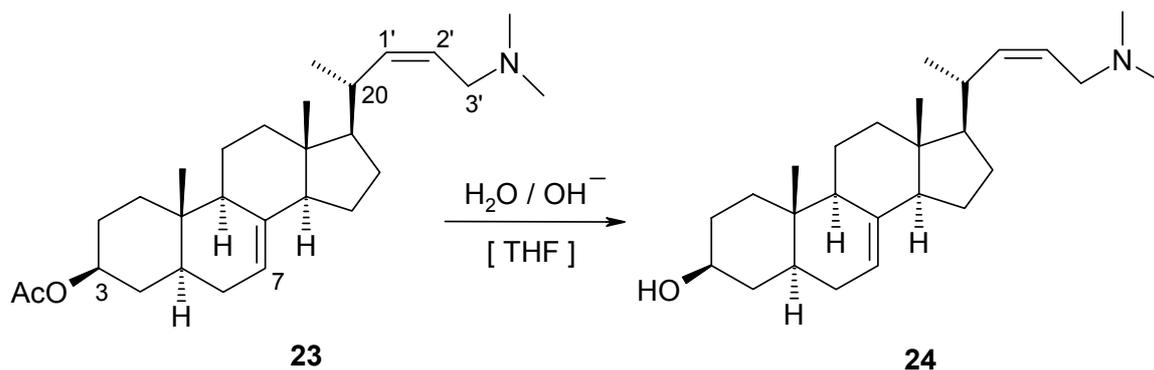
3.2.2 Synthese von (3*S*,20*R*)-3-Acetoxy-20-[3-(*N,N*-dimethylamino)-(Z)-prop-1-enyl]-pregn-7-en (**23**)

Im Hinblick auf eine mögliche Funktion als Mimikry der C-24- bzw. C-25-HEI's der Sterol-C-24-Methyltransferase erschien als nächstes der Aufbau einer basischen Seitenkette interessant.

Ziel hierbei war es, ein tertiäres Amin in Position 24 oder 25 einzuführen und gleichzeitig die Ergosterol-Seitenkette möglichst zu imitieren.

Mit dem Wittig-Reagenz **22** wurde so unter den in 3.2.1 beschriebenen Bedingungen die Verbindung **23** synthetisiert. Hydrolyse von **23** führte zum Alkohol **24**.





Im ^1H -NMR-Spektrum bilden die Signale der olefinischen Protonen 1'-H und 2'-H ein gemeinsames Multiplett und so konnte die Kopplungskonstante zum Nachweis der Konfiguration der gebildeten Doppelbindung in diesem Fall nicht direkt herangezogen werden.

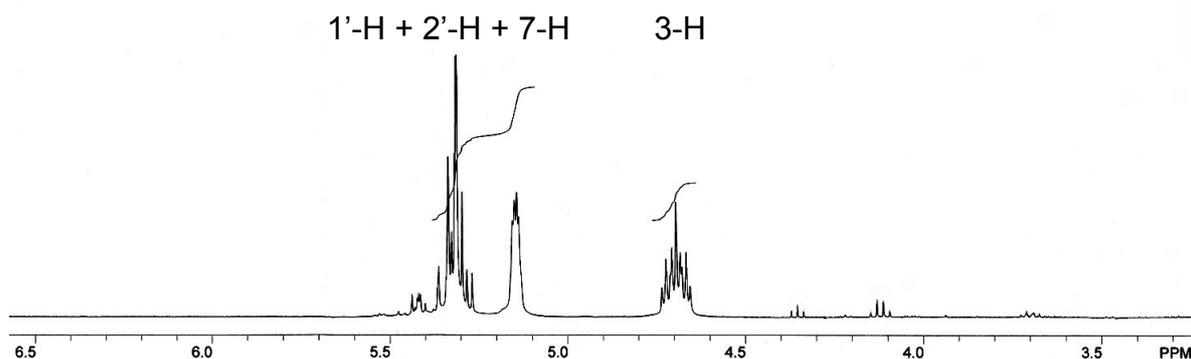


Abb. 22: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **23** (Ausschnitt)

Die Durchführung eines NOE-Differenz-Experiments sollte hier Aufschluß über die Stereochemie der Doppelbindung geben.

Einstrahlung bei 2.99 ppm (3'-H) führte wie erwartet zu einer Verstärkung des 2'-H-Signals; darüber hinaus konnte eine Signalverstärkung bei 2.45 ppm (20-H) beobachtet werden.

Dies ist nur möglich, wenn der räumliche Abstand der Kerne 3'-H und 20-H sehr klein ist. Das bedeutet, daß die Doppelbindung Z-Konfiguration haben muß (Abb. 23).

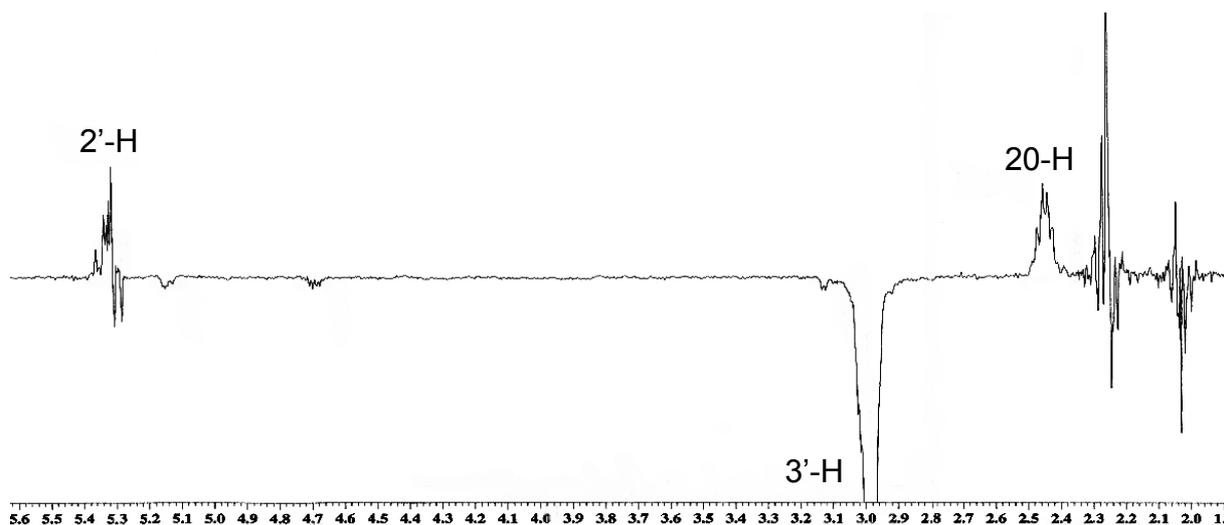
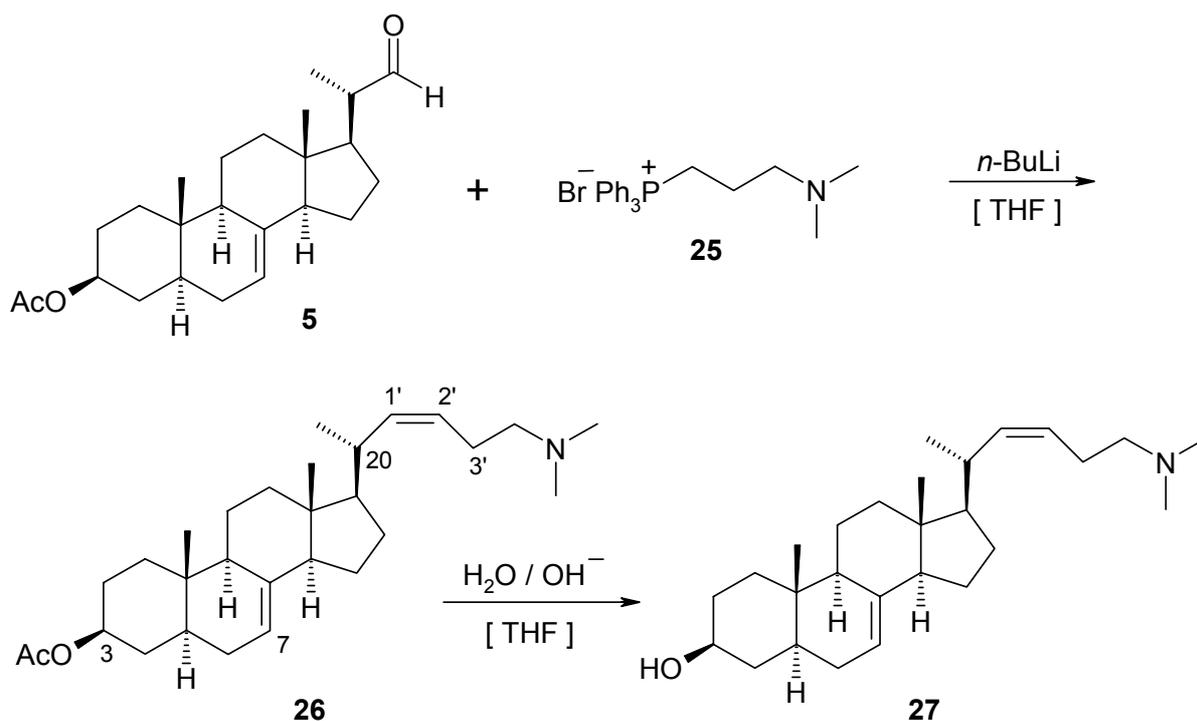


Abb. 23: NOE Differenz-Experiment von **23**, eingestrahlt bei 2.99 ppm (3'-H)

3.2.3 Synthese von (3*S*,20*R*)-3-Acetoxy-20-[4-(*N,N*-dimethylamino)-(Z) but-1-enyl]-pregn-7-en (**26**)

Nach Synthese des Azasteroids **23** wurde in gleicher Weise mit dem Wittig-Reagenz **25** die homologe Verbindung **26** dargestellt. Durch alkalische Hydrolyse des Esters wurde der Alkohol **27** erhalten.



Auch hier lieferte das ^1H -NMR-Spektrum zunächst keinen Hinweis auf die Konfiguration der neu gebildeten Doppelbindung in der Seitenkette, eine Kopplungskonstante der olefinischen Protonen $1'\text{-H}$ und $2'\text{-H}$ konnte wegen Signalüberlagerung nicht bestimmt werden.

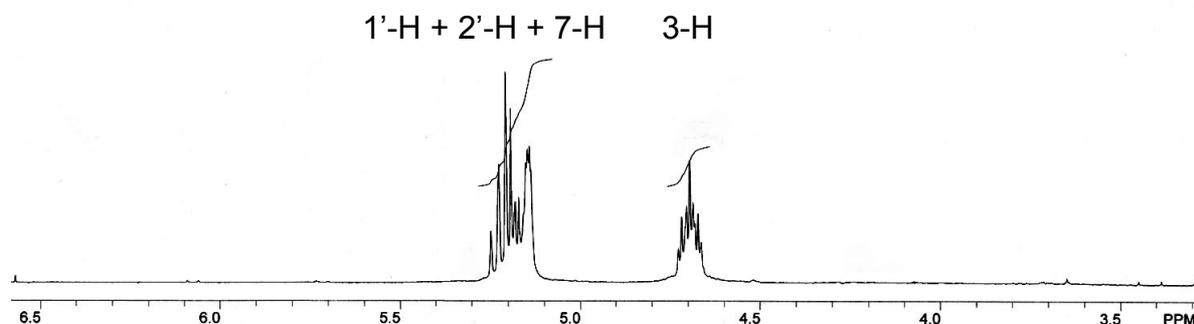


Abb. 24: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **26** (Ausschnitt)

Daraufhin wurde wiederum in einem NOE-Differenz-Experiment versucht, den Nachweis der Stereochemie zu führen. Eingestrahlt wurde bei 2.41 ppm (20-H), was eine Signalverstärkung bei 2.22 ppm ($3'\text{-H}$) zur Folge hatte. Damit liegt auch in diesem Fall Z-Konfiguration vor.

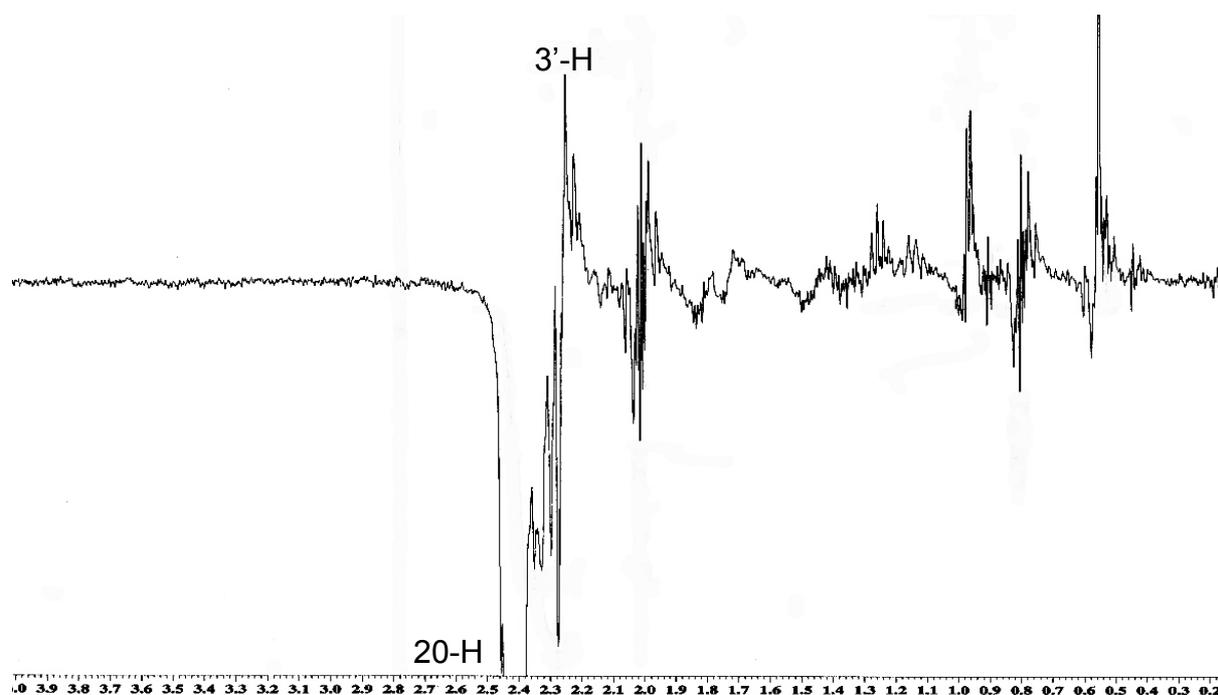
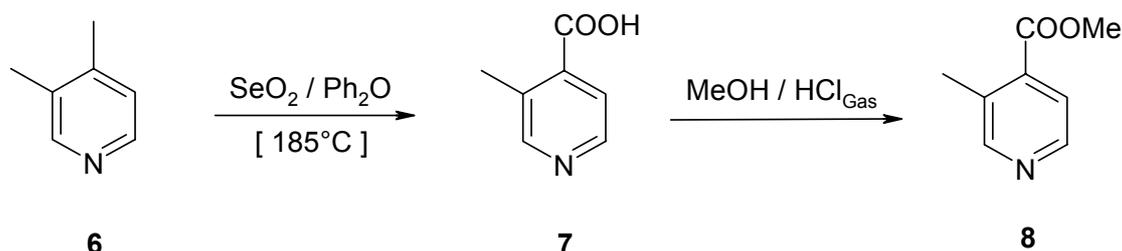


Abb. 25: NOE Differenz-Experiment von **26**, eingestrahlt bei 2.41 ppm (20-H)

3.2.4 Synthese von (3*S*,20*R*)-3-Acetoxy-20-[2-(3-methylpyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en (12)

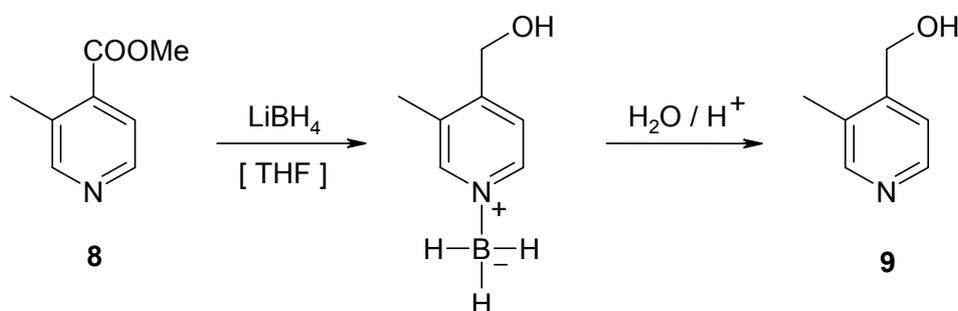
Ausgehend von 3,4-Lutidin (**6**) wurde zunächst die Carbonsäure **7** synthetisiert. Bei der Einwirkung von Selendioxid auf siedende Methylpyridine erfolgt die Oxidation zu den Pyridincarbonsäuren ausschließlich in 2-, 4- und 6-Stellung, was in diesem Fall eine selektive Oxidation in 4-Position ermöglicht, während die Methylgruppe in Position 3 nicht angegriffen wird.^{35,46} Anschließende Veresterung mit HCl-Gas in Methanol führte zum Methylester **8**.



Nach wenig ergiebigen Versuchen mit Lithiumaluminiumhydrid und Natriumborhydrid konnte der Ester **8** schließlich mit Lithiumborhydrid in THF bei Raumtemperatur in guter Ausbeute zum Alkohol **9** reduziert werden.

Dabei wurde zunächst ein Produkt isoliert, welches auf DC einen niedrigeren R_f-Wert zeigte als der Ester, jedoch mit Dragendorffs Reagenz nicht zu detektieren war. Anhand der analytischen Daten konnte ein Boran-Addukt von **9** identifiziert werden.

Im IR-Spektrum zeigte sich dabei eine charakteristische, starke Bor-Wasserstoff-Valenzschwingungsbande bei 2367 cm⁻¹ (Abb. 26). Die anschließende Abspaltung des Borans gelang problemlos durch zweistündiges Rückflußerhitzen mit 2 N-HCl.



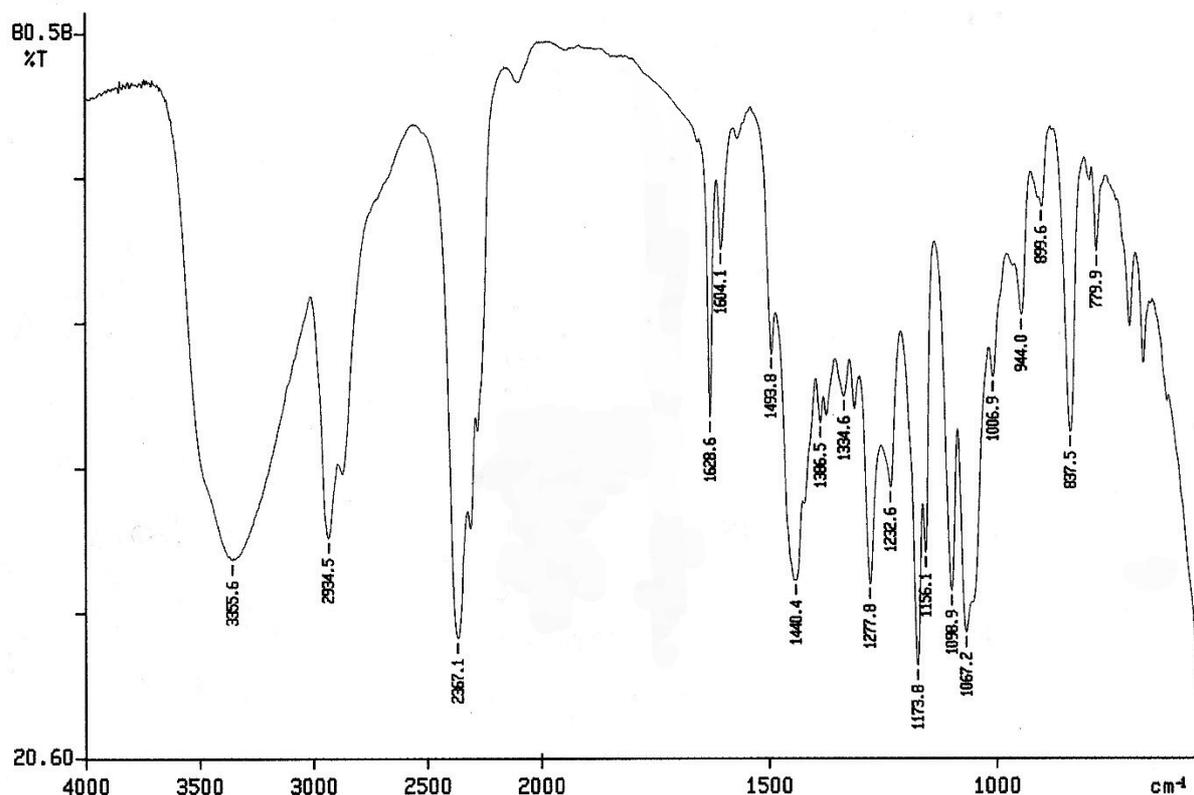
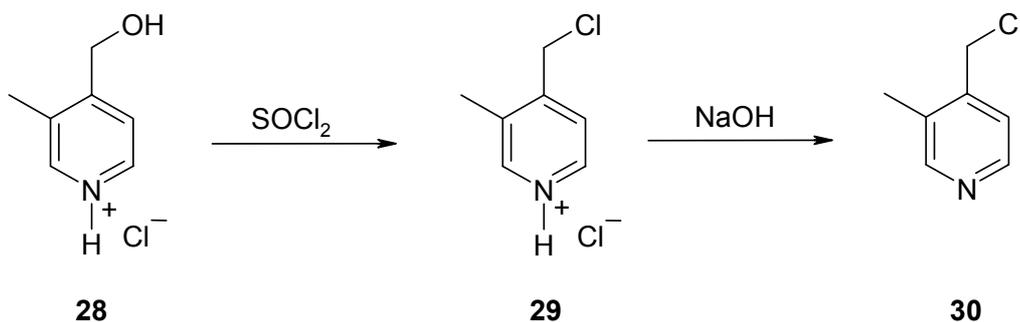
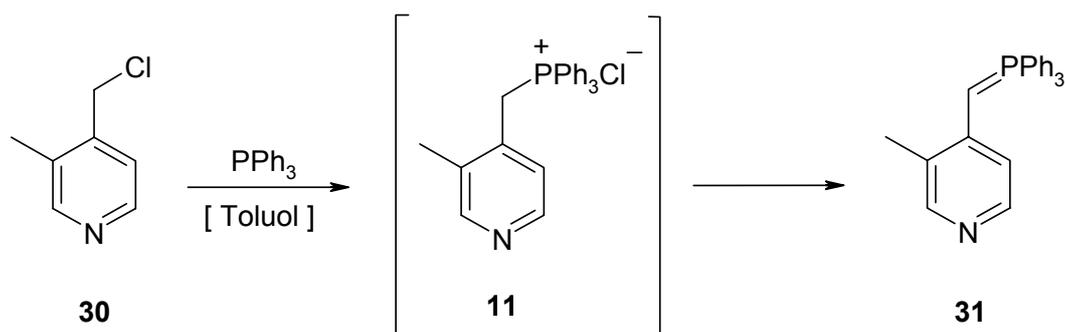


Abb. 26: IR-Spektrum des Boran-Addukts von **9** (in KBr)

Durch Einleiten von HCl-Gas in eine Lösung des Alkohols **9** in Diethylether wurde das Hydrochlorid **28** ausgefällt. Rückflußerhitzen mit Thionylchlorid in Chloroform ergab 4-Chlormethyl-3-methylpyridinhydrochlorid (**29**). Mit Natronlauge konnte daraus das instabile Chlormethylpyridin **30** erhalten werden.



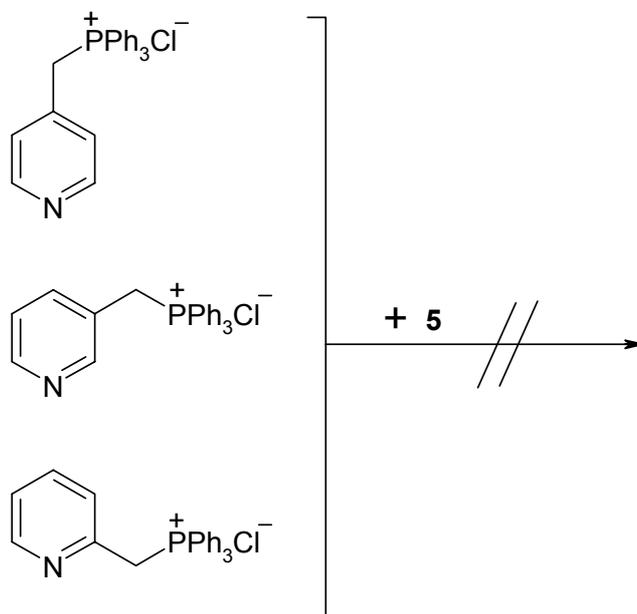
Es wurde nun versucht, **30** zum Wittig-Reagenz umzusetzen. Dabei gelang es jedoch nicht, das Phosphoniumsalz **11** zu isolieren. Durch Abspaltung von HCl bildete sich sofort das Ylid **31**.



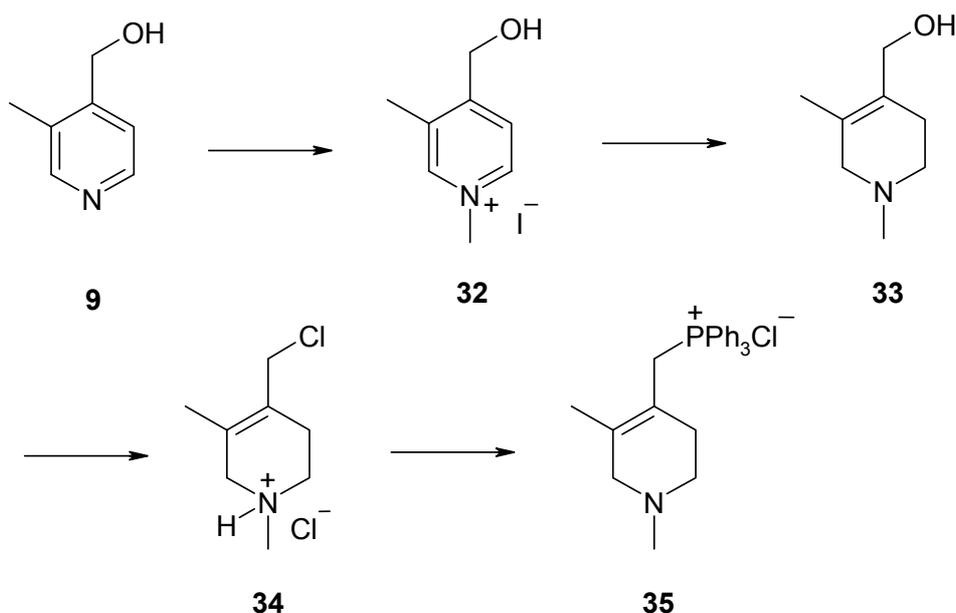
Eine direkte Umsetzung von **31** mit dem Aldehyd **5** führte nicht zum gewünschten Olefin **12**. Dies könnte auf die herabgesetzte Reaktivität des Ylids durch den elektronenziehenden Effekt des Pyridinrings zurückzuführen sein.

Daraufhin wurden Modellreaktionen mit einfacheren Pyridin-Yliden durchgeführt, um geeignete Reaktionsbedingungen zu finden.

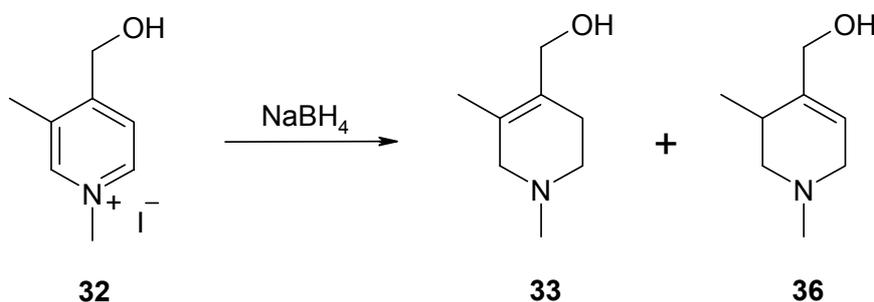
Im Zuge dieser Versuche wurden 2-, 3- und 4-Chlormethylpyridin zu den Wittig-Reagenzien umgesetzt, wobei man auch hier beobachten konnte, daß sehr leicht HCl abgespalten wird und das jeweilige Ylid entsteht. Auch diese Verbindungen ließen sich mit dem Aldehyd **5** nicht in einer Wittig-Reaktion umsetzen.



Um ein Ylid mit höherer Reaktivität zu erhalten, sollte deshalb aus dem Pyridin **9** zunächst das Tetrahydropyridin **33** dargestellt werden, welches anschließend zum Wittig-Reagenz **35** umgesetzt werden sollte.

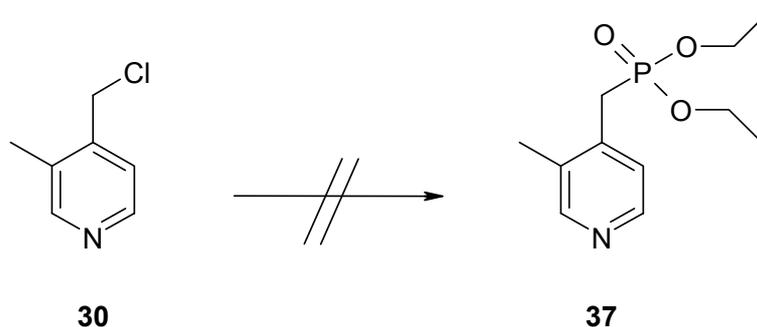


Mit Methyliodid in Aceton wurde zunächst aus **9** das Methoiodid **32** synthetisiert. Die nun folgende NaBH_4 -Reduktion wurde nach einer Vorschrift von *Reimann et al.*³⁶ in einer Mischung aus gleichen Teilen Ethanol und 2 N-NaOH durchgeführt. Damit ist einerseits die Stabilität des Reduktionsmittels erhöht,⁴⁷ andererseits wird bei dieser Alkali-Konzentration der Angriff eines Protons aus dem Lösungsmittel auf das initial entstehende Dihydro-System noch nicht verhindert. Dabei darf die Konzentration der Natronlauge jedoch ein Mol-Äquivalent nicht überschreiten, da ansonsten nur Dihydropyridine entstehen. Aus **32** entstand unter diesen Bedingungen jedoch ein 3 : 1 - Gemisch der Tetrahydropyridine **33** und **36**, welches chromatographisch nicht zu trennen war.

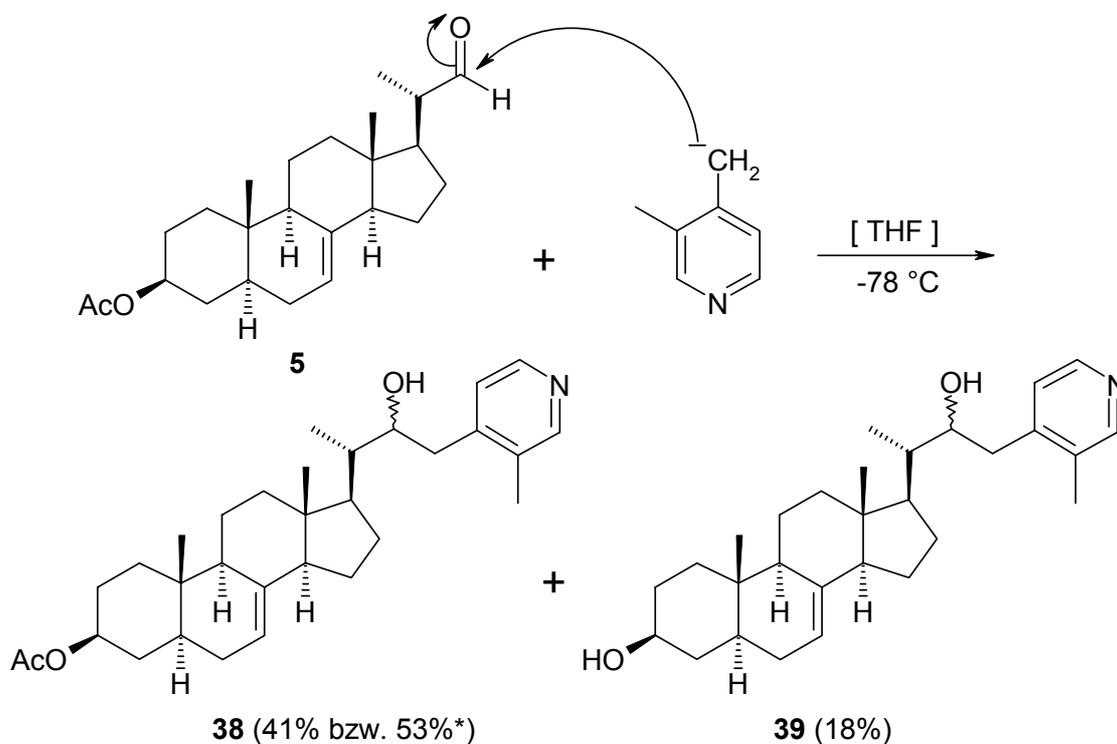


Als nächstes bot sich der Versuch an, aus **30** mit Natriumdiethylphosphit in Toluol die Verbindung **37** zu synthetisieren, um anschließend über eine Wadsworth-Emmons-Reaktion^{48,49} (eine Variante der Wittig-Reaktion) die Seitenkette einzuführen.

Aber auch hier gelang es nicht, eine Umsetzung zu erreichen, so daß es wenig aussichtsreich erschien, die Linie der Carbonyl-Olefinierung weiterzuverfolgen.

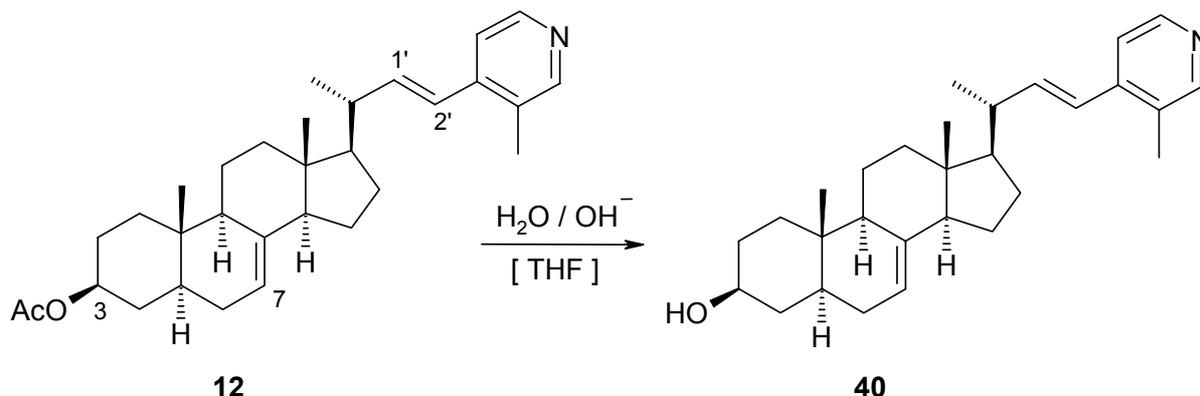


Eine weitere Möglichkeit, die gewünschte Seitenkette zu erhalten, stellt die Reaktion des Aldehyds **5** mit 3,4-Lutidin nach vorheriger Deprotonierung der aciden 4-Methylgruppe dar. Dies gelang mit LDA in THF unter Stickstoff und Eiskühlung. Die Zugabe von **5** erfolgte bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, die anschließende wäßrige Aufarbeitung lieferte den Alkohol **38** als Epimerengemisch. 23% nicht umgesetzter Aldehyd **5** konnten wiedergewonnen werden, außerdem wurde das Nebenprodukt **39** ebenfalls als Epimerengemisch isoliert. **39** resultiert offensichtlich aus der Reaktion des Esters mit überschüssigem lithiiertem Lutidin.



* bezogen auf die Menge an umgesetztem Aldehyd **5**

Dehydratisierung von **38** mit Mesylchlorid / Triethylamin / DBU^{50,51,52} ergab Olefin **12**.
Anschließende Hydrolyse mit 6 N-NaOH / THF lieferte den Alkohol **40**.



Wie schon bei Verbindung **20** (vgl. 3.2.1) konnte auch hier im ¹H-NMR-Spektrum die *E*-Konfiguration der neu gebildeten Doppelbindung anhand der Kopplungskonstante der beiden olefinischen Protonen 1'-H und 2'-H ($J = 15.7 \text{ Hz}$) nachgewiesen werden (Abb. 27).

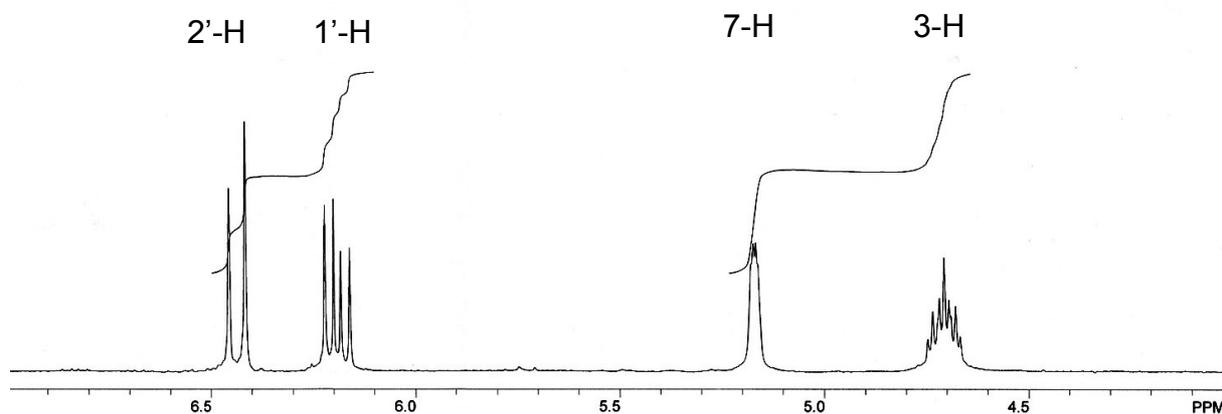
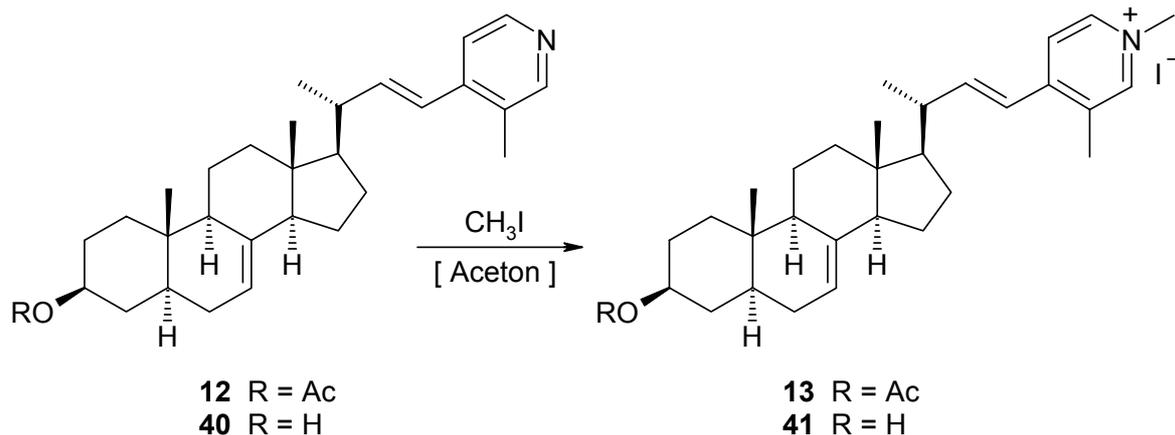


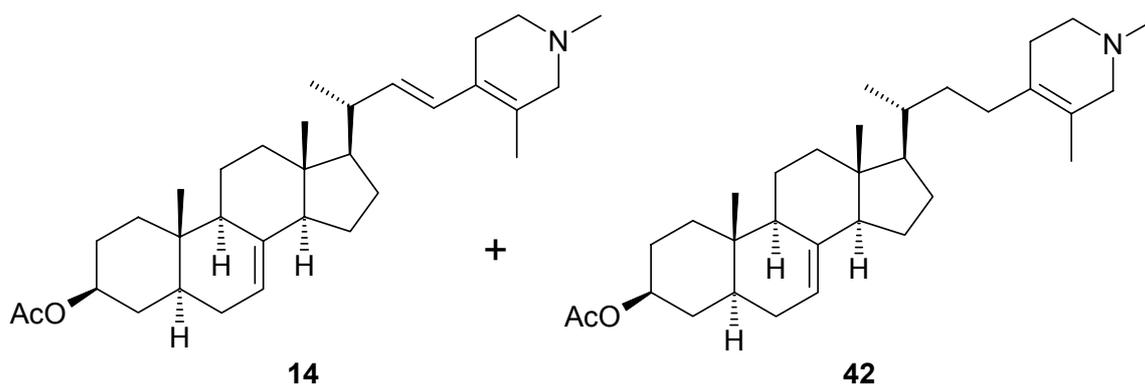
Abb. 27: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **12** (Ausschnitt)

3.2.5 Synthese von (3*S*,20*R*)-20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-3-hydroxypregn-7-en (**15**)

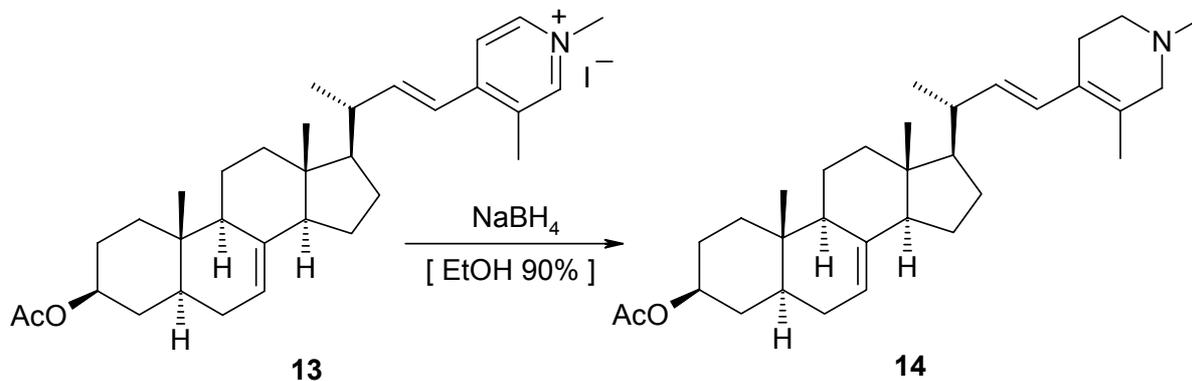
Auch hier wurde zunächst mit Methyljodid in Aceton das Methojodid **13** synthetisiert, welches im Anschluß mit NaBH₄ zum 1,2,5,6-Tetrahydropyridin reduziert werden sollte. In gleicher Weise konnte das Methojodid **41** dargestellt werden.



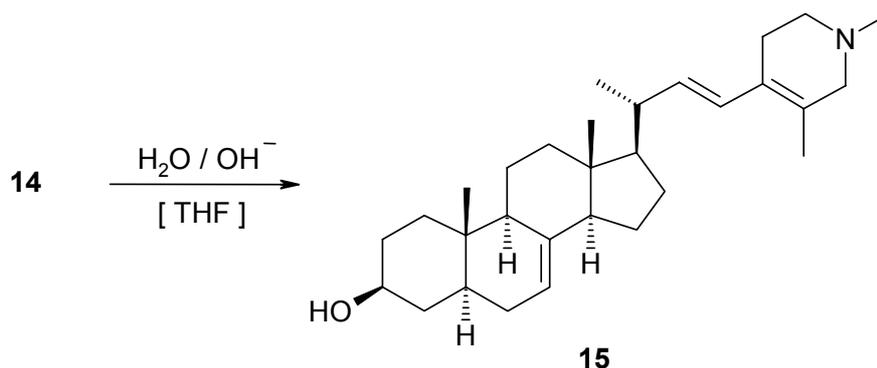
Reduktion von **13** mit NaBH_4 nach der Vorschrift von *Reimann* et al.³⁶ (vgl. 3.2.4) lieferte ein 1 : 1 - Gemisch der Tetrahydropyridine **14** und **42**, welches chromatographisch nicht zu trennen war. Unter diesen Bedingungen wurde zum Teil also zusätzlich die in Konjugation zum Pyridinring stehende Doppelbindung reduziert.



Nach zahlreichen Versuchen, in denen Reduktionsmittel, Lösungsmittel und Alkalikonzentration variiert wurden, gelang es schließlich, mit NaBH_4 in Ethanol 90% (also ohne NaOH -Zusatz) das Tetrahydropyridin **14** in 83% Ausbeute zu erhalten.



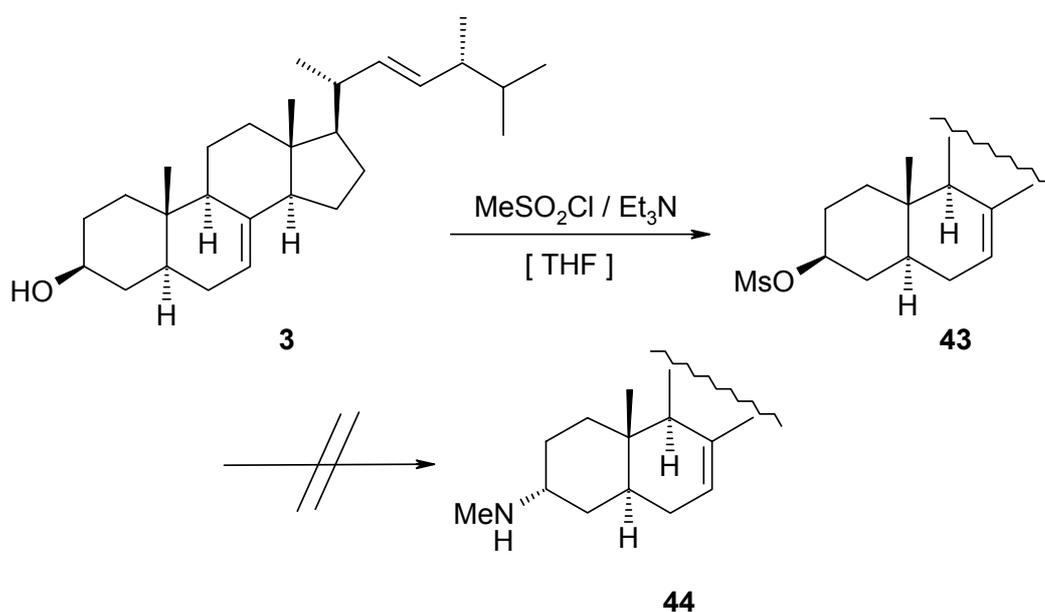
Alkalische Hydrolyse von **14** lieferte den Alkohol **15**.



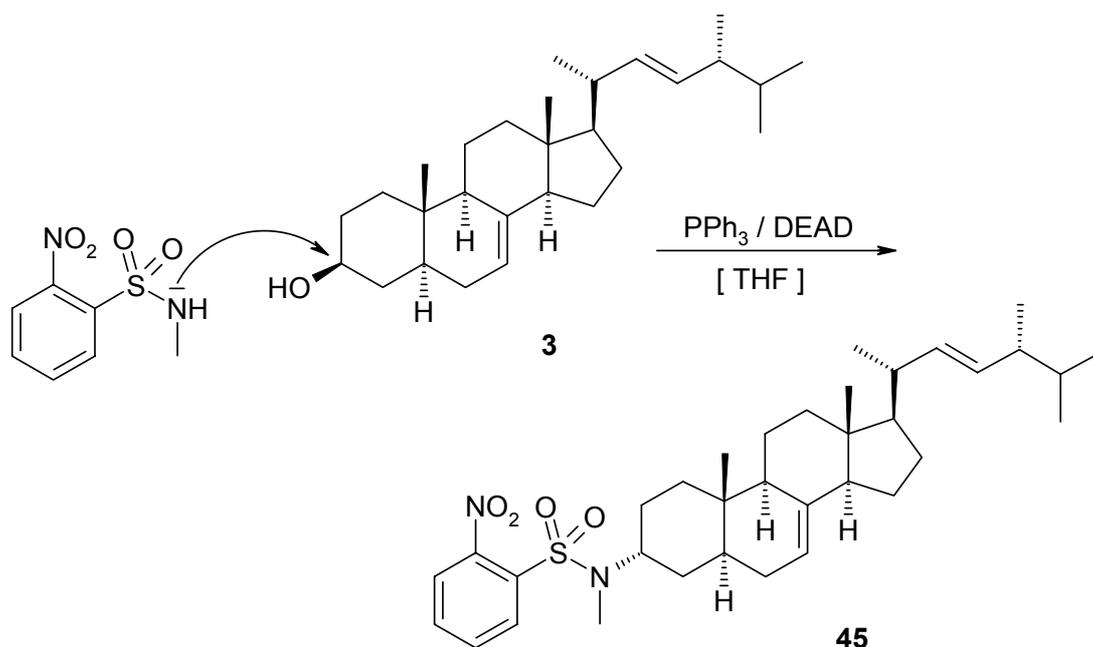
3.3 Substitution und Inversion der Stereochemie in Position 3

3.3.1 Synthese von 3 α -Methylaminoergosta-7,22E-dien (**52**)

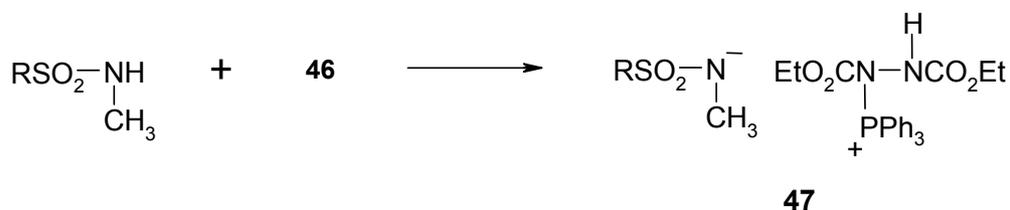
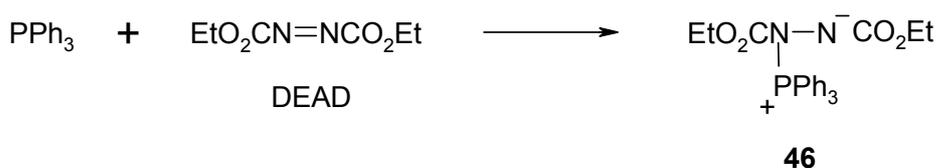
Die Einführung der *N*-Methylamino-Funktion in Position 3 unter Inversion der Stereochemie sollte zunächst in einer Modellreaktion mit 5,6-Dihydroergosterol (**3**) durchgeführt werden. Das Mesylat **43** ließ sich in guter Ausbeute aus **3** mit Methansulfonsäurechlorid und Triethylamin in THF gewinnen. Die geplante weitere Umsetzung mit Methylamin in einer S_N2-Reaktion zu **44** gelang anschließend jedoch trotz zahlreicher Variationen der Reaktionsbedingungen nicht.



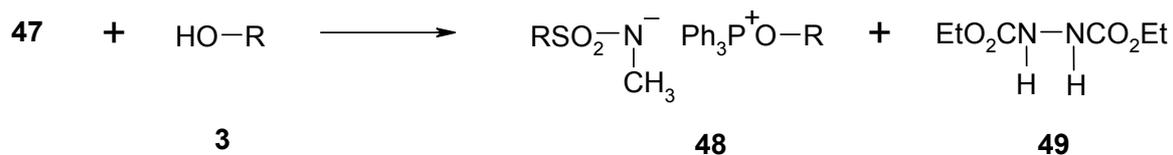
Alternativ wurde deshalb versucht, mit einer Mitsunobu-Reaktion⁴⁰ zum Ziel zu gelangen. So konnte **3** zunächst in Anlehnung an eine Vorschrift von *Fukuyama et al.*⁵³ in THF unter Stickstoff und Mitsunobu-Bedingungen mit *N*-Methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid unter Inversion an C-3 zum Sulfonamid **45** umgesetzt werden.



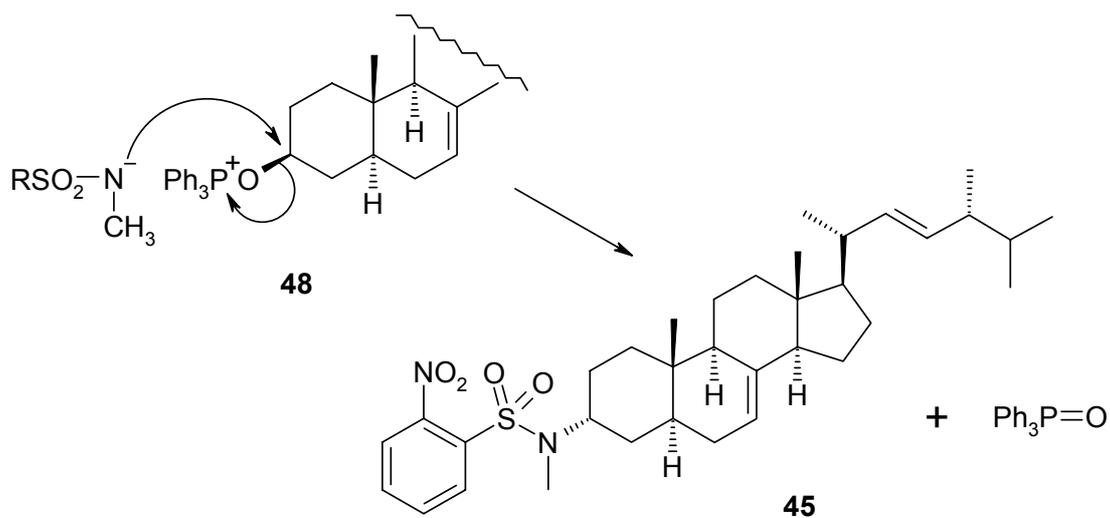
Im ersten Schritt bildet Triphenylphosphan zunächst mit DEAD ein zwitterionisches Addukt (**46**), welches anschließend mit dem Sulfonsäureamid zum Zwischenprodukt **47** umgesetzt wird.



Dieses wiederum reagiert mit dem sekundären Alkohol **3** zum Oxyphosphoniumsalz **48**, in welchem der Alkohol für eine S_N2-Reaktion aktiviert ist, und dem Hydrazin-Derivat **49**.

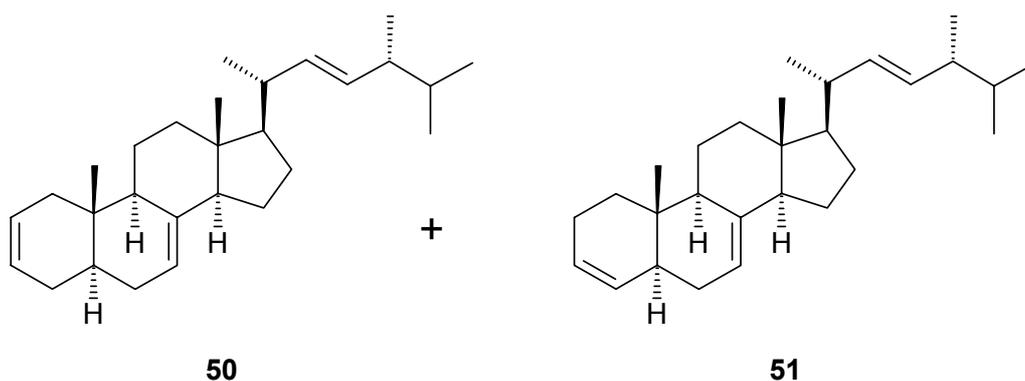


Der nächste Schritt, die Reaktion des Oxyphosphoniumsalzes **48** mit dem deprotonierten Sulfonamid, erfolgt nach einem S_N2-Mechanismus, was mit einer Inversion der Stereochemie an C-3 verbunden ist.

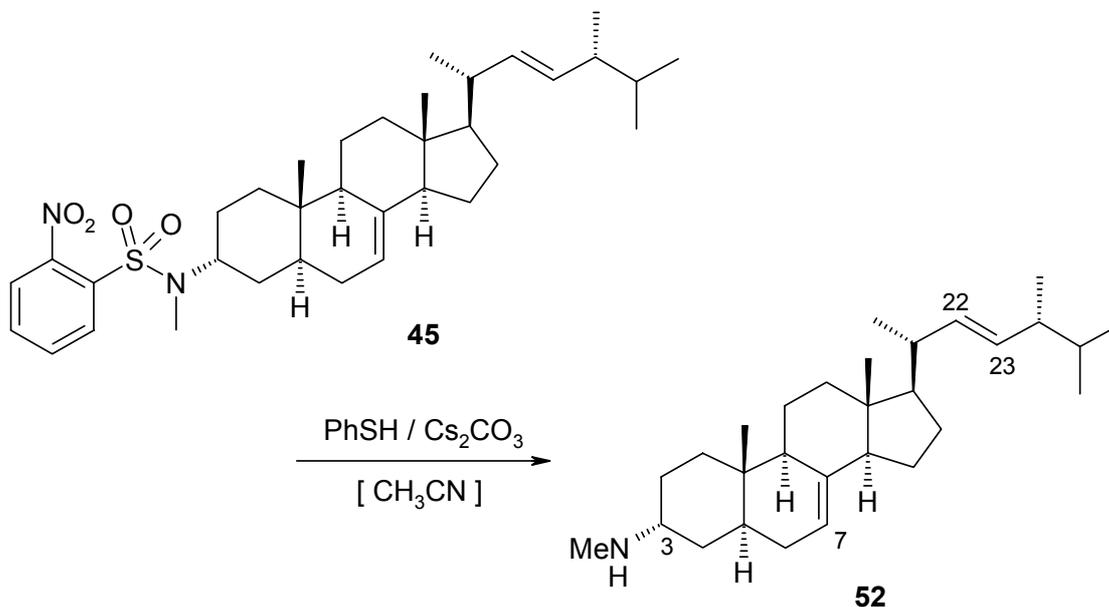


Zusammenfassend kann man die Mitsunobu-Reaktion als Kondensation eines Alkohols mit einem Nucleophil auffassen, wobei Triphenylphosphan zu Triphenylphosphanoxid oxidiert und das Azodicarboxylat zu einem Hydrazinderivat reduziert wird.⁴¹

Das Sulfonamid **45** konnte auf diese Weise in 54% Ausbeute gewonnen werden; außerdem entstand ein Gemisch der Eliminationsprodukte **50** und **51**, welches chromatographisch nicht zu trennen war.



Die anschließende Spaltung des Sulfonamids mit Thiophenol und Cäsiumcarbonat in Acetonitril lieferte das *N*-Methylamin **52**.



Der Nachweis der Konfiguration an C-3 konnte mit Hilfe des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums geführt werden (Abb. 28).

3-H steht nach der Inversion äquatorial am Ring A, so daß die Möglichkeit der vicinalen axial-axial-Kopplung ($^3J_{aa}$ - 7 bis 12 Hz) mit den Nachbarprotonen an C-2 und C-4 wegfällt. Resultat ist ein sehr schmales Signal für 3-H bei 2.72 ppm ($^3J_{ee}$ - 2 bis 5 Hz, $^3J_{ae}$ - 2 bis 5 Hz) im Gegensatz zu einem breiten, symmetrischen Multipllett bei axialer Stellung (vgl. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **12**, Abb. 27)

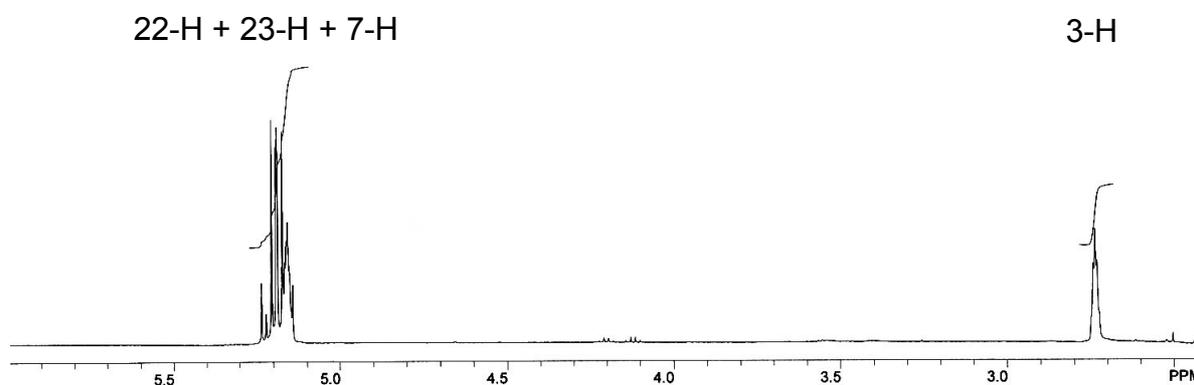
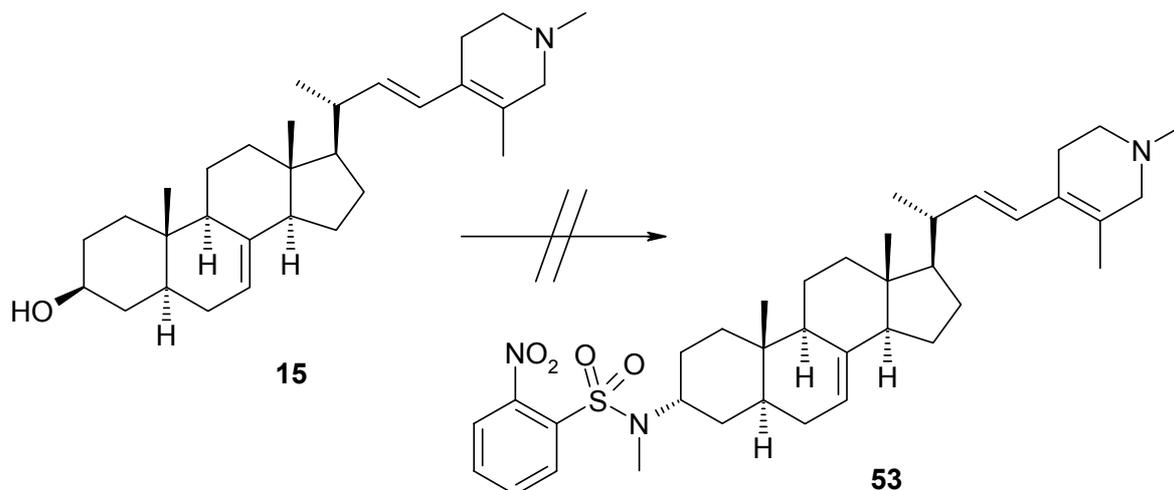


Abb. 28: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **52** (Ausschnitt)

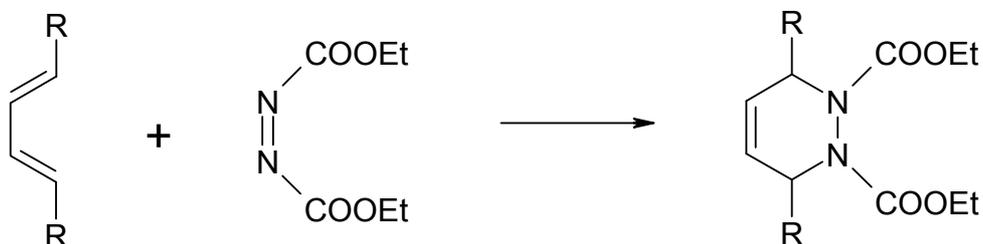
3.3.2 Versuch der Synthese von (3*R*,20*R*)-*N*-{20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en-3-yl}-*N*-methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid (**53**)

Die im Modellversuch mit 5,6-Dihydroergosterol (**3**) erprobte Mitsunobu-Reaktion (siehe Kap. 3.3.1) wurde nun mit dem Tetrahydropyridin **15** durchgeführt. Dabei konnte zwar beobachtet werden, daß sich **15** vollständig umsetzt, es ließ sich jedoch kein definierbares Produkt isolieren.



Da das Grundgerüst der beiden Sterole **3** und **15** identisch ist, mußte die Ursache für das Mißlingen dieser Reaktion in der Struktur der Seitenkette zu finden sein. Das tertiäre Amin sollte hierbei kein Problem darstellen, so daß offensichtlich das konjugierte Dien den Reaktionsverlauf stört.

Diethylazodicarboxylat ist ein Dienophil und kann in Hetero-Diels-Alder-Reaktionen mit konjugierten Dienen zu Tetrahydropyridazinen reagieren.^{54,55,56}

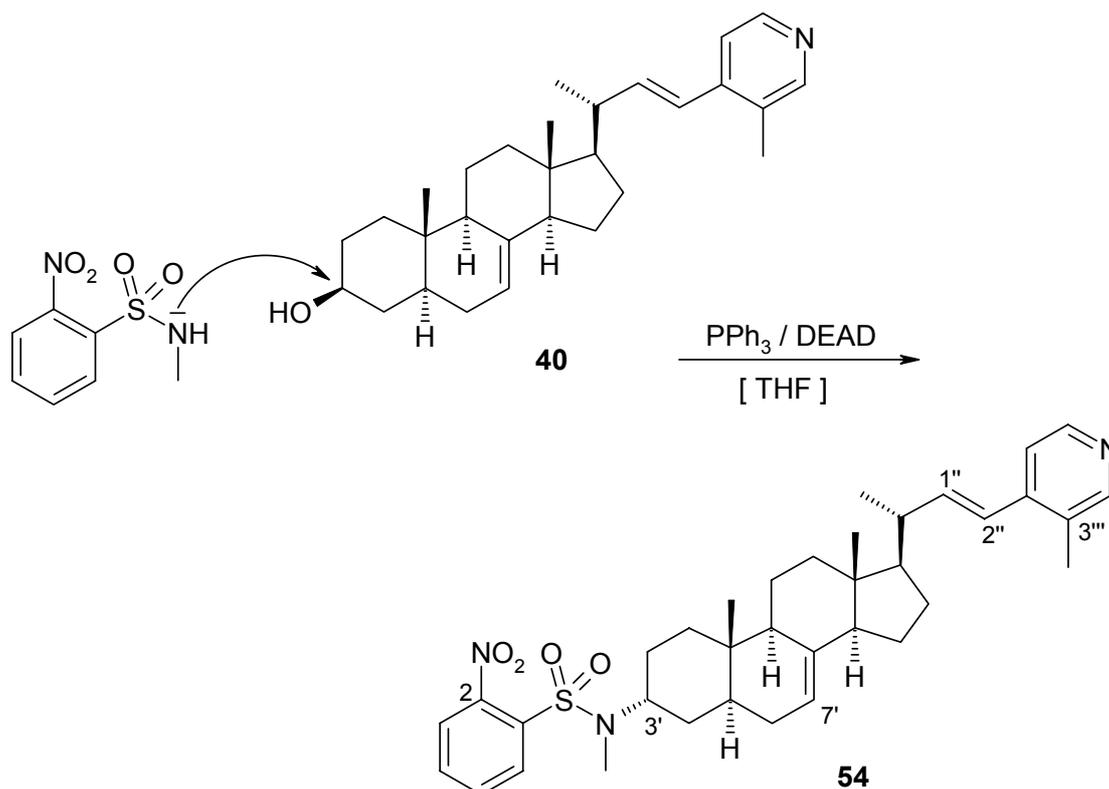


Eine Cycloaddition von DEAD mit dem konjugierten Dien in der Seitenkette ist also offenbar der Grund für das Scheitern der Versuche, die *N*-Methylamino-Funktion

an C-3 unter Mitsunobu-Bedingungen ausgehend vom Tetrahydropyridin **15** einzuführen.

3.3.3 Synthese von (3*R*,20*R*)-*N*-{20-[2-(3-Methylpyridin-4-yl)-(*E*)-ethenyl]-pregn-7-en-3-yl}-*N*-methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid (**54**)

Als Konsequenz der Ergebnisse von 3.3.1 und 3.3.2 wurde nun die Mitsunobu-Reaktion mit *N*-Methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid zu einem früheren Zeitpunkt der Synthese, und zwar noch vor der Darstellung des Methiodids **13**, durchgeführt. Dadurch kam die unerwünschte Dienophil-Reaktivität von DEAD nicht zum Tragen. Das Sulfonamid **54** konnte so in 60% Ausbeute gewonnen werden.



Die Inversion an C-3' konnte wiederum mit Hilfe des ¹H-NMR-Spektrums nachgewiesen werden (Abb. 29). 3'-H (äquatorial) erscheint auch hier als sehr schmales Multipllett im Gegensatz zu einem breiten symmetrischen Signal, welches bei axialer Stellung aufgetreten wäre.

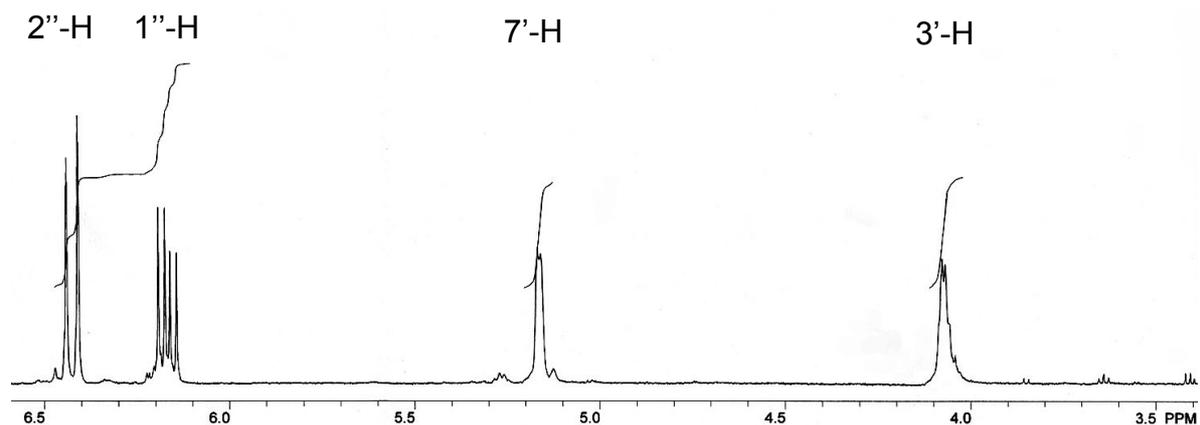
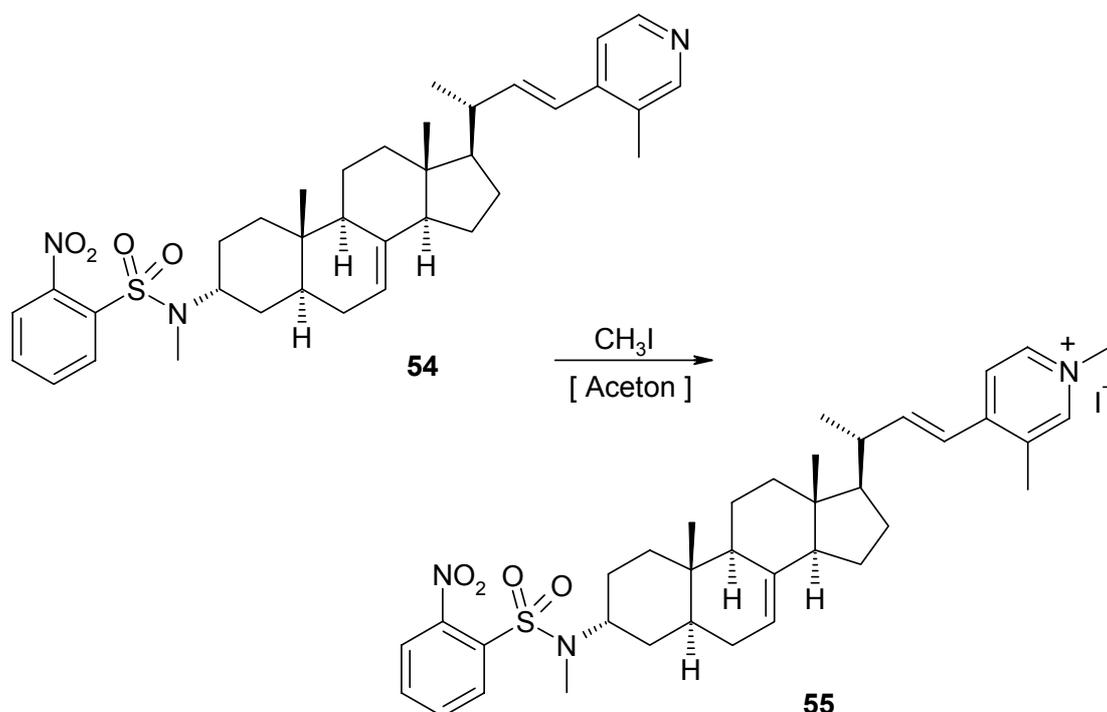
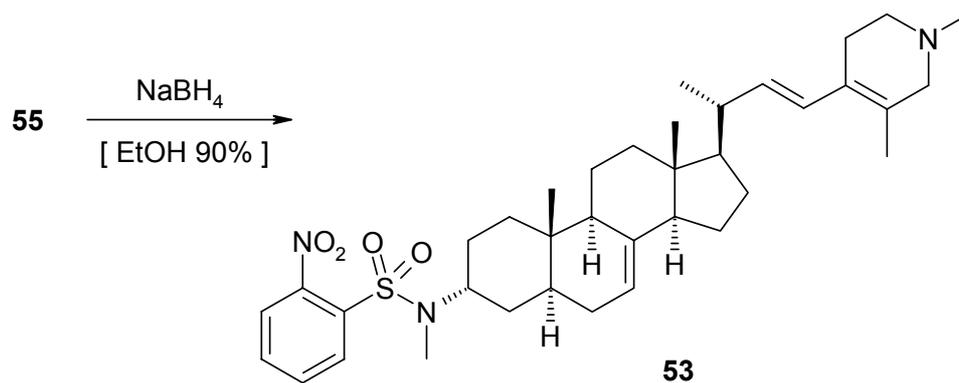


Abb. 29: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **54** (Ausschnitt)

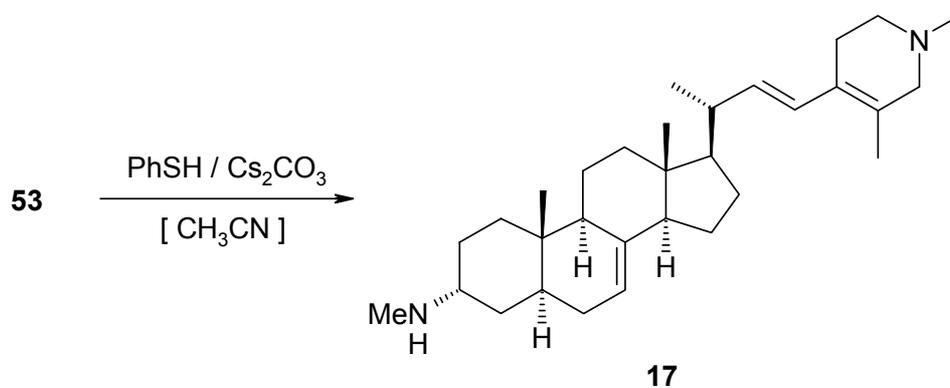
3.3.4 Synthese von (3*R*,20*R*)-20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-3-methylaminopregn-7-en (*Plakinamin B*) (**17**)

Im weiteren Verlauf wurde das Sulfonamid **54** zunächst nach der schon in Kap. 3.2.5 beschriebenen Methode zum Methiodid **55** und anschließend mit NaBH_4 zum Tetrahydropyridin **53** umgesetzt.





Die thiolitische Spaltung des Sulfonamids **53** mit Thiophenol / Caesiumcarbonat in Acetonitril führte schließlich zum Steroid-Alkaloid *Plakinamin B* (**17**).



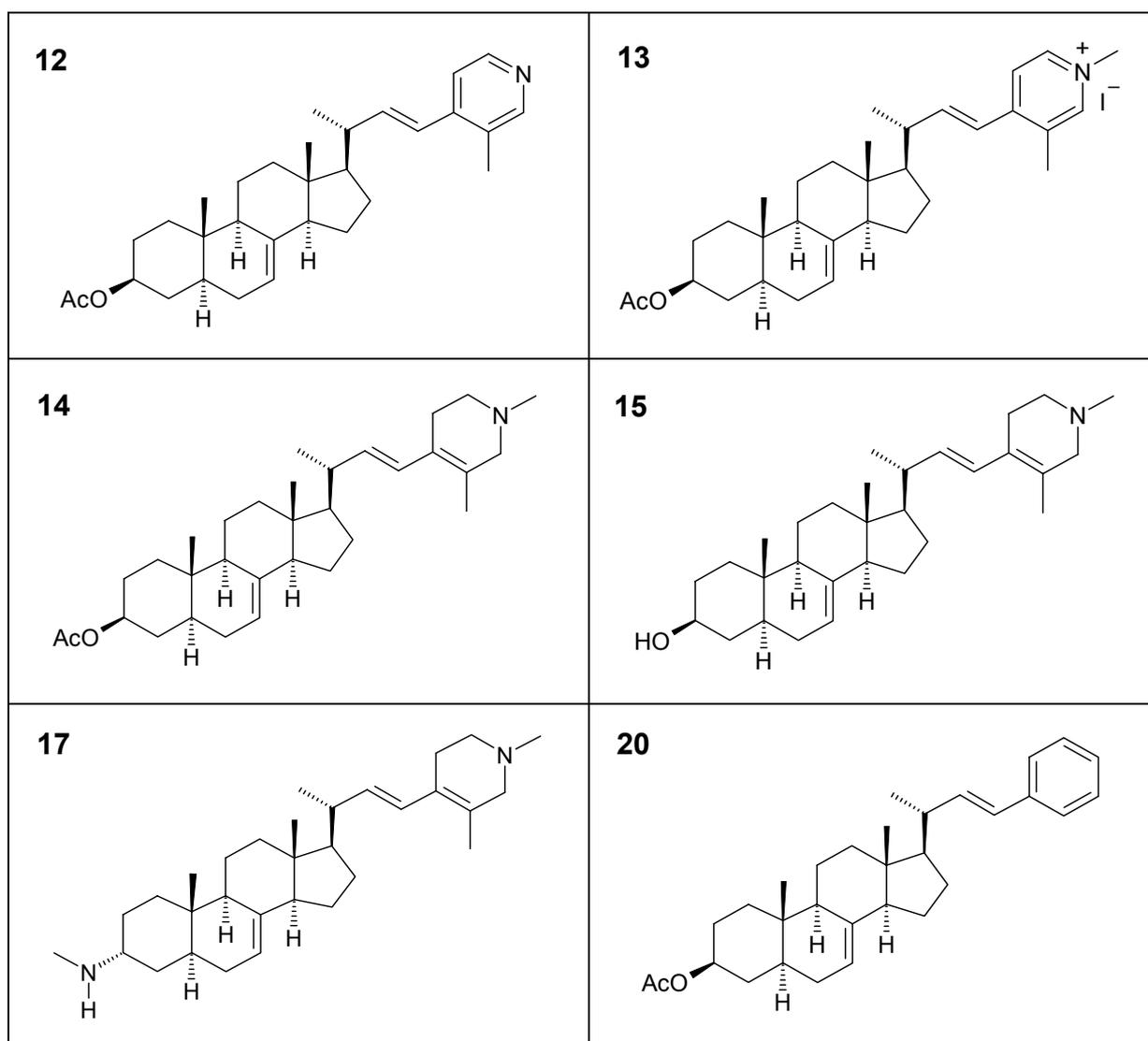
Alle analytischen Daten des Produkts **17** stimmen mit den Angaben in der Literatur²⁵ überein.

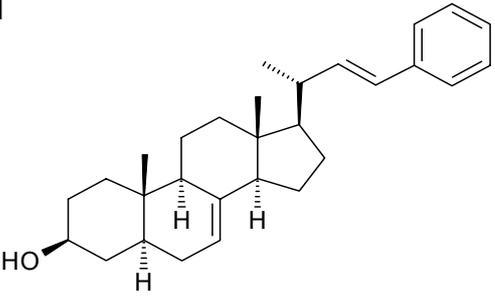
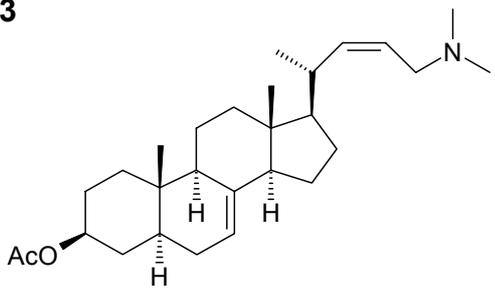
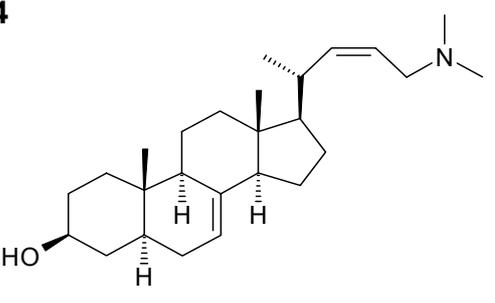
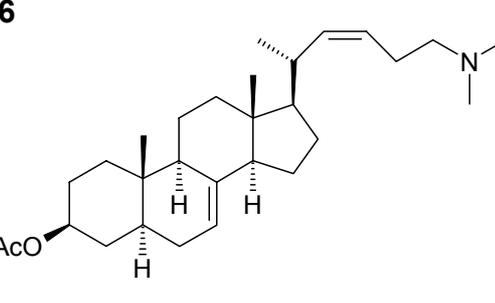
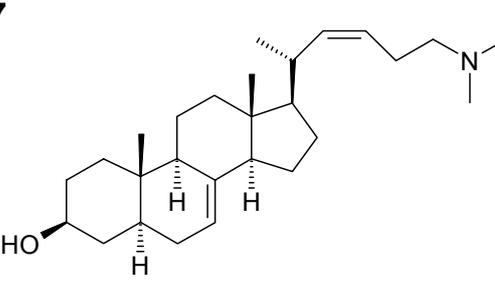
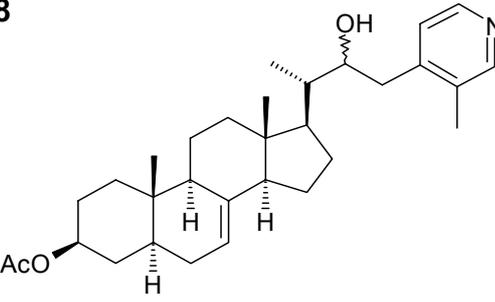
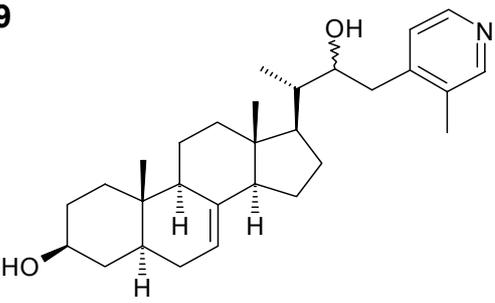
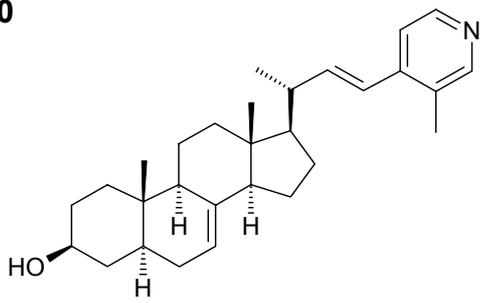
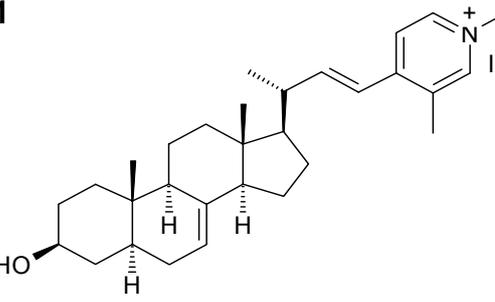
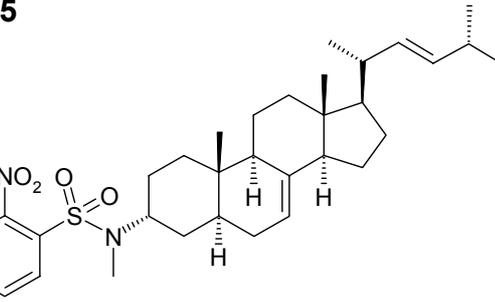
4 Biologische Testung

4.1 Agar-Diffusionstest

Die folgenden synthetisierten Verbindungen (Tabelle 2) wurden an einer Reihe von Modellkeimen im Agar-Diffusionstest auf antimikrobielle Aktivität getestet.

Dieser Test dient lediglich dem grundsätzlichen Erkennen einer antimikrobiellen Aktivität. Quantitative Aussagen sind aus den gemessenen Hemmhofradien nur begrenzt abzuleiten. Die Verbindungen, die sich bei diesem Test als wirksam erweisen, müssen anschließend in einem umfassenderen Screening weiter untersucht werden.



<p>21</p> 	<p>23</p> 
<p>24</p> 	<p>26</p> 
<p>27</p> 	<p>38</p> 
<p>39</p> 	<p>40</p> 
<p>41</p> 	<p>45</p> 

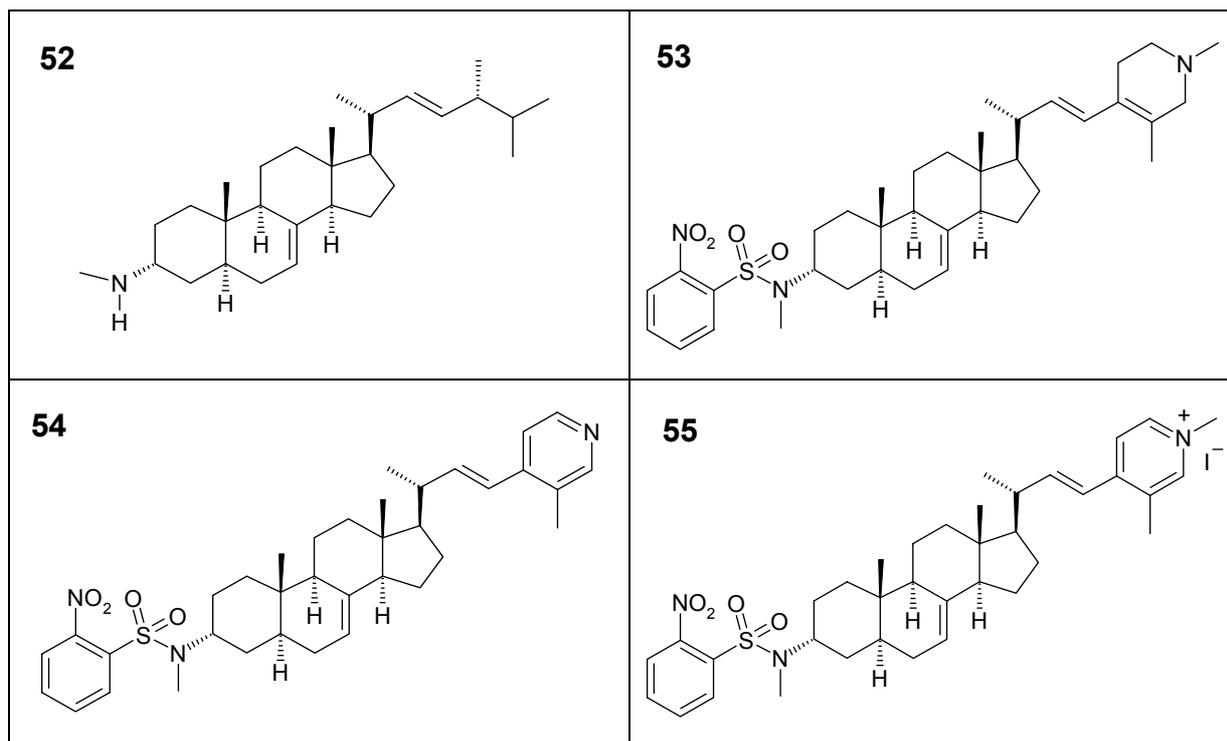


Tabelle 2

Folgende Mikroorganismen wurden beim Agar-Diffusionstest verwendet:

<i>Escherichia coli</i>	- gramnegatives Bakterium
<i>Staphylococcus hominis</i>	- grampositives Bakterium
<i>Pseudomonas antimicrobia</i>	- gramnegatives Bakterium
<i>Hyphopichia burtonii</i>	- Hefe
<i>Yarrowia lipolytica</i>	- Hefe
<i>Aspergillus niger</i>	- Ascomycet
<i>Candida glabrata</i>	- Hefe

Die praktische Durchführung des Agar-Diffusionstests wird im Experimentellen Teil beschrieben.

4.1.1 Testergebnisse

In der nachfolgenden Tabelle sind die ermittelten Hemmhofdurchmesser (Totaler Hemmhof) aufgelistet. Die Angabe erfolgt in Millimetern.

Subst.- Nr.	Esch. coli	Staph. hom.	Pseud. antimicr.	Hyphop. burtonii	Yarrowia lip.	Asperg. niger	Candida glabr.
12	---	---	---	---	---	---	---
13	10	10	7	11	12	7	11
14	---	---	---	9	6	---	6
15	---	---	---	10	7	---	7
17	14	12	12	28	19	8	18
17xHCl	13	13	12	28	17	8	17
20	---	---	---	---	---	---	---
21	---	---	---	---	---	---	---
23	7	7	7	13	8	---	8
24	6	6	6	15	6	---	7
26	---	---	---	15	8	---	---
27	---	---	---	8	8	---	---
38	---	---	---	---	---	---	---
39	---	---	---	---	---	---	---
40	---	---	---	---	---	---	---
41	9	9	10	12	11	7	11
45	---	---	---	---	---	---	---
52	---	---	---	---	---	---	---
53	---	---	---	---	---	---	---

54	---	---	---	---	---	---	---
55	9	7	6	15	11	---	10

Als Referenzsubstanzen wurden Tetracyclin (Tetr.) und Clotrimazol (Clotr.) eingesetzt.

Tetr.	16	14	30	---	---	---	---
Clotr.	---	---	---	30	12	10	11

Tabelle 3: Agar-Diffusionstest



Abb. 30: Agar-Diffusionstest mit *Yarrowia lipolytica*

Die 24-Azasteroide **23** und **24** sowie die quartären Pyridiniumsalze **13**, **41** und **55** zeigten hierbei eine gleichermaßen breite Aktivität gegen die getesteten Bakterien und Hefepilze, während die 25-Azasteroide **26** und **27** sowie die Tetrahydropyridine **14** und **15** selektiv gegen Hefepilze wirken. Sehr starke Breitbandaktivität wiederum ist bei *Plakinamin B* (**17**) und dessen Hydrochlorid festzustellen.

Unwirksam waren Steroide mit N-freier aromatischer Seitenkette (**20** und **21**), Pyridinseitenkette (**12**, **38**, **39** und **40**), aliphatischer Seitenkette und 3 α -Sulfonamid bzw. 3 α -Methylamino-Funktion (**45** und **52**) sowie das Tetrahydropyridin **53** mit 3 α -Sulfonamid-Funktion.

4.2 SBI-Screening

Das Testsystem wurde 2002 von J. Müller in unserer Arbeitsgruppe entwickelt.⁵⁷ Sein Grundprinzip besteht in der Inkubation eines Testorganismus (*Yarrowia lipolytica*) unter Zugabe subletaler Dosen des zu testenden Wirkstoffes. Infolge einer Wachstumshemmung durch den Wirkstoff ist der Testorganismus zwar noch in der Lage zu wachsen, zugleich aber in seinem normalen Sterolanabolismus beeinträchtigt, weil benötigte Enzyme nicht mehr bzw. nur noch eingeschränkt in der Lage sind, ihre Substrate umzusetzen. Diese Beeinträchtigung hat zur Folge, daß

1. Ergosterolbiosynthese-Zwischenstufen akkumulieren, weil sie nicht weiter umgesetzt werden können,
2. häufig alternative Biosyntheserouten beschritten werden, die unter Auslassung des inhibierten enzymatischen Schrittes zu anormalen, oft für den Inhibitionstyp charakteristischen Sterolen führen,
3. und in letzter Konsequenz, in Folge eines Mangels an Ergosterol und/oder Anreicherung großer Mengen toxischer Substanzen (Squalen) oder nicht für die Aufrechterhaltung der Membranfunktion geeigneter Sterole, daß mit zunehmender eingesetzter Wirkstoffkonzentration das Wachstum des Testorganismus eingeschränkt wird oder sogar ausbleibt.

Nach erfolgter Inkubation wird die gebildete Biomasse vom Nährmedium getrennt, ihr Trockengewicht bestimmt und anschließend durch alkalische Hydrolyse aufgeschlossen. Die Gesamtfraktion der während der Inkubation gebildeten Sterole wird extrahiert und mit Hilfe chromatographischer Methoden untersucht. Die graphische Bestimmung der Konzentration, welche zur Halbierung der Biomasse gegenüber der Kontrolle führt, liefert den EC₅₀-Wert („*Effective Concentration*“). Er

kann als Maßstab für die Wirkstärke herangezogen werden im Vergleich zu anderen Substanzen, welche unter denselben Bedingungen getestet wurden.

Bevor eine Bewertung neuer potentieller Wirkstoffe erfolgen kann, muß die Methode „geeicht“ und auf ihre Aussagekraft hin überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden kommerzielle, in Medizin und Landwirtschaft genutzte Wirkstoffe mit bekannten Zielenzymen als Referenzsubstanzen eingesetzt, das von ihnen nach Inkubation und Aufarbeitung erzeugte Sterolmuster auf neue, charakteristische Sterole untersucht und die Ergebnisse, soweit möglich, mit denen aus der Literatur verglichen.

Zur Absicherung wurden noch weitere Referenzsubstanzen mit demselben Wirkmechanismus getestet und geprüft, ob sich in diesem Fall die gleiche Zuordnung zum potentiellen Zielenzym treffen läßt.

Enzym	Inhibitoren	akkumulierte Substanzen
Squalenepoxidase	Allylamine	Squalen
Sterol-C-14-Demethylase	Azole	Lanosterol
Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase	Morpholine	Δ^8 -Sterole
Sterol- Δ^{14} -Reduktase	Morpholine	$\Delta^{8,14}$ -Sterole

Tabelle 4: Ermittelte Sterolmuster nach Inkubation mit bekannten SBI's

Auf Basis der so gewonnenen Referenzsterolmuster von bekannten Inhibitoren können im Anschluß neue, noch nicht charakterisierte Substanzen entweder bekannten Sterolmustern (und damit Zielenzymen) zugeordnet, oder neue Angriffspunkte in der Ergosterolbiosynthese aufgezeigt werden.

Das Testsystem ermöglicht es, eine klare Aussage zu treffen, ob ein Wirkstoff in die Ergosterolbiosynthese eingreift oder nicht. Ferner ist es in der Lage, auf Grund der analysierten Sterolmuster dem getesteten Wirkstoff einen (oder mehrere) Angriffspunkt(e) zuzuordnen. Dies geschieht im Allgemeinen durch Abgleich mit Daten, welche aus Inkubationsversuchen mit bekannten Ergosterolbiosynthese-Inhibitoren gewonnen wurden.

Es ist jedoch auch möglich, Wirkstoffe zu charakterisieren, welche neue Angriffspunkte haben, die noch nicht literaturbekannt sind, oder sie zumindest von den bekannten abzugrenzen. Durch den Zusatz eines internen Standards während der Probenaufarbeitung kann das System prinzipiell auch für eine quantitative Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden. Die praktische Durchführung der Testmethode wird im Experimentellen Teil beschrieben.

4.2.1 Testergebnisse

Die wirksamsten Verbindungen aus dem Agar-Diffusionstest wurden auf eine eventuelle Hemmung der Sterolbiosynthese getestet. Beim Screening konnten prinzipiell zwei unterschiedliche Wirkmechanismen festgestellt werden.

1. Hemmung der Sterol-C-24- Methyltransferase (SMT)

Die Azasteroide **23**, **24** und **27** ($EC_{50} \sim 2.0$, 0.2 bzw. $0.4 \mu\text{g/ml}$, vgl. EC_{50} von Clotrimazol $\sim 1.0 \mu\text{g/ml}$) zeigten eine ausgeprägte Hemmung des Wachstums des Modellkeims *Yarrowia lipolytica* und eine signifikante Veränderung des Sterolmusters. Neben kleinen Mengen nicht identifizierter Sterole akkumulierte in besonderem Maße Cholesta-5,7,24-trienol (Abb. 31).

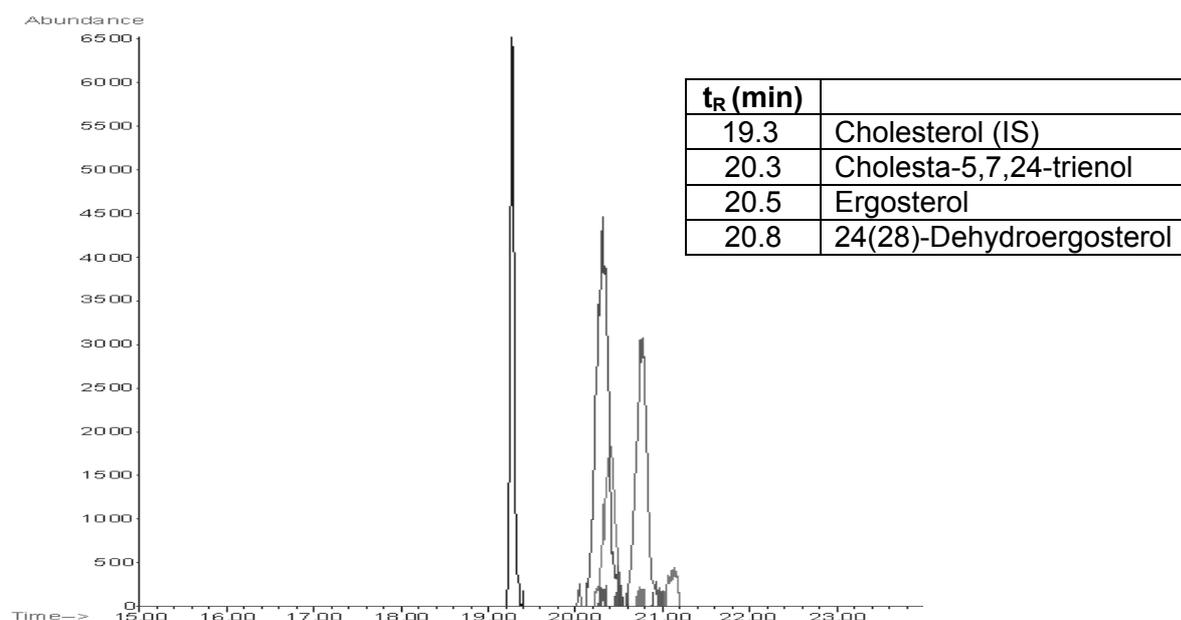


Abb. 31: Sterolmuster nach Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit **24**

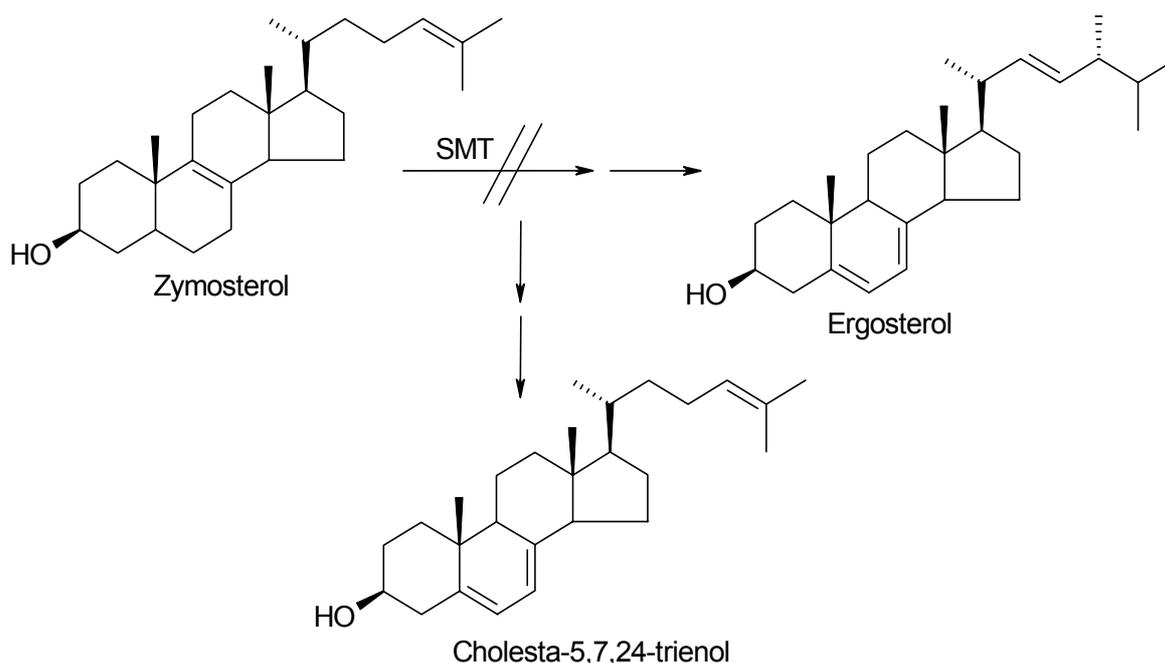
Dies belegt eine Inhibition der Sterol-C-24-Methyltransferase, also des Enzyms, welches die Sterolseitenkettenmethylierung katalysiert. Da diese 4 Verbindungen strukturell große Ähnlichkeit mit den in Abb. 18 gezeigten bekannten SMT-Inhibitoren haben, war dieses Resultat auch nicht sonderlich überraschend.

Auch für das quartäre Pyridiniumsalz **41** ($EC_{50} \sim 0.3 \mu\text{g/ml}$) sowie das Tetrahydropyridin **15** ($EC_{50} \sim 1.0 \mu\text{g/ml}$) konnte dieses Zielenzym eindeutig nachgewiesen werden.

Plakinamin B (**17**), welches dieselbe Seitenketten-Struktur aufweist und sich von **15** nur durch die 3α -Methylamino- an Stelle der 3β -Hydroxy-Funktion unterscheidet, konnte leider im SBI-Screening nicht charakterisiert werden. In drei Versuchen konnte im Gegensatz zum Agar-Diffusionstest mit *Yarrowia lipolytica* keine Wachstumshemmung beobachtet werden, so daß eine Auswertung des Sterolmusters nicht vorgenommen werden konnte.

Es ist jedoch auf Grund der Strukturähnlichkeit anzunehmen, daß es sich auch bei *Plakinamin B* um einen Hemmstoff der Sterol-C-24-Methyltransferase handelt.

Das anormale Sterol Cholesta-5,7,24-trienol gibt ein Beispiel für die offensichtlich begrenzte Substratspezifität der Enzyme der Ergosterolbiosynthese, denn ungeachtet der ausbleibenden C-24-Methylierung kann das Δ^8 -Substrat Zymosterol weiter bis zu einer dem Ergosterol entsprechenden $\Delta^{5,7}$ -Funktionalisierung umgesetzt werden.



2. Hemmung der Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

Mit einem EC_{50} -Wert von 0.8 $\mu\text{g/ml}$ zeigte das quartäre Pyridiniumsalz **13** ebenfalls ausgeprägte Aktivität gegen *Yarrowia lipolytica*.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Substanzen ergab sich jedoch ein völlig anderes Sterolmuster. Hier akkumuliert vor allem 24(28)-Dehydroergosterol, die unmittelbare Biosynthesevorstufe von Ergosterol (Abb. 32).

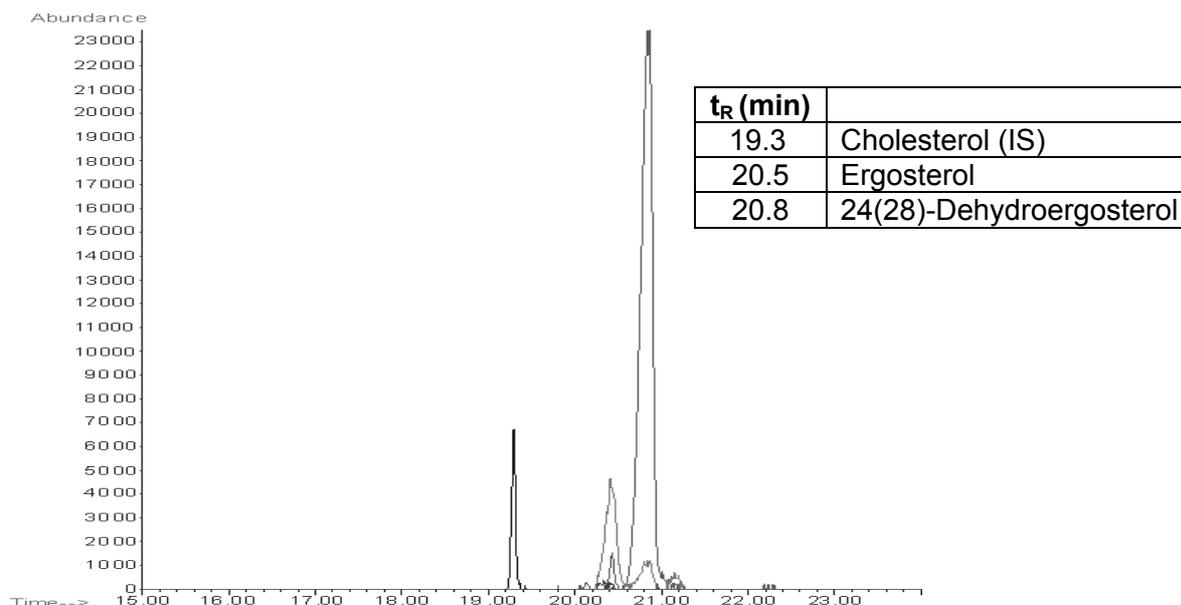


Abb. 32: Sterolmuster nach Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit **13**

Offensichtlich erfolgt hier ausschließlich eine Hemmung des letzten Enzyms der Ergosterol-Biosynthese, der Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase. Dieses Ergebnis war durchaus überraschend, da das ansonsten strukturgleiche, jedoch nicht acetylierte quartäre Pyridiniumsalz **41** als Inhibitor der Sterol-C-24-Methyltransferase wirkt.

Selektive Inhibitoren der Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase sind nach meinem Kenntnisstand bisher noch nicht beschrieben worden und so wären weitere Untersuchungen in dieser Richtung von besonderem Interesse.

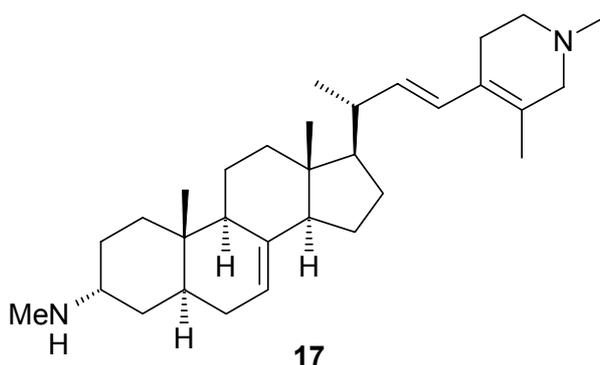
5 Zusammenfassung

Ein wichtiges Target bei der Entwicklung neuer antimykotisch wirksamer Verbindungen ist die Inhibierung der Ergosterolbiosynthese. Ergosterol trägt als ein wesentlicher Bestandteil der Pilzzellmembran zur Membranfluidität bei. Neben dieser sogenannten „bulk“-Funktion übernimmt Ergosterol in der Pilzzelle auch hormonelle Aufgaben.

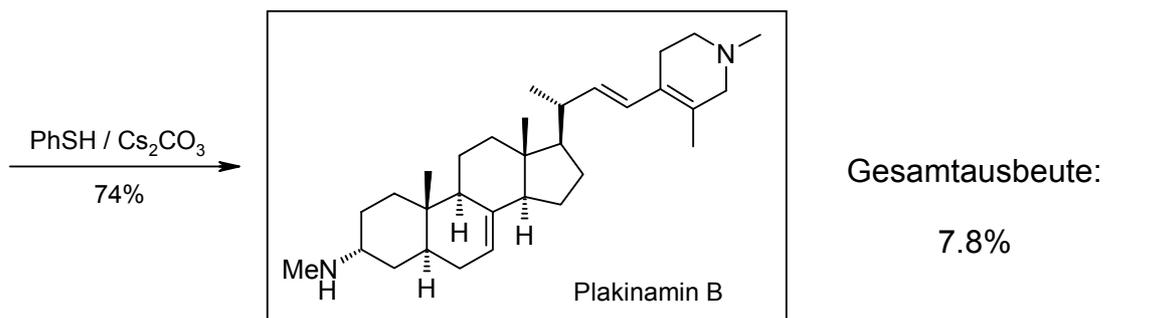
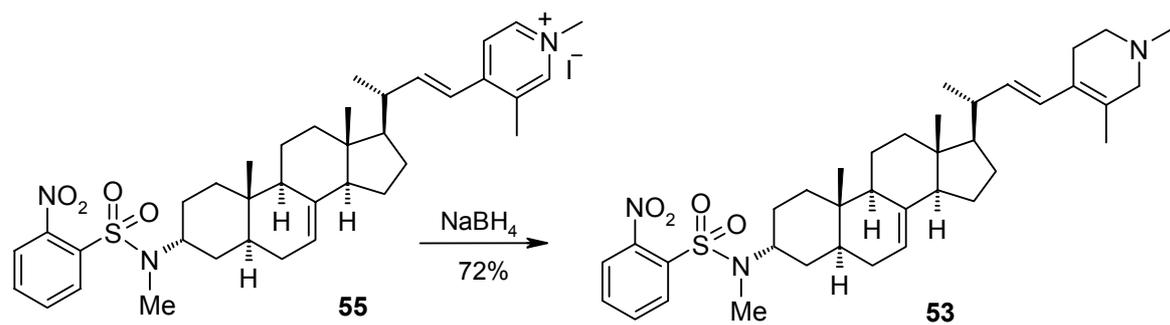
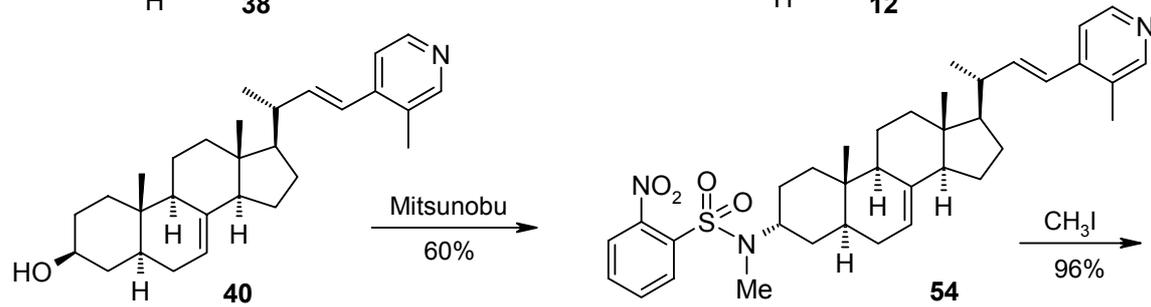
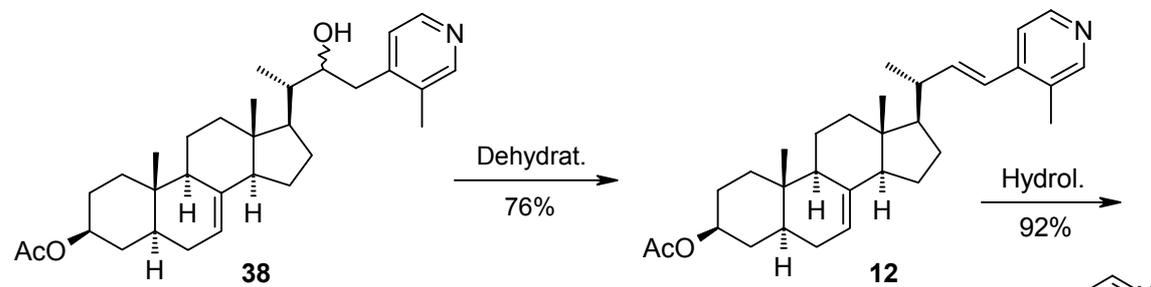
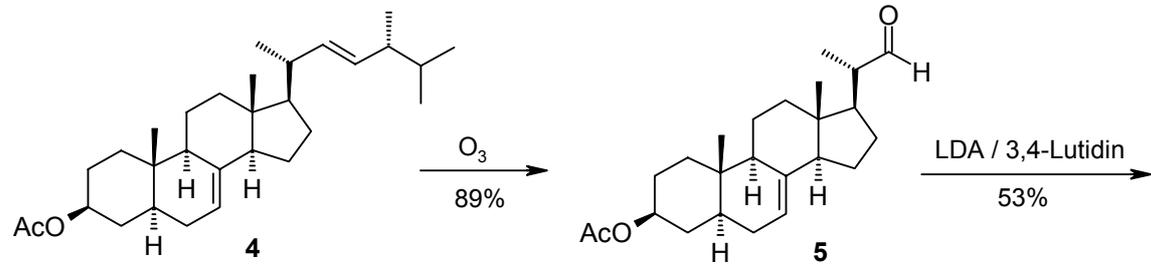
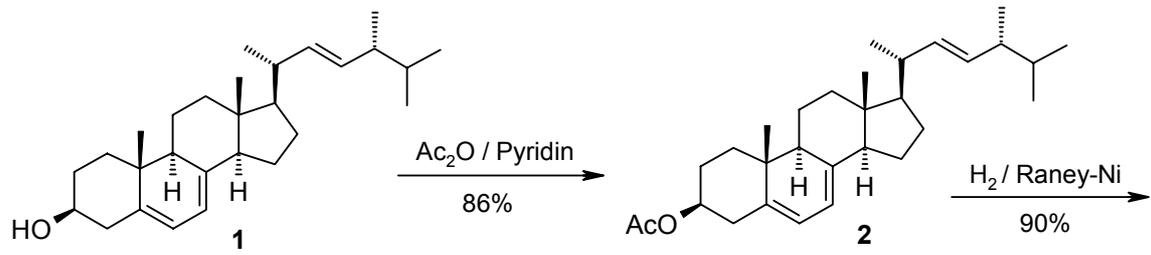
Da Säugetiere und Pflanzen einen von Pilzen verschiedenen Sterolmetabolismus mit z.T. anderen Enzymausstattungen besitzen, bietet sich diese „Achillesferse“ des Pilzes als Ansatzpunkt für die Entwicklung von *Sterol-Biosynthese-Inhibitoren* (SBI's) als Antimykotika an.

Wirkstoffe aus den Klassen der Allylamine, Morpholine oder Azole greifen an verschiedenen Enzymen der Ergosterolbiosynthese an und stellen derzeit die wirksamsten Waffen gegen Pilzerkrankungen dar. Allerdings erfordert eine zunehmende Resistenzbildung und eine steigende Zahl an mykoseanfälligen Patienten, daß neue Wirkstoffe entwickelt und auch als solche frühestmöglich erkannt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Synthese des antimykotisch aktiven Steroid-Alkaloids *Plakinamin B* (**17**) vorgestellt, welches darüber hinaus als Leitsubstanz für die Entwicklung von Strukturanaloga dient.



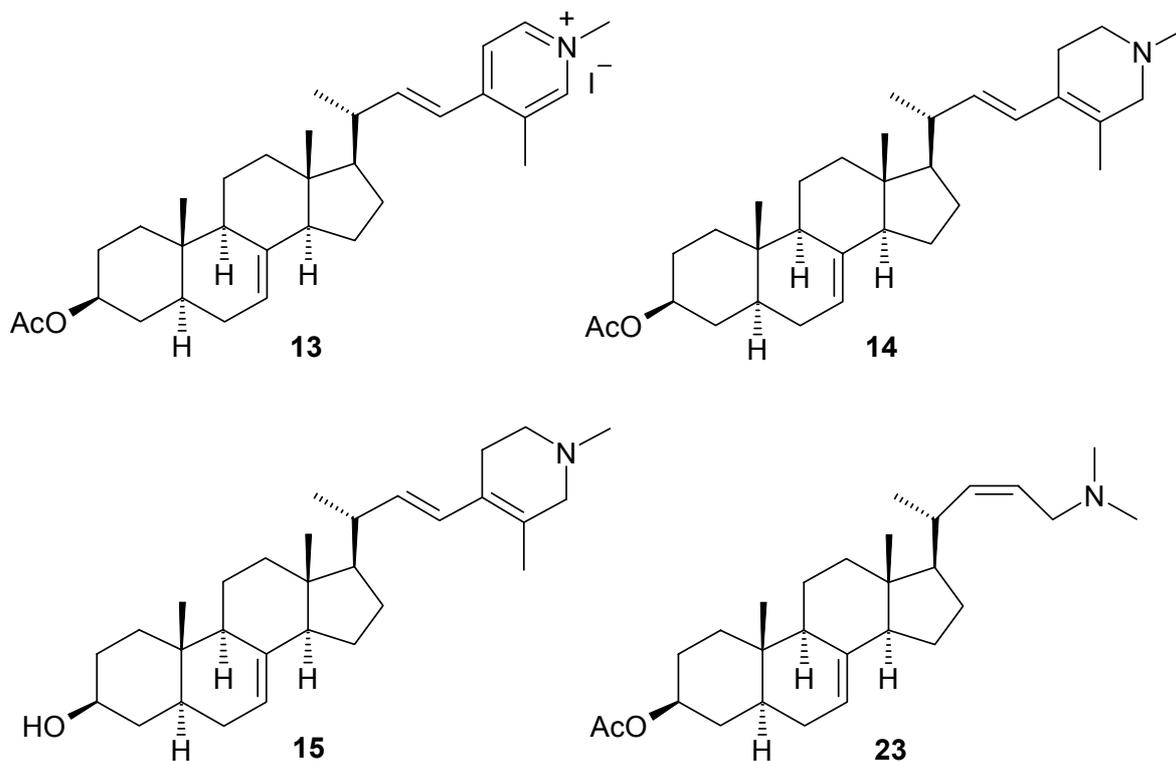
Plakinamin B, dessen Isolierung aus einem marinen Schwamm, *Plakina sp.*, von *Faulkner* und *Rosser* 1984 beschrieben wurde,²⁵ konnte hierbei ausgehend von Ergosterol (**1**) in 10 Syntheseschritten mit 7.8% Gesamtausbeute erhalten werden.

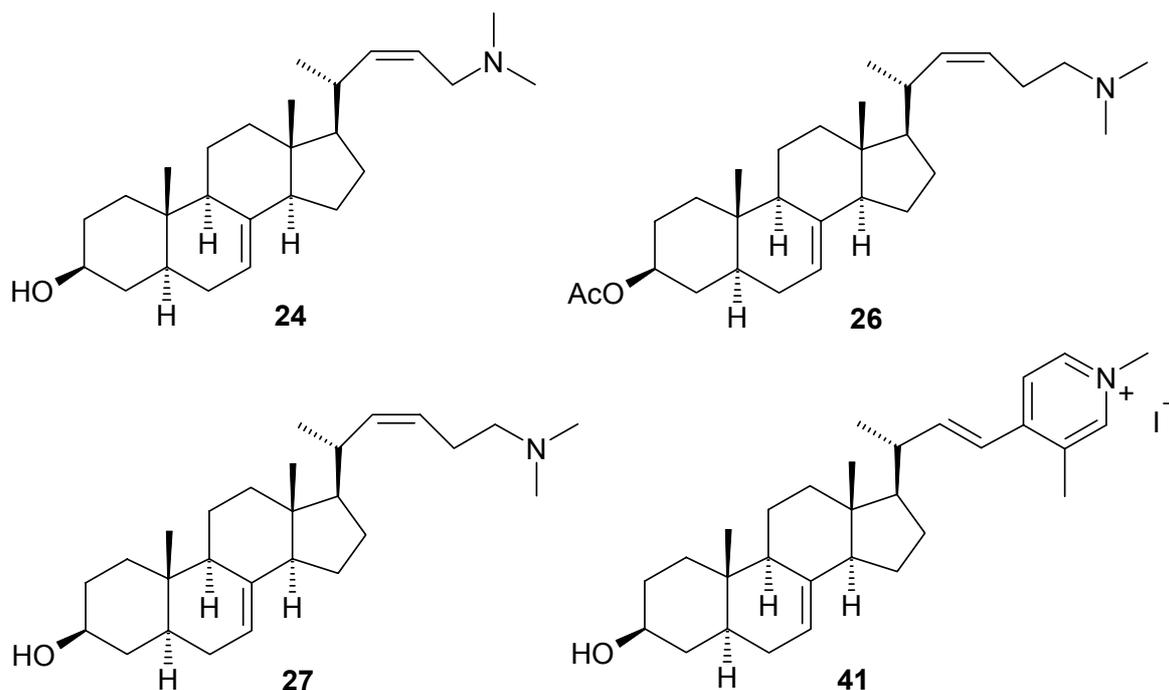


Essentielle Syntheseschritte waren:

1. Selektive katalytische Hydrierung der Δ^5 -Doppelbindung neben der Δ^7 - sowie der Δ^{22} -Doppelbindung in der Seitenkette von Ergosterylacetat (**2**)
2. Selektive Ozonolyse der Δ^{22} -Doppelbindung in der Seitenkette neben der Δ^7 -Doppelbindung im Kern von 5,6-Dihydroergosterylacetat (**4**)
3. Einführung der Pyridin-Seitenkette durch Aldolkondensation des Aldehyds **5** mit 4-lithiiertem 3,4-Lutidin
4. Mitsunobu-Reaktion des sekundären Alkohols **40** mit *N*-Methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid zum Sulfonamid **54** unter kompletter Inversion an C-3
5. Synthese des 1,2,5,6-Tetrahydropyridins **53** durch NaBH_4 -Reduktion des Methiodids **55** in neutralem Medium

Neben *Plakinamin B* konnte auch eine Reihe von Strukturanaloga synthetisiert werden, deren antimikrobielle Aktivität mit Hilfe eines Agar-Diffusionstestes sowie eines Sterol-Biosynthese-Inhibitor-Screenings untersucht wurde.





Hierbei bestätigte sich die Vermutung, daß auf Grund der Strukturähnlichkeit zu den C-24- bzw. C-25-HEI's der Sterol-C-24-Methyltransferase-Reaktion eine Inhibition v.a. dieses Enzyms der Ergosterolbiosynthese für die antimykotische Aktivität verantwortlich ist.

Eine Ausnahme ist hierbei die Verbindung **13**, bei der die Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase als Zielenzym nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis war insofern überraschend, als das ansonsten strukturgleiche, jedoch nicht acetylierte quartäre Pyridiniumsalz **41** als Inhibitor der Sterol-C-24-Methyltransferase wirkt.

Weiterhin konnten in dieser Arbeit bereits erste Erkenntnisse zu Struktur-Wirkungsbeziehungen gewonnen werden. Mit der Optimierung der Synthese des Aldehyds **5** besteht nun die Möglichkeit, sowohl durch Strukturvariation der Seitenkette als auch der 3-Position mit oder ohne Inversion der Stereochemie, eine große Anzahl von Strukturanaloga und potentiellen SBI zu erhalten und deren antimykotische Aktivität mit Hilfe der hier verwendeten Testmethoden zu charakterisieren.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Angaben

Schmelzpunkte:	Büchi Schmelzpunktbestimmungsapparat B-540, nicht korrigiert
IR-Spektren:	Jasco FT/IR-410 und Perkin Elmer FTIR-Paragon 1000, Festsubstanzen als KBr-Preßling, Flüssigkeiten als Film zwischen NaCl-Platten
NMR-Spektren:	Jeol GSX 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz) und Jeol GSX 500 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz), chemische Verschiebungen (δ) in ppm, Kopplungskonstanten (J) in Hz, δ -Skala mit Tetramethylsilan (TMS) als internem Standard ($\delta = 0.00$ ppm)
Massenspektren:	Elektronenstoßionisation (EI) bei 70 eV und Chemische Ionisation (CI) mit CH_4 als Reaktandgas mit Hewlett-Packard MS Engine, Elektrospray-Ionisation (ESI) mit Sciex API 2000
Elementaranalysen:	CHN-Elementaranalysator Rapid (Fa. Heraeus)
Optische Drehung:	Perkin Elmer 241 MC
Ozonolyse:	Fischer Ozon-Generator Modell 502

Arbeitstechniken

Die säulenchromatographische Reinigung der Rohprodukte wurde durch Flashchromatographie mit Flashsäulen der Größe 450 und 650 ml (Fa. Merck) und Kieselgel 60 der mittleren Korngröße 0.040 - 0.063 mm (Fa. Merck) durchgeführt. Die Fließmittel werden bei den einzelnen Arbeitsvorschriften angegeben.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigfolien Kieselgel 60₂₅₄ (Fa. Macherey & Nagel) verwendet.

Alle handelsüblichen Lösungsmittel wurden vor Verwendung destilliert.

Tetrahydrofuran (THF) wurde über Natrium-Benzophenon-Ketyl unter Rückfluß erhitzt und abdestilliert.

Feuchtigkeitsempfindliche Substanzen wurden mittels Einmalspritzen über Septen zugegeben.

Bei der Aufarbeitung der Ansätze wurde in der Regel dreimal mit dem angegebenen Lösungsmittel extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit der angegebenen Waschflüssigkeit gewaschen und mit dem angegebenen Trocknungsmittel getrocknet. Vor dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Trocknungsmittel durch Filtration entfernt.

Die Angaben zur Ausbeute beziehen sich auf die durch Umkristallisation, Destillation oder Säulenchromatographie gereinigte Substanz.

6.2 Nomenklatur

Als Grundlage für die Bezeichnung der im experimentellen Teil beschriebenen Verbindungen wurden Ergosterol (vgl. Abb. 5) und Pregnan verwendet:

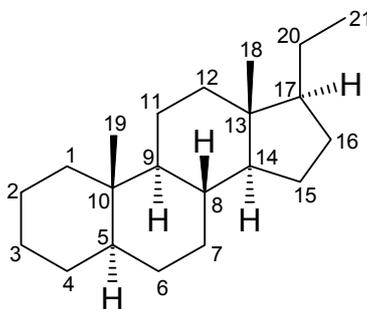
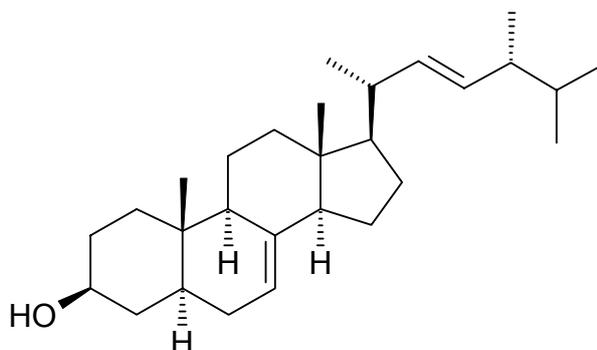


Abb. 33: Pregnan

Die Nummerierung der Grundkörper erfolgte in der dargestellten Art und Weise.

6.3 Beschreibung der Substanzen

5,6-Dihydroergosterol (3)



4.0 g (10 mmol) Ergosterol werden in 100 ml THF und 100 ml Ethylacetat gelöst, mit 1.0 g 4-(*N,N*-Dimethylamino)-benzaldehyd versetzt und in Gegenwart von 6 g Raney-Nickel W2 6 Stunden unter Normalbedingungen hydriert. Anschließend wird vom Katalysator abdekantiert und noch zweimal mit je 50 ml Chloroform gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Chloroform / Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 3.6 g (90%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 175 °C (Lit.:³⁰ 174 - 175 °C)

Elementaranalyse: C₂₈H₄₆O (398.68)

Ber.: C: 84.36 H: 11.63

Gef.: C: 83.40 H: 11.34

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.18 (m, 2 H, 22-H + 23-H), 5.15 (m, 1 H, 7-H), 3.59 (m, 1 H, 3-H), 1.98 (m, 2 H, 12-HH + 20-H), 1.90 - 1.15 (m, 21 H), 1.10 (m, 1 H, 4-HH), 1.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 21-H),

0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, 28-H), 0.82 (d, $J = 7.0$ Hz + d, $J = 7.3$ Hz, 6 H, 26-H + 27-H), 0.79 (s, 3 H, 19-H), 0.54 (s, 3 H, 18-H)

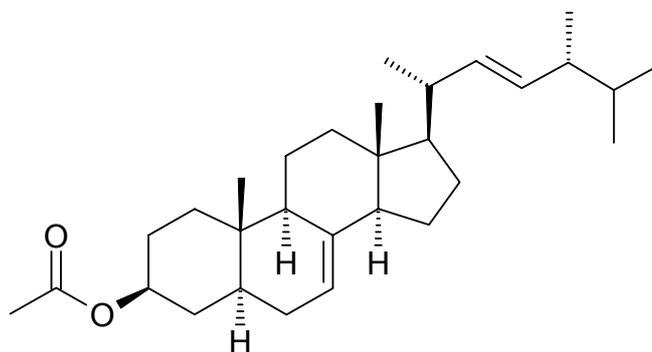
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 139.6 (C-8), 135.7 (C-22), 131.9 (C-23), 117.5 (C-7), 71.1 (C-3), 56.0 (C-17), 55.1 (C-14), 49.5 (C-9), 43.3 (C-13), 42.8 (C-24), 40.5 (C-20), 40.3 (C-5), 39.5 (C-12), 38.0 (C-1), 37.2 (C-4), 34.3 (C-10), 33.1 (C-25), 31.5 (C-6), 29.7 (C-16), 28.1 (C-2), 22.9 (C-15), 21.6 (C-11), 21.1 (C-21), 20.0 (C-26), 19.7 (C-27), 17.6 (C-28), 13.1 (C-19), 12.1 (C-18)

IR: ν (cm^{-1}) = 3448, 2955, 2870, 1654, 1458, 1370, 1158, 1099, 1040, 967

MS (EI): (m/z) (%) = 398 (82, M^+), 271 (100), 255 (60)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -19.4^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1.0$, Lit.:³⁰ -21°)

5,6-Dihydroergosterylacetat (4)



7.9 g (18 mmol) Ergosterylacetat (**2**) werden in 150 ml THF und 150 ml Ethylacetat gelöst, mit 1.5 g 4-(*N,N*-Dimethylamino)-benzaldehyd versetzt und in Gegenwart von 12 g Raney-Nickel W2 6 Stunden unter Normalbedingungen hydriert. Anschließend wird vom Katalysator abdekantiert und noch zweimal mit je 50 ml Chloroform gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Chloroform / Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 7.1 g (90%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 182 °C (Lit.:³⁰ 182 °C)

Elementaranalyse: C₃₀H₄₈O₂ (440.72)

Ber.: C: 81.76 H: 10.98

Gef.: C: 81.62 H: 10.93

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.19 (m, 2 H, 22-H + 23-H), 5.14 (m, 1 H, 7-H), 4.69 (m, 1 H, 3-H), 2.02 (s, 3 H, CH₃C=O), 1.96 (m, 2 H, 12-HH + 20-H), 1.90 - 1.20 (m, 20 H), 1.10 (m, 1 H, 4-HH), 1.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 21-H), 0.91 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H, 28-H), 0.82 (d, *J* = 7.0 Hz + d, *J* = 7.8 Hz, 6 H, 26-H + 27-H), 0.81 (s, 3 H, 19-H),

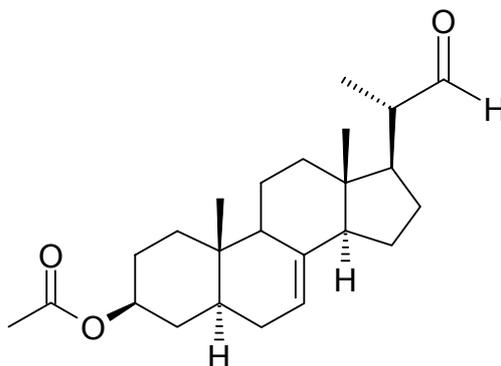
0.54 (s, 3 H, 18-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7 (C=O), 139.5 (C-8), 135.7 (C-22), 131.9 (C-23), 117.3 (C-7), 73.5 (C-3), 56.0 (C-17), 55.1 (C-14), 49.3 (C-9), 43.3 (C-13), 42.8 (C-24), 40.5 (C-20), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 34.2 (C-10), 33.8 (C-4), 33.1 (C-25), 29.5 (C-6), 28.1 (C-16), 27.5 (C-2), 22.9 (C-15), 21.5 (C-11), 21.4 ($\text{CH}_3\text{C=O}$), 21.1 (C-21), 20.0 (C-27), 19.7 (C-26), 17.6 (C-28), 12.9 (C-19), 12.1 (C-18)

IR: ν (cm^{-1}) = 2951, 1734, 1456, 1367, 1248, 1161, 1138, 1094, 1031, 965, 933, 897, 843, 799

MS (EI): (m/z) (%) = 440 (60, M^+), 313 (100), 255 (64)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -16.9^\circ$ (CHCl_3 , c = 1.0, Lit.:³⁰ - 20°)

(3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-carbaldehyd (5)

4.4 g (10 mmol) 5,6-Dihydroergosterylacetat (**4**) werden in 1000 ml Dichlormethan gelöst, mit 5 ml Pyridin versetzt und auf $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Über eine Gaseinleitungs-fritte P1 oder P0 wird unter Rühren 10 min lang Ozon eingeleitet (Flußrate 60 Liter O_3 / h, entspricht ca. 16 mmol), nach Abschalten des Generators anschließend noch 2 Minuten Sauerstoff, um überschüssiges Ozon zu vertreiben. Danach versetzt man sofort mit 25 ml Methanol und 2.5 ml Dimethylsulfid (34 mmol) und rührt 30 min bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach weiteren 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Hexan / Ethylacetat 4 : 1) gereinigt.

Ausbeute: 3.3 g (89%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: $139\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lit.:³¹ $139 - 141\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Elementaranalyse: $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_3$ (372.55)

Ber.: C: 77.38 H: 9.74

Gef.: C: 77.39 H: 9.67

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 9.58 (d, $J = 3.1\text{ Hz}$, 1 H, CHO), 5.18 (m, 1 H, 7-H), 4.69 (m, 1 H, 3-H), 2.36 (m, 1 H, 20-H), 2.02 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 1.96 (m, 1 H, 12-H_H), 1.92 - 1.20 (m, 19 H), 1.13 (d,

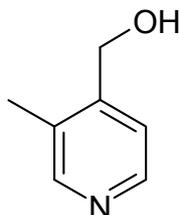
$J = 6.8 \text{ Hz, 3 H, 21-H), 0.82 (s, 3 H, 19-H), 0.58 (s, 3 H, 18-H)}$

$^{13}\text{C-NMR (CDCl}_3\text{):$ δ (ppm) = 204.9 (CHO), 170.7 ($\text{CH}_3\text{C=O}$), 138.6 (C-8), 118.0 (C-7), 73.4 (C-3), 54.2 (C-14), 51.0 (C-17), 49.8 (C-20), 49.2 (C-9), 43.9 (C-13), 40.0 (C-5), 39.2 (C-12), 36.8 (C-1), 34.2 (C-10), 33.8 (C-4), 29.5 (C-6), 27.5 (C-2), 26.7 (C-16), 23.3 (C-15), 21.4 ($\text{CH}_3\text{C=O}$), 21.4 (C-11), 13.6 (C-21), 12.9 (C-19), 12.3 (C-18)

IR: ν (cm^{-1}) = 2947, 2711, 1726, 1446, 1365, 1242, 1161, 1093, 1030, 972, 997, 845, 825, 798, 665, 607, 528

MS (CI): (m/z) (%) = 373 (62, $\text{M}^+ + 1$), 313 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -14.1^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1.0$, Lit.:³¹ - 18.7°)

4-Hydroxymethyl-3-methylpyridin (9)

Zu einer Suspension von 12 g (80 mmol) 3-Methylpyridin-4-carbonsäuremethylester in 50 ml THF gibt man unter Rühren portionsweise 1.0 g (46 mmol) Lithiumborhydrid. Nach vollständiger Umsetzung (ca. 3 Stunden, DC-Kontrolle) versetzt man vorsichtig mit 50 ml 2 N-HCl. Ist die Gasentwicklung beendet, wird noch 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt, anschließend mit 2 N-NaOH alkalisiert und dreimal mit je 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan / Methanol 2 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 8.5 g (83%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 82 °C

Elementaranalyse: C₇H₉NO (123,16)

Ber.: C: 68.27 H: 7.37 N: 11.37

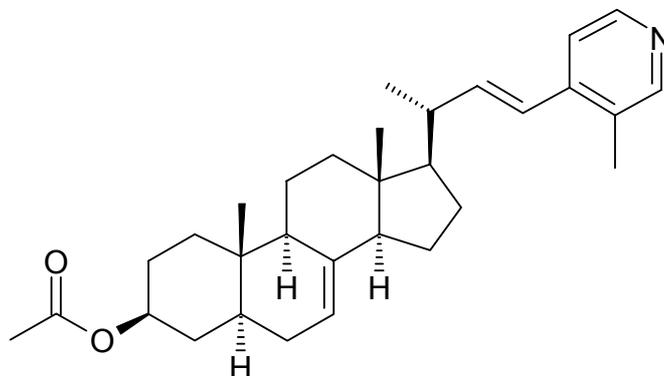
Gef.: C: 68.46 H: 7.42 N: 11.13

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 8.31 (d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, 6-H), 8.21 (s, 1 H, 2-H), 7.45 (d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, 5-H), 4.99 (s, 1 H, OH), 4.69 (s, 2 H, CH₂), 2.20 (s, 3 H, 3-CH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 149.5 (C-4), 149.2 (C-2), 147.0 (C-6), 130.3 (C-3), 120.6 (C-5), 60.9 (CH₂), 15.3 (3-CH₃)

IR: ν (cm^{-1}) = 3168, 2904, 2829, 1605, 1455, 1404, 1381, 1339,
1255, 1227, 1189, 1167, 1070, 1004, 844, 829, 744, 621, 522

MS (CI): (m/z) (%) = 124 (100, $M^+ + 1$), 108 (23), 79 (55)

(3*S*,20*R*)-3-Acetoxy-20-[2-(3-methylpyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en (12)

Eine Lösung von 1.9 g (4.0 mmol) des sekundären Alkohols **38** in 20 ml Chloroform wird unter Rühren mit 1.20 g (12.0 mmol) Triethylamin versetzt. Unter Eiskühlung erfolgt anschließend tropfenweise Zugabe von 0.69 g (6.0 mmol) Methansulfonsäurechlorid. Man rührt eine Stunde bei Raumtemperatur und gibt dann 1.80 g (12.0 mmol) DBU hinzu. Das Gemisch wird 72 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen gibt man 20 ml Wasser dazu und rührt noch eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wird dreimal mit je 15 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan / Methanol 1 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 1.4 g (76%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 146 °C

Elementaranalyse: C₃₁H₄₃NO₂ (461.69)

Ber.: C: 80.65 H: 9.39 N: 3.03

Gef.: C: 81.05 H: 9.82 N: 2.53

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 8.33 (s, 1 H, 2''-H + d, $J = 5.2$ Hz, 1 H, 6''-H), 7.23 (d, $J = 5.2$ Hz, 1 H, 5''-H), 6.42 (d, $J = 15.7$ Hz, 1 H, 2'-H), 6.17 (dd, $J_1 = 15.7$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, 1 H, 1'-H), 5.16 (m, 1 H, 7-H), 4.70 (m, 1 H, 3-H), 2.30 (m, 1 H, 20-H), 2.29 (s, 3 H, 3''-CH₃), 2.06 (m, 1 H, 12-H), 2.03 (s, 3 H, CH₃C=O), 1.90 - 1.20 (m, 18 H), 1.15 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 21-H + m, 1H, 4-H), 0.82 (s, 3 H, 19-H), 0.61 (s, 3 H, 18-H)

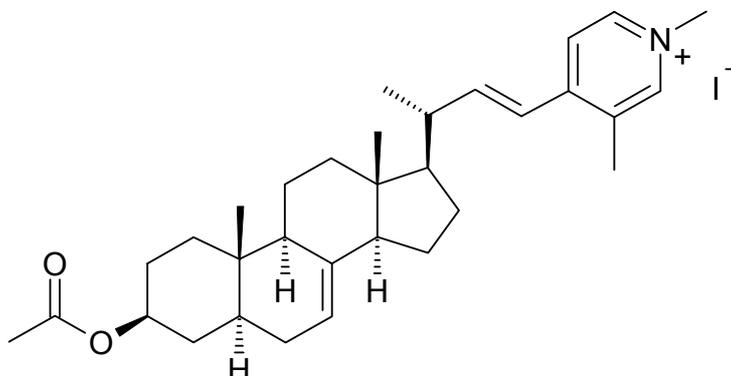
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7 (C=O), 150.8 (C-2''), 147.2 (C-6''), 144.5 (C-4''), 142.9 (C-1'), 139.1 (C-8), 130.0 (C-3''), 123.0 (C-2'), 119.3 (C-5''), 117.7 (C-7), 73.4 (C-3), 55.5 (C-17), 54.9 (C-14), 49.2 (C-9), 43.6 (C-13), 41.2 (C-20), 40.0 (C-5), 39.4 (C-12), 36.8 (C-4), 34.2 (C-10), 33.8 (C-1), 29.5 (C-6), 28.0 (C-16), 27.5 (C-2), 22.9 (C-15), 21.5 (CH₃C=O), 21.4 (C-11), 20.4 (C-21), 16.6 (3''-CH₃), 13.0 (C-19), 12.2 (C-18)

IR: ν (cm^{-1}) = 2947, 2870, 1728, 1639, 1591, 1547, 1446, 1404, 1379, 1242, 1093, 1030, 972, 895, 856, 820, 733

MS (CI): (m/z) (%) = 462 (100, M⁺+1), 420 (52)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +18.2^\circ$ (CHCl_3 , c = 1.0)

(3*S*,20*R*)-4-[2-(3-Acetoxypregn-7-en-20-yl)-(E)-ethenyl]-1,3-dimethylpyridiniumiodid (13)



0.92 g (2.0 mmol) des Pyridinderivates **12**, in möglichst wenig Aceton gelöst, werden mit 0.57 g Methyljodid (4.0 mmol) versetzt und eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen fällt das entstandene Methoiodid größtenteils aus, Zugabe von Diethylether vervollständigt die Fällung. Wurde der Ausgangsstoff in zuviel Aceton gelöst, so bleibt das Produkt nach Abkühlen in Lösung. Auch in diesem Fall kann durch Zusatz größerer Mengen Diethylether eine quantitative Ausfällung erreicht werden. Der Niederschlag wird abfiltriert und aus Ethanol / Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 1.1 g (92%)

gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 220 °C

Elementaranalyse: C₃₂H₄₆INO₂ (603.63)

Ber.: C: 63.67 H: 7.68 N: 2.32

Gef.: C: 64.66 H: 7.77 N: 2.21

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.77 (s, 1 H, 2-H), 8.67 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H, 6-H), 8.16 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H, 5-H), 6.88 (dd, *J*₁ = 15.6 Hz, *J*₂ =

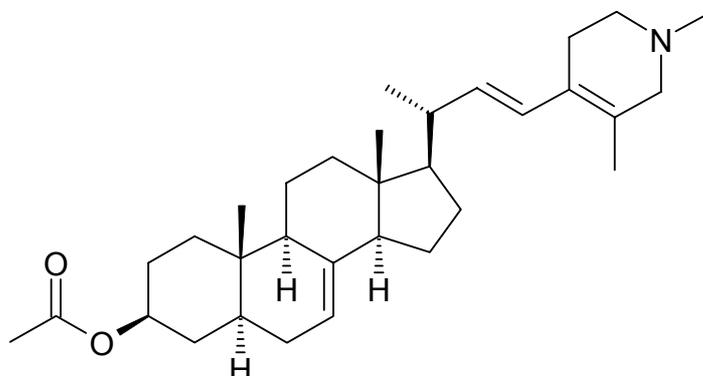
9.1 Hz, 1 H, 2'-H), 6.71 (d, $J = 15.6$ Hz, 1 H, 1'-H), 5.13 (m, 1 H, 7''-H), 4.58 (m, 1 H, 3''-H), 4.20 (s, 3 H, 1-CH₃), 2.45 (m, 1 H, 20''-H), 2.41 (s, 3 H, 3-CH₃), 2.02 (m, 1 H, 12''-H), 1.98 (s, 3 H, CH₃C=O), 1.88 - 1.25 (m, 18 H), 1.15 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 21''-H), 1.12 (m, 1 H, 4-H), 0.77 (s, 3 H, 19''-H), 0.58 (s, 3 H, 18''-H)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 170.4 (C=O), 152.3 (C-4), 151.3 (C-2'), 145.7 (C-2), 142.7 (C-6), 139.4 (C-8''), 134.3 (C-3), 122.4 (C-5), 121.6 (C-1'), 117.8 (C-7''), 73.2 (C-3''), 55.0 (C-17''), 54.8 (C-14''), 49.1 (C-9''), 47.2 (1-CH₃), 43.9 (C-13''), 41.5 (C-20''), 40.3 (C-5''), 39.2 (C-12''), 36.7 (C-4''), 34.3 (C-10''), 34.0 (C-4''), 29.5 (C-6''), 27.8 (C-16''), 27.7 (C-2''), 23.2 (C-15''), 21.7 (CH₃C=O), 21.6 (C-11''), 20.2 (C-21''), 16.8 (3-CH₃), 13.3 (C-19''), 12.6 (C-18'')

IR: ν (cm⁻¹) = 2947, 2870, 1734, 1630, 1504, 1473, 1446, 1365, 1323, 1244, 1161, 1093, 1032, 972, 897

MS (EI): (m/z) (%) = 475 (8, M⁺ - HI), 461 (55, M⁺ - CH₃I), 313 (30), 174 (56), 107 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +46.0^\circ$ (MeOH, $c = 0.25$)

(3*S*,20*R*)-3-Acetoxy-20-[2-(1,3-dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en (14)

0.60 g (1.0 mmol) des Methiodids **13** werden in 30 ml Ethanol 90% gelöst. Unter Eiskühlung und Rühren tropft man eine Lösung von 0.11 g (3.0 mmol) NaBH₄ in 5 ml Ethanol 90% langsam zu. Es wird zwei Stunden unter Eiskühlung und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges NaBH₄ zerstört man durch vorsichtige Zugabe von 2 N-HCl. Danach wird mit 2 N-NaOH alkalisiert und dreimal mit je 20 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan / EDMA 1 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 400 mg (83%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 144 °C (Zers.)

Elementaranalyse: C₃₂H₄₉NO₂ (479.75)

Ber.: C: 80.12 H: 10.29 N: 2.92

Gef.: C: 80.23 H: 10.75 N: 2.70

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 6.32 (d, *J* = 15.5 Hz, 1 H, 2'-H), 5.41 (dd, *J*₁ = 15.5 Hz, *J*₂ = 9.0 Hz, 1 H, 1'-H), 5.13 (m, 1 H, 7-H), 4.68 (m,

1 H, 3-H), 2.88 (m, 2 H, 2''-H), 2.51 (m, 2 H, 6''-H), 2.31 (s, 3 H, 1''-CH₃), 2.24 (m, 2 H, 5''-H), 2.11 (m, 1 H, 20-H), 2.01 (s, 3 H, CH₃C=O), 2.00 (m, 1 H, 12-H_H), 1.90 - 1.20 (m, 18 H), 1.70 (s, 3 H, 3''-H), 1.15 (m, 1 H, 4-H_H), 1.03 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H, 21-H), 0.80 (s, 3 H, 19-H), 0.54 (s, 3 H, 18-H)

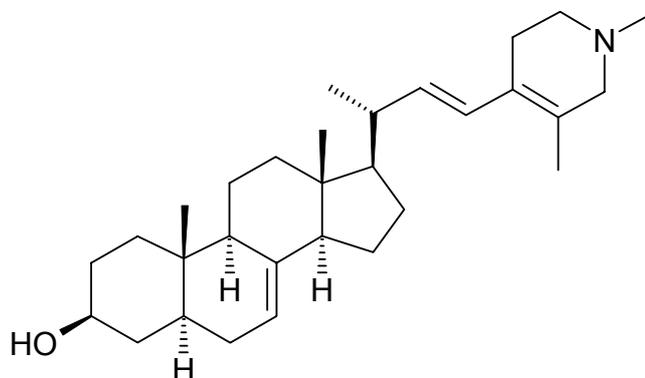
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.7 (C=O), 139.4 (C-8), 134.7 (C-1'), 127.6 + 125.9 (C-3'' + C-4''), 124.8 (C-2'), 117.4 (C-7), 73.5 (C-3), 60.5 (C-2''), 56.0 (C-17), 55.0 (C-14), 52.4 (C-6''), 49.2 (C-9), 45.7 (1''-CH₃), 43.4 (C-13), 41.0 (C-20), 40.0 (C-5), 39.5 (C-12), 36.8 (C-4), 34.2 (C-10), 33.8 (C-1), 29.5 (C-6), 28.1 (C-16), 27.5 (C-2), 26.5 (C-5''), 22.9 (C-15), 21.5 (CH₃C=O), 21.4 (C-11), 21.0 (C-21), 16.5 (3''-CH₃), 12.9 (C-19), 12.2 (C-18)

IR: ν (cm⁻¹) = 2945, 2871, 1732, 1647, 1446, 1379, 1242, 1161, 1093, 1032, 966, 899, 845, 756

MS (EI): (m/z) (%) = 479 (38, M⁺), 464 (62), 313 (24), 252 (42), 110 (100), 84 (87)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 13.0^\circ$ (CHCl₃, c = 0.5)

**(3*S*,20*R*)-20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-
(*E*)-ethenyl]-3-hydroxypregn-7-en (15)**



90 mg (0.15 mmol) des Methiodids **13** werden in 5 ml Ethanol 90% gelöst. Unter Eiskühlung und Rühren tropft man eine Lösung von 17 mg (0,45 mmol) NaBH₄ in 1 ml Ethanol 90% langsam zu. Es wird zwei Stunden unter Eiskühlung und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges NaBH₄ zerstört man durch vorsichtige Zugabe von 2 N-HCl. Danach wird mit 2 N-NaOH alkalisiert, eine Stunde unter Rückfluß erhitzt und dreimal mit je 5 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan / EDMA 2 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 50 mg (77%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 189 °C (Zers.)

Elementaranalyse: C₃₀H₄₇NO (437.72)

Ber.: C: 82.32 H: 10.82 N: 3.20

Gef.: C: 79.81 H: 10.31 N: 2.94

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 6.34 (d, *J* = 15.5 Hz, 1 H, 2'-H), 5.45 (dd, *J*₁ =

15.5 Hz, $J_2 = 8.7$ Hz, 1 H, 1'-H), 5.14 (m, 1 H, 7-H), 3.55 (m, 1 H, 3-H), 2.86 (m, 2 H, 2''-H), 2.51 (m, 2 H, 6''-H), 2.33 (s, 3 H, 1''-CH₃), 2.25 (m, 2 H, 5''-H), 2.13 (m, 1 H, 20-H), 2.03 (m, 1 H, 12-HH), 1.85 - 1.53 (m, 11 H), 1.75 (s, 3 H, 3''-CH₃), 1.48 (m, 2 H, 11-HH + 15-HH), 1.38 (m, 3 H, 5-H + 6-HH + 15-HH), 1.26 (m, 3 H, 1-HH + 17-H + 12-HH), 1.06 (d, $J = 6.7$, 3 H, 21-H + m, 1 H, 4-HH), 0.79 (s, 3 H, 19-H), 0.56 (s, 3 H, 18-H)

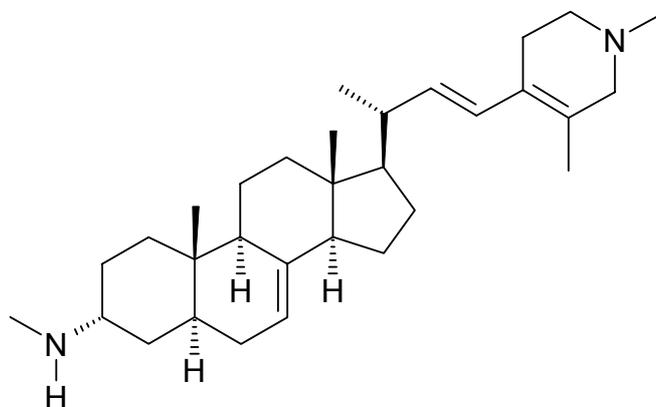
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 139.4 (C-8), 134.7 (C-1'), 127.6 + 126.0 (C-3'' + C-4''), 124.8 (C-2'), 117.6 (C-7), 70.8 (C-3), 60.5 (C-2''), 56.2 (C-17), 55.1 (C-14), 52.4 (C-6''), 49.5 (C-9), 45.7 (1''-CH₃), 43.4 (C-13), 40.9 (C-20), 40.3 (C-5), 39.5 (C-12), 38.0 (C-1), 37.2 (C-4), 34.3 (C-10), 31.6 (C-6), 29.7 (C-16), 28.2 (C-2), 26.6 (C-5''), 22.9 (C-15), 21.6 (C-11), 20.8 (C-21), 16.5 (3''-CH₃), 13.0 (C-19), 12.1 (C-18)

IR: ν (cm⁻¹) = 3407, 2926, 1659, 1445, 1381, 1293, 1269, 1156, 1130, 1098, 1054, 961, 845, 628

MS (CI): (m/z) (%) = 438 (100, M⁺+1), 420 (82), 164 (98)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +12.6^\circ$ (CHCl₃, c = 1.0)

(3*R*,20*R*)-20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-3-methylaminopregn-7-en (*Plakinamin B*) (17)



0.10 g (0.16 mmol) des Sulfonamids **53** werden in 5 ml Acetonitril gelöst. Man gibt 56 mg (0.50 mmol) Thiophenol und 0.30 g (0.90 mmol) Cäsiumcarbonat dazu und rührt 24 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan / EDMA 1 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 50 mg (74%)

gelbes Öl

HR-MS:

$C_{31}H_{50}N_2$

Ber.: 450.3974

Gef.: 450.3989 (Lit.:²⁵ 450.3973)

¹H-NMR (CDCl₃):

δ (ppm) = 6.34 (d, $J = 15.6$ Hz, 1 H, 2'-H), 5.42 (dd, $J_1 = 15.6$, $J_2 = 8.8$ Hz, 1 H, 1'-H), 5.16 (m, 1 H, 7-H), 2.85 (m, 2 H, 2''-H), 2.74 (m, 1 H, 3-H), 2.50 (m, 2 H, 6''-H), 2.37 (s, 3 H, NH-CH₃), 2.33 (s, 3 H, 1''-CH₃), 2.25 (m, 2 H, 5''-H), 2.13 (m, 1 H, 20-H), 2.01 (m, 1 H, 12-H), 1.90 - 1.10 (m, 20 H), 1.71 (s, 3 H, 3''-CH₃), 1.05 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, 21-H), 0.80 (s, 3 H, 19-H),

0.56 (s, 3 H, 18-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 139.4 (C-8), 134.8 (C-1'), 127.6 + 126.0 (C-3'' + C-4''), 124.8 (C-2'), 117.7 (C-7), 60.5 (C-2'), 56.0 (C-17), 55.1 (C-14), 54.2 (C-3), 52.4 (C-6''), 49.7 (C-9), 45.7 (1''-CH₃), 43.5 (C-13), 41.0 (C-20), 39.5 (C-12), 35.1 (C-5), 34.9 (C-10), 34.2 (NH-CH₃), 32.5 + 32.4 (C-1 + C-4), 29.7 (C-6), 28.1 (C-16), 26.5 (C-5''), 25.5 (C-2), 22.9 (C-15), 21.2 (C-11), 21.0 (C-21), 16.5 (3'-CH₃), 12.4 (C-19), 12.2 (C-18)

IR: ν (cm⁻¹) = 3419, 2925, 2852, 2783, 1442, 1379, 1292, 1269, 1200, 1124, 962, 847, 721, 542

MS (EI): (m/z) (%) = 450 (74, M⁺), 435 (100, M⁺ - CH₃), 277 (23), 84 (83)

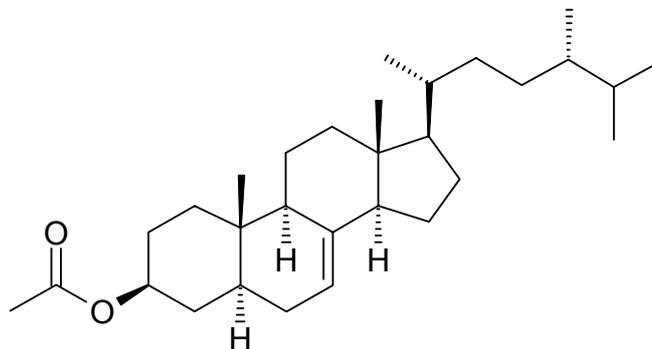
Dihydrochlorid:

Durch Einleiten von Chlorwasserstoffgas in eine methanolische Lösung der freien Base wird das Dihydrochlorid ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert.

Schmelzpunkt: 121 °C (Lit.:²⁵ 120 - 130 °C)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +21.5^\circ$ (MeOH, c = 1.0, Lit.:²⁵ + 29°)

5,6,22,23-Tetrahydroergosterylacetat (19)



7.9 g (18 mmol) Ergosterylacetat (**2**) werden in 150 ml THF und 150 ml Ethylacetat gelöst und in Gegenwart von 12 g Raney-Nickel W2 12 Stunden unter Normalbedingungen hydriert. Anschließend wird vom Katalysator abdekantiert und noch zweimal mit je 50 ml Chloroform gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Chloroform / Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 7.0 g (89%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 159 °C (Lit.:³⁰ 159 - 161 °C)

Elementaranalyse: C₃₀H₅₀O₂ (442.73)

Ber.: C: 81.39 H: 11.38

Gef.: C: 80.64 H: 11.44

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.15 (m, 1 H, 7-H), 4.70 (m, 1 H, 3-H), 2.03 (s, 3 H, CH₃C=O), 2.01 (m, 1 H, 12-HH), 1.95 - 1.18 (m, 23 H), 1.13 (m, 1 H, 4-HH), 0.96 (m, 1 H, 22-HH), 0.94 (m, 1 H, 23-HH), 0.92 (d, *J* = 6.2 Hz, 3 H, 21-H), 0.85 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H, 28-H), 0.80 (s, 3 H, 19-H), 0.77 (d, *J* = 7.0 Hz + d, *J* = 6.6 Hz, 6 H,

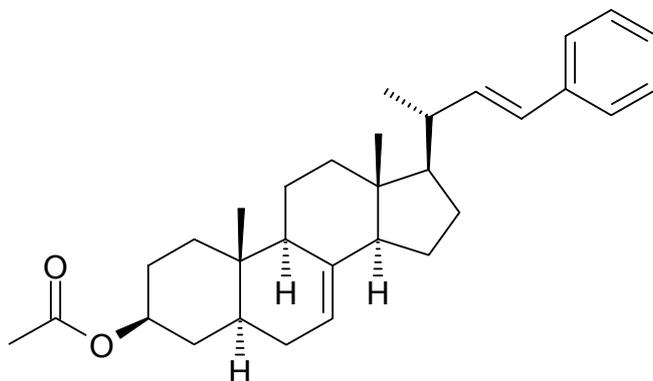
26-H + 27-H), 0.52 (s, 3 H, 18-H)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.7 (C=O), 139.6 (C-8), 117.3 (C-7), 73.5 (C-3), 56.0 (C-17), 55.0 (C-14), 49.3 (C-9), 43.4 (C-13), 40.1 (C-5), 39.5 (C-12), 39.1 (C-24), 36.9 (C-4), 36.6 (C-20), 34.2 (C-10), 33.8 (C-1), 33.7 (C-22), 31.5 (C-25), 30.7 (C-23), 29.5 (C-6), 27.9 (C-16), 27.5 (C-2), 23.0 (C-15), 21.5 (C-11), 21.4 (C-CH₃C=O), 20.5 (C-28), 19.0 (C-21), 17.6 (C-26), 15.5 (C-27), 12.9 (C-19), 11.9 (C-18)

IR: ν (cm⁻¹) = 2952, 2870, 1734, 1468, 1367, 1250, 1161, 1095, 1032, 974, 897, 847, 829, 798, 661, 609

MS (EI): (m/z) (%) = 442 (100, M⁺), 427 (30), 367 (22), 255 (84), 229 (32), 213 (52)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -2.4^\circ$ (CHCl₃, c = 1.0, Lit.:³⁰ - 3°)

(3S,20R)-3-Acetoxy-20-[2-phenyl-(E)-ethenyl]-pregn-7-en (20)

0.26 g (0.60 mmol) Benzyltriphenylphosphoniumbromid werden in 5 ml wasserfreiem THF unter Stickstoff, Eiskühlung und Rühren mit 0.38 ml (0.60 mmol) *n*-Butyllithium-Lösung (1.6 M in Hexan) versetzt. Nach 30 Minuten tropft man langsam eine Lösung von 0.19 g (0.50 mmol) des Aldehyds **5** in 1 ml wasserfreiem THF zu und rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit 10 ml gesättigter Na₂CO₃-Lösung versetzt und dreimal mit je 10 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Hexan / Ethylacetat 10 : 1) gereinigt.

Ausbeute: 140 mg (60%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 111 °C

Elementaranalyse: C₃₁H₄₂O₂ (446.68)

Ber.: C: 83.36 H: 9.48

Gef.: C: 82.08 H: 9.58

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.30 (m, 4 H, 2''-H + 3''-H + 5''-H + 6''-H), 7.18 (m, 1 H, 4''-H), 6.30 (d, *J* = 15.7 Hz, 1 H, 2'-H), 6.07 (dd, *J*₁ =

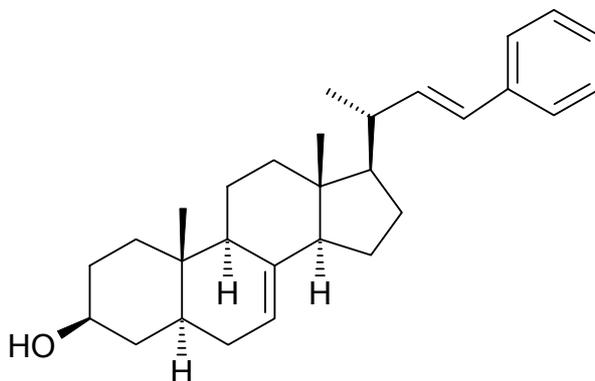
15.7 Hz, $J_2 = 8.7$ Hz, 1 H, 1'-H), 5.15 (m, 1 H, 7-H), 4.69 (m, 1 H, 3-H), 2.24 (m, 1 H, 20-H), 2.02 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 1.98 (m, 1 H, 12-H), 1.90 - 1.20 (m, 19 H), 1.13 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, 21-H), 0.82 (s, 3 H, 19-H), 0.59 (s, 3 H, 18-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7 (C=O), 139.4 (C-8), 138.2 (C-1''), 137.2 (C-1'), 128.5 (2 x aromat. CH), 127.5 (C-4''), 126.8 (C-2'), 126.0 (2 x aromat. CH), 117.6 (C-7), 73.5 (C-3), 56.0 (C-17), 55.1 (C-14), 49.4 (C-9), 43.6 (C-13), 40.9 (C-20), 40.1 (C-5), 39.5 (C-12), 36.9 (C-4), 34.3 (C-10), 33.9 (C-1), 29.6 (C-6), 28.1 (C-16), 27.6 (C-2), 23.0 (C-15), 21.6 (C-11), 21.5 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 20.7 (C-21), 13.0 (C-19), 12.0 (C-18)

IR: ν (cm^{-1}) = 2949, 1734, 1446, 1365, 1244, 1161, 1093, 1030, 966, 897, 845, 748, 694

MS (CI): (m/z) (%) = 447 (10, $\text{M}^+ + 1$), 387 (32), 131 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +24.3^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1.0$)

(3S,20R)-3-Hydroxy-20-[2-phenyl-(E)-ethenyl]-pregn-7-en (21)

40 mg (0.10 mmol) des Esters **20** werden in 5 ml THF gelöst, mit 5 ml 6 N-NaOH versetzt und 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Man extrahiert dreimal mit je 5 ml Diethylether und trocknet die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Hexan / Ethylacetat / Methanol 4 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (83%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 167 °C

Elementaranalyse: C₂₉H₄₀O (404.64)

Ber.: C: 86.08 H: 9.96

Gef.: C: 86.01 H: 9.75

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.29 (m, 4 H, 2''-H + 3''-H + 5''-H + 6''-H), 7.17 (m, 1 H, 4''-H), 6.29 (d, *J* = 15.8 Hz, 1 H, 2'-H), 6.07 (dd, *J*₁ = 15.8 Hz, *J*₂ = 8.5 Hz, 1 H, 1'-H), 5.16 (m, 1 H, 7-H), 3.59 (m, 1 H, 3-H), 2.25 (m, 1 H, 20-H), 2.02 (m, 1 H, 12-H), 1.90 - 1.20 (m, 20 H), 1.12 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, 21-H), 0.80 (s, 3 H, 19-H), 0.59 (s, 3 H, 18-H)

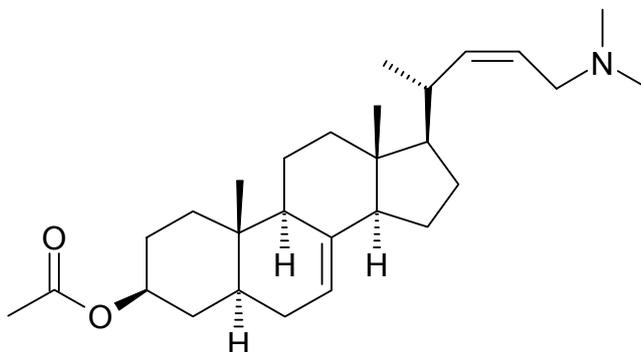
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 139.4 (C-8), 138.1 (C-1''), 137.2 (C-1'), 128.4 (2 x arom. CH), 127.4 (C-4''), 126.7 (C-2'), 125.9 (2 x arom. CH), 117.6 (C-7), 71.0 (C-3), 55.9 (C-17), 55.1 (C-14), 49.5 (C-9), 43.5 (C-13), 40.8 (C-20), 40.3 (C-5), 39.5 (C-12), 38.0 (C-1), 37.2 (C-4), 34.3 (C-10), 31.5 (C-6), 29.6 (C-16), 28.0 (C-2), 22.9 (C-15), 21.6 (C-11), 20.6 (C-21), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18)

IR: ν (cm^{-1}) = 3334, 2929, 2850, 1446, 1379, 1261, 1155, 1099, 1039, 966, 939, 845, 796, 748, 690, 627, 519

MS (CI): (m/z) (%) = 405 (28, M^++1), 131 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +25.2^\circ$ (CHCl_3 , $c = 3.9$)

(3*S*,20*R*)-3-Acetoxy-20-[3-(*N,N*-dimethylamino)-(Z)-prop-1-enyl]-pregn-7-en (23)



0.25 g (0.60 mmol) [2-(*N,N*-Dimethylamino)-ethyl]-triphenylphosphoniumbromid werden in 5 ml wasserfreiem THF unter Stickstoff, Eiskühlung und Rühren mit 0.38 ml (0.60 mmol) *n*-Butyllithium-Lösung (1.6 M in Hexan) versetzt. Nach 30 Minuten tropft man langsam eine Lösung von 0.19 g (0.50 mmol) des Aldehyds **5** in 1 ml wasserfreiem THF zu und rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit 10 ml gesättigter Na₂CO₃-Lösung versetzt und dreimal mit je 10 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Hexan / Ethylacetat / EDMA 2 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 125 mg (57%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 137 °C

Elementaranalyse: C₂₈H₄₅NO₂ (427.68)

Ber.: C: 78.64 H: 10.61 N: 3.28

Gef.: C: 78.09 H: 10.46 N: 3.11

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.32 (m, 2 H, 1'-H + 2'-H), 5.15 (m, 1 H, 7-H), 4.70 (m, 1 H, 3-H), 2.99 (d, *J* = 5.3 Hz, 2 H, 3'-H), 2.45 (m, 1 H,

20-H), 2.25 (s, 6 H, 2 x N-CH₃), 2.03 (s, 3 H, CH₃C=O), 1.99 (m, 1 H, 12-H_H), 1.90 - 1.08 (m, 19 H), 0.98 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, 21-H), 0.82 (s, 3 H, 19-H), 0.57 (s, 3 H, 18-H)

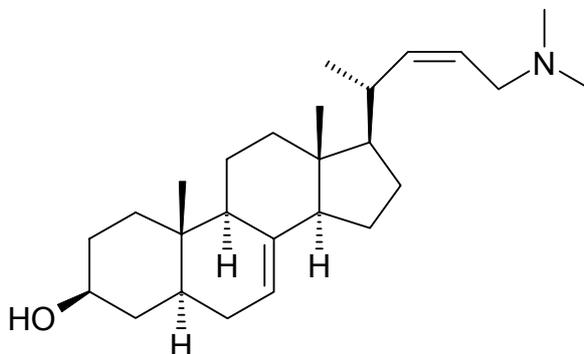
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.7 (C=O), 139.3 (C-8), 139.2 (C-1'), 123.7 (C-2'), 117.5 (C-7), 73.5 (C-3), 56.7 (C-3'), 56.1 (C-17), 55.0 (C-14), 49.3 (C-9), 45.3 (2 x N-CH₃), 43.4 (C-13), 40.1 (C-5), 39.5 (C-12), 36.9 (C-4), 35.0 (C-20), 34.3 (C-10), 33.9 (C-1), 29.6 (C-6), 27.8 (C-16), 27.6 (C-2), 22.9 (C-15), 21.5 (CH₃C=O), 21.5 (C-11), 20.7 (C-21), 13.0 (C-19), 12.2 (C-18)

IR: ν (cm⁻¹) = 2945, 1732, 1456, 1365, 1244, 1161, 1095, 1032, 974, 897, 847, 800, 723, 661, 609

MS (CI): (m/z) (%) = 428 (45, M⁺+1), 383 (30), 368 (100), 359 (96), 323 (34)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -27.4^\circ$ (CHCl₃, c = 5.2)

(3*S*,20*R*)-3-Hydroxy-20-[3-(*N,N*-dimethylamino)-(Z)-prop-1-enyl]-pregn-7-en (24)



43 mg (0.10 mmol) des Esters **23** werden in 5 ml THF gelöst, mit 5 ml 6 N-NaOH versetzt und 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Man extrahiert dreimal mit je 5 ml Diethylether und trocknet die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Hexan / Ethylacetat / EDMA 1 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (78%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 162 °C

Elementaranalyse: C₂₆H₄₃NO (385.64)

Ber.: C: 80.98 H: 11.24 N: 3.63

Gef.: C: 80.87 H: 11.27 N: 3.40

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.28 (m, 2 H, 1'-H + 2'-H), 5.15 (m, 1 H, 7-H), 3.58 (m, 1 H, 3-H), 2.95 (d, *J* = 5.3 Hz, 2 H, 3'-H), 2.42 (m, 1 H, 20-H), 2.22 (s, 6 H, 2 x N-CH₃), 1.98 (m, 1 H, 12-H), 1.90 - 1.04 (m, 20 H), 0.96 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 21-H), 0.79 (s, 3 H, 19-H), 0.56 (s, 3 H, 18-H)

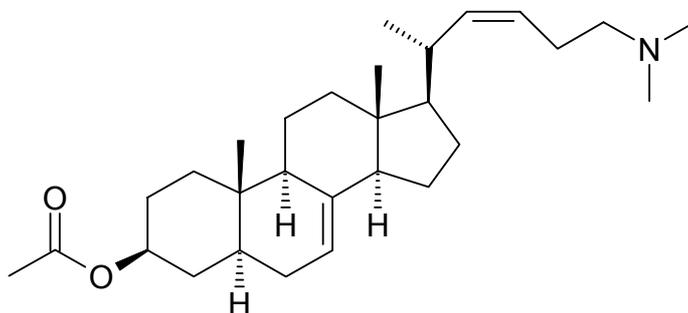
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 139.3 (C-8), 138.9 (C-1'), 123.9 (C-2'), 117.6 (C-7), 71.0 (C-3), 56.7 (C-3'), 56.0 (C-17), 55.0 (C-14), 49.4 (C-9), 45.3 (2 x N-CH₃), 43.3 (C-13), 40.2 (C-5), 39.5 (C-12), 38.0 (C-1), 37.1 (C-4), 34.9 (C-20), 34.2 (C-10), 31.5 (C-6), 29.6 (C-16), 27.8 (C-2), 22.9 (C-15), 21.5 (C-11), 20.6 (C-21), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18)

IR: ν (cm^{-1}) = 3381, 2949, 1730, 1662, 1458, 1363, 1257, 1174, 1132, 1099, 1041, 976, 939, 847, 795, 752, 727, 627

MS (CI): (m/z) (%) = 386 (94, M⁺+1), 368 (100), 301 (24)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -20.3^\circ$ (CHCl_3 , c = 0.3)

(3*S*,20*R*)-3-Acetoxy-20-[4-(*N,N*-dimethylamino)-(Z)-but-1-enyl]-pregn-7-en (26)



0.26 g (0.60 mmol) [3-(*N,N*-Dimethylamino)-propyl]-triphenylphosphoniumbromid werden in 5 ml wasserfreiem THF unter Stickstoff, Eiskühlung und Rühren mit 0.38 ml (0.60 mmol) *n*-Butyllithium-Lösung (1.6 M in Hexan) versetzt. Nach 30 Minuten tropft man langsam eine Lösung von 0.19 g (0.50 mmol) des Aldehyds **5** in 1 ml wasserfreiem THF zu und rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit 10 ml gesättigter Na₂CO₃-Lösung versetzt und dreimal mit je 10 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Hexan / Ethylacetat / EDMA 2 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 160 mg (72%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 91 °C

Elementaranalyse: C₂₉H₄₇NO₂ (441.70)

Ber.: C: 78.86 H: 10.73 N: 3.17

Gef.: C: 78.62 H: 10.92 N: 3.06

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.19 (m, 2 H, 1'-H + 2'-H), 5.13 (m, 1 H, 7-H), 4.68 (m, 1 H, 3-H), 2.41 (m, 1 H, 20-H), 2.28 (m, 2 H, 4'-H), 2.24 (s, 6 H, 2 x N-CH₃), 2.22 (m, 2 H, 3'-H), 2.02 (s, 3 H, CH₃C=O),

1.98 (m, 1 H, 12-H), 1.90 - 1.20 (m, 18 H), 1.15 (m, 1 H, 4-H), 0.96 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, 21-H), 0.80 (s, 3 H, 19-H), 0.55 (s, 3 H, 18-H)

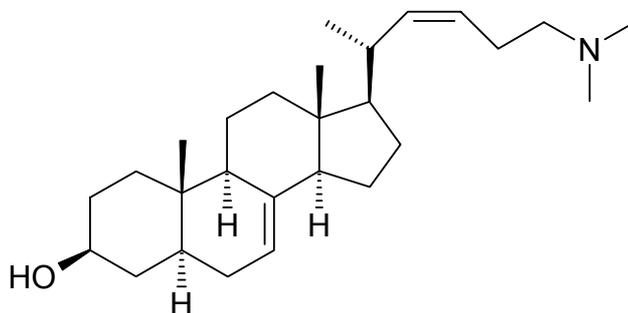
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7 (C=O), 139.4 (C-8), 137.8 (C-1'), 123.8 (C-2'), 117.5 (C-7), 73.5 (C-3), 59.7 (C-4'), 56.0 (C-17), 55.1 (C-14), 49.4 (C-9), 45.4 (2 x N-CH₃), 43.4 (C-13), 40.1 (C-5), 39.5 (C-12), 36.9 (C-4), 34.8 (C-20), 34.3 (C-10), 33.9 (C-1), 29.6 (C-6), 27.8 (C-16), 27.6 (C-2), 26.2 (C-3'), 23.0 (C-15), 21.5 (C-11), 21.5 (CH₃C=O), 21.0 (C-21), 13.0 (C-19), 12.3 (C-18)

IR: ν (cm⁻¹) = 2951, 2871, 2821, 2767, 1740, 1462, 1369, 1247, 1165, 1093, 1034, 974, 943, 899, 876, 847, 787, 752, 725, 661, 607

MS (CI): (m/z) (%) = 442 (62, M⁺+1), 382 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -28.3^\circ$ (CHCl₃, c = 1.0)

(3*S*,20*R*)-3-Hydroxy-20-[4-(*N,N*-dimethylamino)-(Z)-but-1-enyl]-pregn-7-en (27)



44 mg (0.10 mmol) des Esters **26** werden in 5 ml THF gelöst, mit 5 ml 6 N-NaOH versetzt und 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Man extrahiert dreimal mit je 5 ml Diethylether und trocknet die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan / EDMA 1 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 32 mg (80%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 127 °C

Elementaranalyse: C₂₇H₄₅NO (399.67)

Ber.: C: 81.14 H: 11.35 N: 3.50

Gef.: C: 80.84 H: 11.69 N: 3.32

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.18 (m, 2 H, 1'-H + 2'-H), 5.14 (m, 1 H, 7-H), 3.58 (m, 1 H, 3-H), 2.41 (m, 1 H, 20-H), 2.27 (m, 2 H, 4'-H), 2.24 (s, 6 H, 2 x N-CH₃), 2.19 (m, 2 H, 3'-H), 1.98 (m, 1 H, 12-H_H), 1.85 - 1.70 (m, 7 H, 4-H_H + 14-H + 6-H_H + 2-H_H + 16-H_H + 1-H_H + OH), 1.65 (m, 1 H, 9-H), 1.58 (m, 1 H, 11-H_H), 1.50 (m, 2 H, 11-H_H + 15-H_H), 1.38 (m, 3 H, 15-H_H + 6-H_H + 5-H), 1.27 (m, 4 H, 1-H_H + 16-H_H + 12-H_H + 17-H), 1.18 (m, 1 H,

2-HH), 1.08 (m, 1 H, 4-HH), 0.95 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, 21-H),
0.79 (s, 3 H, 19-H), 0.56 (s, 3 H, 18-H)

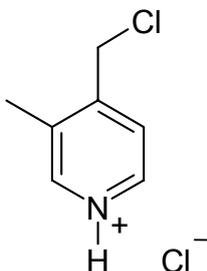
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 139.4 (C-8), 137.7 (C-1'), 123.8 (C-2'), 117.5 (C-7),
70.9 (C-3), 59.7 (C-4'), 56.0 (C-17), 55.0 (C-14), 49.4 (C-9),
45.4 (2 x N-CH₃), 43.3 (C-13), 40.2 (C-5), 39.5 (C-12), 38.0
(C-1), 37.1 (C-4), 34.8 (C-20), 34.2 (C-10), 31.5 (C-6), 29.6
(C-16), 27.8 (C-2), 26.2 (C-3'), 22.9 (C-15), 21.5 (C-11), 20.9
(C-21), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18)

IR: ν (cm^{-1}) = 3138, 2945, 2850, 2805, 1461, 1442, 1379, 1360,
1306, 1257, 1176, 1151, 1132, 1101, 1061, 1039, 1011, 978,
939, 874, 829, 795, 752, 710, 629, 515

MS (CI): (m/z) (%) = 400 (96, $\text{M}^+ + 1$), 382 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -18.1^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1.0$)

4-Chlormethyl-3-methylpyridinhydrochlorid (29)



In eine Lösung von 4-Hydroxymethyl-3-methylpyridin (**9**) in Diethylether wird 5 Minuten lang Chlorwasserstoffgas eingeleitet. 3.2 g (20 mmol) des ausgefällten Hydrochlorids werden in 20 ml Chloroform suspendiert, tropfenweise mit einer Lösung von 4.8 g (40 mmol) Thionylchlorid in 10 ml Chloroform versetzt und 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Überschüssiges Thionylchlorid wird durch Zugabe von 10 ml Ethanol zerstört, anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 3.5 g (98%)

gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 169 °C

Elementaranalyse: C₇H₉Cl₂N (178.06)

Ber.: C: 47.22 H: 5.09 N: 7.87

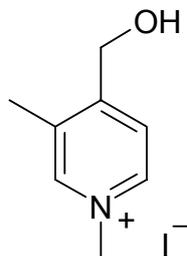
Gef.: C: 46.33 H: 5.37 N: 7.62

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.85 (s, 1 H, 2-H), 8.83 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, 6-H), 8.10 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, 5-H), 5.06 (s, 2 H, CH₂), 2.50 (s, 3 H, 3-CH₃)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 154.1 (C-4), 141.7 (C-2), 139.9 (C-6), 136.5 (C-3), 126.0 (C-5), 41.8 (CH₂), 15.2 (3-CH₃)

IR: ν (cm⁻¹) = 2943, 2060, 1726, 1633, 1595, 1504, 1477, 1406, 1377, 1302, 1236, 1173, 1142, 1124, 1070, 1045, 1011, 931, 916, 833, 775, 744, 700, 600, 432

MS (CI): (m/z) (%) = 142 (100, M⁺+1 - HCl)

1,3-Dimethyl-4-hydroxymethylpyridiniumiodid (32)

0.12 g (1.0 mmol) des Pyridinderivates **9**, in möglichst wenig Aceton gelöst, werden mit 0.28 g Methyljodid (2.0 mmol) versetzt und eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen fällt das entstandene Methiodid größtenteils aus, Zugabe von Diethylether vervollständigt die Fällung. Wurde der Ausgangsstoff in zuviel Aceton gelöst, so bleibt das Produkt nach Abkühlen in Lösung. Auch in diesem Fall kann durch Zusatz größerer Mengen Diethylether eine quantitative Ausfällung erreicht werden. Der Niederschlag wird abfiltriert und aus Ethanol / Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 250 mg (94%)

gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 153 °C

Elementaranalyse: C₈H₁₂INO (265.09)

Ber.: C: 36.25 H: 4.56 N: 5.28

Gef.: C: 36.25 H: 4.54 N: 5.24

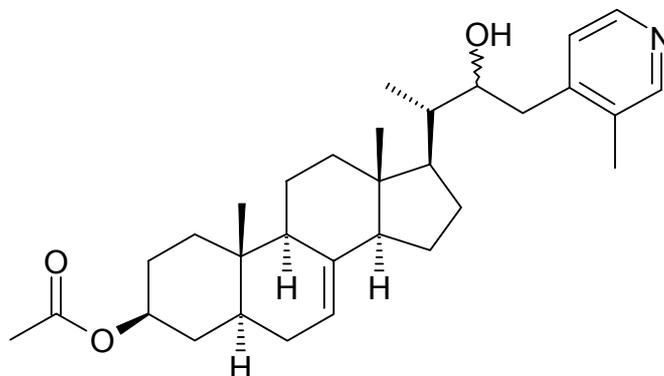
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.80 (d, *J* = 6.3 Hz, 1 H, 6-H), 8.79 (s, 1 H, 2-H), 8.01 (d, *J* = 6.3 Hz, 1 H, 5-H), 5.89 (t, *J* = 5.2 Hz, 1 H, OH), 4.75 (d, *J* = 5.2 Hz, 2 H, CH₂), 4.28 (s, 3 H, 1-CH₃), 2.34 (s, 3 H, 3-CH₃)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 160.8 (C-4), 144.0 (C-2), 143.4 (C-6), 135.0 (C-3),

123.2 (C-5), 60.1 (CH₂), 47.5 (1-CH₃), 15.3 (3-CH₃)

IR: ν (cm⁻¹) = 3284, 3020, 2794, 1950, 1817, 1693, 1643, 1577, 1485, 1458, 1419, 1387, 1313, 1267, 1228, 1174, 1147, 1061, 1009, 957, 912, 852, 727, 698, 577, 536, 430

MS (CI): (m/z) (%) = 138 (100, M⁺+1 - HI), 137 (60), 122 (18)

(3S,20S)-3-Acetoxy-20-[1-Hydroxy-2-(3-methylpyridin-4-yl)-ethyl]-pregn-7-en (Diastereomerengemisch) (38)

Zu einer Lösung von 2.0 g (20 mmol) Diisopropylamin in 60 ml wasserfreiem THF werden unter Stickstoff und Rühren 12 ml (20 mmol) *n*-Butyllithium-Lösung (1.6 M in Hexan) getropft. Nach 15 Minuten erfolgt die langsame Zugabe einer Lösung von 2.2 g (20 mmol) 3,4-Lutidin in 20 ml wasserfreiem THF. Man rührt eine Stunde, kühlt dann die resultierende intensiv rote Lösung auf -78 °C ab und tropft eine Lösung von 4.0 g (11 mmol) des Aldehyds **5** in 20 ml wasserfreiem THF langsam zu. Nach weiteren 5 Minuten wird die nun hellgelbe Suspension in 120 ml Wasser gegeben und anschließend dreimal mit je 60 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan / Methanol 1 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 2.1 g (41%)* von **38**

weißer Feststoff

850 mg (18%) von **39**

*900 mg (23%) des Aldehyds **5** konnten wiedergewonnen werden. Bezogen auf die Menge an umgesetztem Edukt beträgt die Ausbeute von **38** 53%.

Schmelzpunkt: 211 °C

Elementaranalyse: C₃₁H₄₅NO₃ (479.71)

Ber.: C: 77.62 H: 9.46 N: 2.92

Gef.: C: 77.43 H: 9.52 N: 2.64

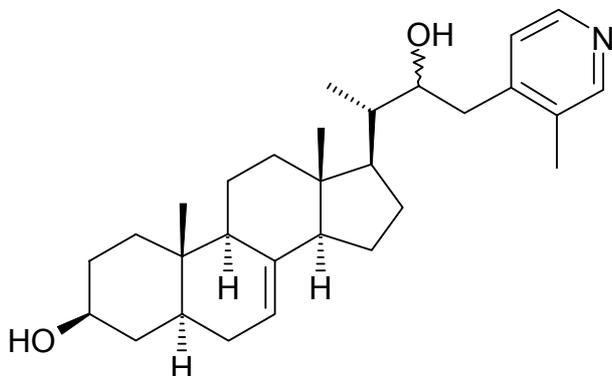
¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 8.33 (s, 1 H, 2''-H + d, J = 4.9 Hz, 1 H, 6''-H), 7.09 (d, J = 4.9 Hz, 1 H, 5''-H), 5.16 (m, 1 H, 7-H), 4.70 (m, 1 H, 3-H), 3.94 (m, 1 H, 1'-H), 2.82 (m, 1 H, 2'-HH), 2.63 (m, 1 H, 2'-HH), 2.30 (s, 3 H, 3''-CH₃), 2.03 (s, 3 H, CH₃C=O), 2.02 (m, 1 H, 12-HH), 1.98 - 1.20 (m, 20 H), 1.13 (m, 1 H, 4-HH), 1.06 (d, J = 6.0 Hz, 3 H, 21-H), 0.81 (s, 3 H, 19-H), 0.54 (s, 3 H, 18-H)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.7 (C=O), 150.6 (C-2''), 147.3 (C-4''), 147.1 (C-6''), 139.1 (C-8), 132.2 (C-3''), 124.7 (C-5''), 117.6 (C-7), 73.4 (C-3), 72.8 (C-1'), 54.8 (C-14), 52.5 (C-17), 49.2 (C-9), 43.3 (C-13), 41.7 (C-20), 40.0 (C-5), 39.5 (C-12), 38.8 (C-2'), 36.8 (C-4), 34.2 (C-10), 33.8 (C-1), 29.5 (C-6), 27.6 (C-16), 27.5 (C-2), 22.9 (C-15), 21.5 (C-11), 21.4 (C-CH₃C=O), 16.4 (3''-CH₃), 12.9 (C-19), 12.2 (C-21), 11.8 (C-18)

IR: ν (cm⁻¹) = 3246, 2949, 2868, 1728, 1599, 1446, 1379, 1242, 1163, 1095, 1032, 897, 818, 607, 525

MS (CI): (m/z) (%) = 480 (20, M⁺+1), 420 (28), 136 (60), 107 (100)

(3S,20S)-3-Hydroxy-20-[1-Hydroxy-2-(3-methylpyridin-4-yl)-ethyl]-pregn-7-en (Diastereomerengemisch) (39)



Die Substanz fällt als Nebenprodukt bei der Darstellung von **38** an.

Ausbeute: 850 mg (18%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 231 °C

Elementaranalyse: C₂₉H₄₃NO₂ (437.67)

Ber.: C: 79,59 H: 9,90 N: 3,20

Gef.: C: 79.32 H: 9.93 N: 3.07

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 8.27 (s, 1 H, 2''-H + d, J = 5.2 Hz, 1 H, 6''-H), 7.11 (d, J = 5.2 Hz, 1 H, 5''-H), 5.14 (m, 1 H, 7-H), 3.90 (m, 1 H, 1'-H), 3.57 (m, 1 H, 3-H), 2.82 (m, 1 H, 2'-HH), 2.59 (m, 1 H, 2'-HH), 2.28 (s, 3 H, 3''-CH₃), 2.01 (m, 1 H, 12-HH), 1.96 - 1.20 (m, 21 H), 1.04 (d, J = 6.4 Hz, 3 H, 21-H + m, 1 H, 4-HH), 0.77 (s, 3 H, 19-H), 0.52 (s, 3 H, 18-H)

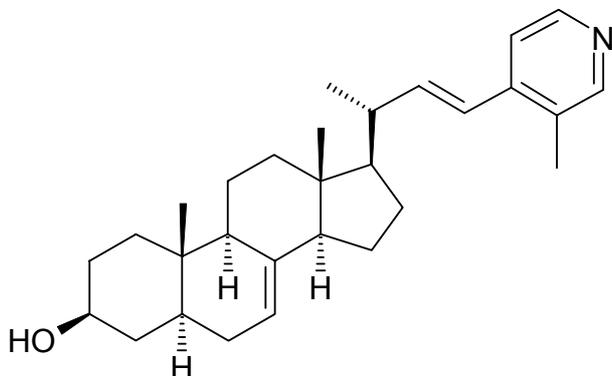
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 150.2 (C-2''), 147.8 (C-4''), 146.8 (C-6''), 139.2 (C-8), 132.4 (C-3''), 124.8 (C-5''), 117.8 (C-7), 72,7 (C-1'), 70.9 (C-3), 54.9 (C-14), 52.5 (C-17), 49.4 (C-9), 43.3 (C-13), 41.7

(C-20), 40.2 (C-5), 39.5 (C-12), 38.8 (C-2'), 37.9 (C-1), 37.1 (C-4), 34.2 (C-10), 31.4 (C-6), 29.6 (C-16), 27.6 (C-2), 22.9 (C-15), 21.5 (C-11), 16.5 (3''-CH₃), 13.1 (C-19), 12.2 (C-21), 11.8 (C-18)

IR: ν (cm⁻¹) = 3398, 2937, 2871, 1726, 1601, 1446, 1381, 1261, 1039, 822, 748, 702

MS (CI): (m/z) (%) = 438 (100, M⁺+1), 420 (58), 150 (50), 108 (70)

(3*S*,20*R*)-3-Hydroxy-20-[2-(3-methylpyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en (40)



0.11 g (0.25 mmol) des Esters **12** werden in 10 ml THF gelöst, mit 10 ml 6 N-NaOH versetzt und 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Man extrahiert dreimal mit je 10 ml Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan / Methanol 2 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 95 mg (90%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 180 °C

Elementaranalyse: C₂₉H₄₁NO (419.66)

Ber.: C: 83.00 H: 9.85 N: 3.34

Gef.: C: 82.62 H: 9.88 N: 3.16

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 8.33 (s, 1 H, 2''-H + d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, 6''-H), 7.24 (d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, 5''-H), 6.42 (d, *J* = 15.8 Hz, 1 H, 2'-H), 6.17 (dd, *J*₁ = 15.8 Hz, *J*₂ = 9.0 Hz, 1 H, 1'-H), 5.17 (m, 1 H, 7-H), 3.60 (m, 1 H, 3-H), 2.32 (m, 1 H, 20-H), 2.30 (s, 3 H, 3''-CH₃), 2.04 (m, 1 H, 12-H), 1.90 - 1.20 (m, 19 H), 1.15 (d, *J* =

6.6 Hz, 3 H, 21-H), 1.09 (m, 1 H, 4-H_H), 0.81 (s, 3 H, 19-H),
0.61 (s, 3 H, 18-H)

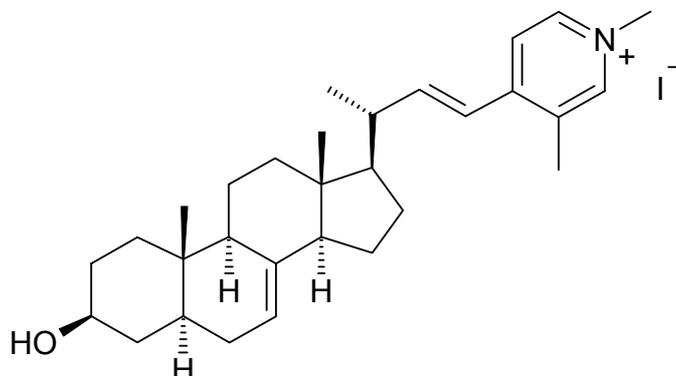
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 151.0 (C-2''), 147.4 (C-6''), 144.4 (C-4''), 142.7 (C-1'), 139.2 (C-8), 129.9 (C-3''), 123.0 (C-2'), 119.2 (C-5''), 117.8 (C-7), 70.9 (C-3), 55.5 (C-17), 55.0 (C-14), 49.4 (C-9), 43.6 (C-13), 41.2 (C-20), 40.2 (C-5), 39.4 (C-12), 38.0 (C-1), 37.1 (C-4), 34.2 (C-10), 31.5 (C-6), 29.6 (C-16), 28.1 (C-2), 22.9 (C-15), 21.5 (C-11), 20.4 (C-21), 16.6 (3''-CH₃), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18)

IR: ν (cm⁻¹) = 3423, 3205, 2929, 2871, 1732, 1645, 1597, 1448, 1454, 1406, 1379, 1306, 1248, 1194, 1159, 1130, 1097, 1055, 968, 847, 818, 741

MS (EI): (m/z) (%) = 419 (24, M⁺), 271 (78), 147 (54), 107 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +26.9^\circ$ (CHCl₃, c = 1.0)

(3*S*,20*R*)-4-[2-(3-Hydroxypregn-7-en-20-yl)-(E)-ethenyl]-1,3-dimethylpyridiniumiodid (41)



42 mg (0.10 mmol) des Pyridinderivates **40**, in möglichst wenig Aceton gelöst, werden mit 28 mg (0.20 mmol) Methyliodid versetzt und eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen fällt das entstandene Methiodid größtenteils aus, Zugabe von Diethylether vervollständigt die Fällung. Wurde der Ausgangsstoff in zuviel Aceton gelöst, so bleibt das Produkt nach Abkühlen in Lösung. Auch in diesem Fall kann durch Zusatz größerer Mengen Diethylether eine quantitative Ausfällung erreicht werden. Der Niederschlag wird abfiltriert und aus Ethanol / Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 53 mg (94%)

gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 236 °C

Elementaranalyse: C₃₀H₄₄INO (561.59)

Ber.: C: 64.16 H: 7.90 N: 2.49

Gef.: C: 63.64 H: 7.95 N: 2.36

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.78 (s, 1 H, 2-H), 8.67 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H, 6-H), 8.17 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H, 5-H), 6.87 (dd, *J*₁ = 15.6 Hz, *J*₂ =

9.1 Hz, 1 H, 2'-H), 6.70 (d, $J = 15.6$ Hz, 1 H, 1'-H), 5.12 (m, 1 H, 7''-H), 4.20 (s, 3 H, 1-CH₃), 3.35 (m, 1 H, 3''-H), 2.45 (m, 1 H, 20''-H), 2.41 (s, 3 H, 3-CH₃), 2.00 (m, 1 H, 12''-HH), 1.83 (m, 1 H, 14''-H), 1.80 - 1.20 (m, 18 H), 1.14 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 21''-H), 1.02 (m, 1 H, 4''-HH), 0.73 (s, 3 H, 18''-H), 0.57 (s, 3 H, 18''-H)

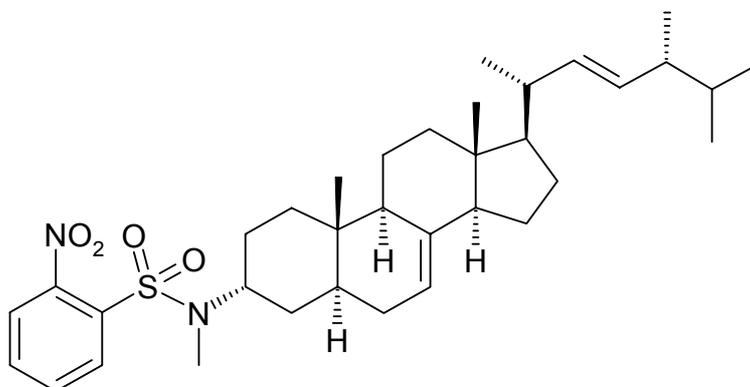
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 151.7 (C-4), 150.7 (C-2'), 145.1 (C-2), 142.1 (C-6), 138.8 (C-8''), 133.7 (C-3), 121.8 (C-5), 120.9 (C-1'), 117.4 (C-7''), 68.9 (C-3''), 54.4 (C-17''), 54.2 (C-14''), 48.8 (C-9''), 46.6 (1-CH₃), 43.2 (C-13''), 40.9 (C-20''), 39.7 (C-5''), 38.7 (C-12''), 37.8 (C-1''), 36.6 (C-4''), 33.8 (C-10''), 31.2 (C-6''), 29.2 (C-16''), 27.1 (C-2''), 22.5 (C-15''), 21.0 (C-11''), 19.6 (C-21''), 16.2 (3-CH₃), 12.8 (C-19''), 12.0 (C-18'')

IR: ν (cm⁻¹) = 3379, 3037, 2927, 2873, 1628, 1504, 1473, 1444, 1379, 1323, 1228, 1132, 1099, 1039, 976, 895, 866, 845, 796, 629, 559

MS (ESI): (m/z) (%) = 434 (100, M⁺+1 - HI), 191 (35), 107 (65)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +88.4^\circ$ (MeOH, c = 0.25)

***N*-[(3*R*)-Ergosta-7,22*E*-dien-3-yl]-*N*-methyl-2-nitrobenzol-sulfonsäureamid (45)**



0.22 g (1.0 mmol) *N*-Methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid und 0.39 g (1.5 mmol) Triphenylphosphan werden in 5 ml wasserfreiem THF gelöst. Unter Stickstoff und Rühren werden zunächst 0.20 g (0.50 mmol) 5,6-Dihydroergosterol (**3**) und danach 0.26 g (1.5 mmol) DEAD zugegeben. Man rührt 3 Stunden bei Raumtemperatur, anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Hexan / Ethylacetat 2 : 1) gereinigt.

Ausbeute: 160 mg (54%)

gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 159 °C

Elementaranalyse: C₃₅H₅₂N₂O₄S (596.88)

Ber.: C: 70.43 H: 8.78 N: 4.69

Gef.: C: 70.37 H: 8.62 N: 4.74

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 8.02 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, 3-H), 7.66 (m, 2 H, 4-H + 5-H), 7.62 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, 6-H), 5.20 (m, 3 H, 7'-H + 22'-H + 23'-H), 4.08 (m, 1 H, 3'-H), 3.05 (s, 3 H, N-CH₃), 2.02 (m, 2 H, 12'-H + 20'-H), 1.92 - 1.33 (m, 18 H), 1.25 (m, 3 H,

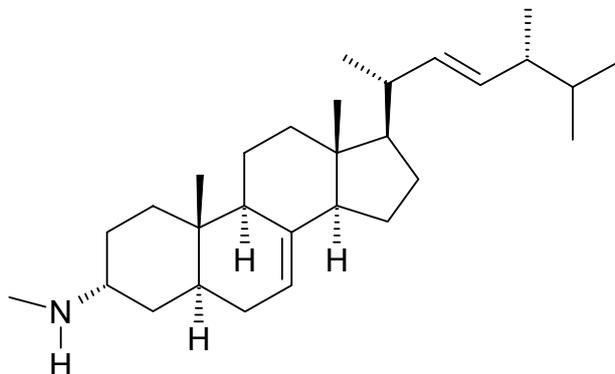
12'-HH + 16'-HH + 17'-H), 1.01 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 21'-H), 0.90 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H, 28'-H), 0.83 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H, 26'-H), 0.81 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, 27'-H), 0.74 (s, 3 H, 19'-H), 0.54 (s, 3 H, 18'-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 148.2 (C-2), 139.7 (C-8'), 135.7 (C-22'), 133.5 (C-1), 133.3 (C-5), 132.0 (C-23'), 131.6 (C-4), 131.0 (C-3), 124.2 (C-6), 117.4 (C-7'), 56.0 (C-17'), 55.3 (C-14'), 51.5 (C-3'), 49.8 (C-9'), 43.5 (C-13'), 42.9 (C-24'), 40.6 (C-20'), 39.5 (C-12'), 37.3 (C-5'), 34.7 (C-1'), 33.9 (C-10'), 33.2 + 33.1 (C-25' + N-CH₃), 32.0 (C-4'), 29.8 (C-6'), 28.2 (C-16'), 25.9 (C-2'), 22.9 (C-15'), 21.4 (C-11'), 21.2 (C-21'), 20.0 (C-26'), 19.7 (C-27'), 17.7 (C-28'), 13.2 (C-19'), 12.2 (C-18')

IR: ν (cm⁻¹) = 2954, 2871, 1543, 1458, 1371, 1346, 1321, 1215, 1159, 1059, 970, 949, 922, 852, 781, 762, 737, 661, 590, 579, 532

MS (CI): (m/z) (%) = 597 (5, M⁺+1), 412 (84), 381 (60), 295 (40), 125 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +2.1^\circ$ (CHCl₃, c = 1.0)

3 α -Methylaminoergosta-7,22E-dien (52)

0.12 g (0.20 mmol) des Sulfonamids **45** werden in 5 ml Acetonitril gelöst. Man gibt 28 mg (0.25 mmol) Thiophenol und 0.20 g (0.60 mmol) Cäsiumcarbonat dazu und rührt 12 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan / EDMA 1 : 1 : 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 65 mg (78%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 102 °C

Elementaranalyse: C₂₉H₄₉N (411.72)

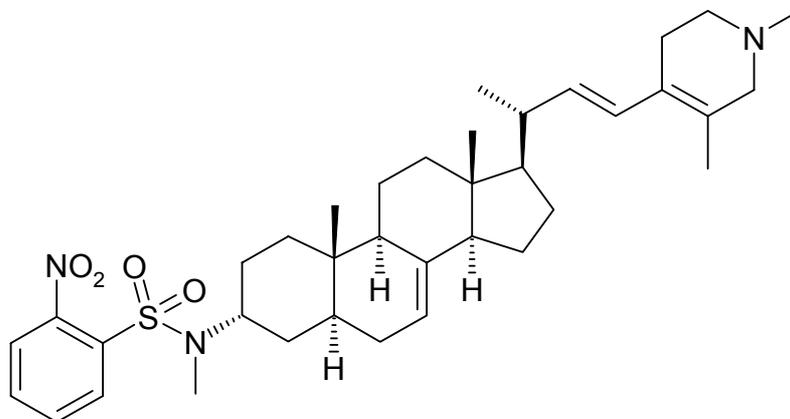
Ber.: C: 84.60 H: 12.00 N: 3.40

Gef.: C: 83.85 H: 11.91 N: 3.27

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.17 (m, 3 H, C-7 + C-22 + C-23), 2.72 (m, 1 H, 3-H), 2.38 (s, 3 H, N-CH₃), 2.01 (m, 2 H, 20-H + 12-H_H), 1.85 (m, 1 H, 24-H), 1.82 - 1.16 (m, 21 H), 1.01 (d, J = 6.5 Hz, 3 H, 21-H), 0.91 (d, J = 6.6 Hz, 3 H, 28-H), 0.84 (d, J = 6.5 Hz, 3 H, 27-H), 0.82 (d, J = 6.4 Hz, 3 H, 26-H), 0.80 (s, 3 H, 19-H), 0.55 (s, 3 H, 18-H)

- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 139.5 (C-8), 135.7 (C-22), 131.8 (C-23), 117.6 (C-7), 56.0 (C-17), 55.2 (C-14), 54.2 (C-3), 49.7 (C-9), 43.4 (C-13), 42.8 (C-24), 40.5 (C-20), 39.5 (C-12), 35.1 (C-5), 34.9 (C-10), 34.1 (N-CH₃), 33.1 (C-25), 32.5 + 32.4 (C-1 + C-4), 29.7 (C-6), 28.1 (C-16), 25.5 (C-2), 22.9 (C-15), 21.3 (C-11), 21.2 (C-21), 20.0 (C-26), 19.6 (C-27), 17.6 (C-28), 12.4 (C-19), 12.1 (C-18)
- IR:** ν (cm^{-1}) = 3429, 2951, 2787, 1456, 1367, 1275, 1250, 1203, 1169, 1124, 1099, 1045, 1022, 997, 966, 939, 847, 827, 798, 746, 667
- MS (EI):** (m/z) (%) = 411 (68, M⁺), 396 (50), 354 (36), 286 (24), 70 (100)
- Optische Drehung:** $[\alpha]_D^{20} = -2.2^\circ$ (CHCl_3 , c = 1.0)

**(3*R*,20*R*)-*N*-{20-[2-(1,3-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)-
(*E*)-ethenyl]-pregn-7-en-3-yl]-*N*-methyl-2-nitrobenzol-
sulfonsäureamid (53)**



0.38 g (0.50 mmol) des Methoiodids **55** werden in 15 ml Ethanol 90% gelöst. Unter Eiskühlung und Rühren tropft man eine Lösung von 0.06 g (1.5 mmol) NaBH₄ in 2 ml Ethanol 90% langsam zu. Es wird zwei Stunden unter Eiskühlung und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges NaBH₄ zerstört man durch vorsichtige Zugabe von 2 N-HCl. Danach wird mit 2 N-NaOH alkalisiert und dreimal mit je 10 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan / EDMA 1 : 1 : 0,1) gereinigt.

Ausbeute: 230 mg (72%)

gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 79 °C

Elementaranalyse: C₃₇H₅₃N₃O₄S (635.92)

Ber.: C: 69.89 H: 8.40 N: 6.61

Gef.: C: 70.23 H: 8.69 N: 6.04

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 8.02 (d, *J* = 9.5 Hz, 1 H, 3-H), 7.67 (m, 2 H, 4-H +

5-H), 7.61 (d, $J = 9.5$ Hz, 1 H, 6-H), 6.34 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H, 2''-H), 5.42 (dd, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, 1 H, 1''-H), 5.14 (m, 1 H, 7'-H), 4.07 (m, 1 H, 3'-H), 3.04 (s, 3 H, SO₂N-CH₃), 2.86 (m, 2 H, 2'''-H), 2.51 (m, 2 H, 6'''-H), 2.33 (s, 3 H, 1'''-CH₃), 2.25 (m, 2 H, 5'''-H), 2.13 (m, 1 H, 20'-H), 2.05 (m, 1 H, 12'-HH), 1.90 - 1.10 (m, 19 H), 1.71 (s, 3 H, 3'''-CH₃), 1.05 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, 21'-H), 0.75 (s, 3 H, 19'-H), 0.56 (s, 3 H, 18'-H)

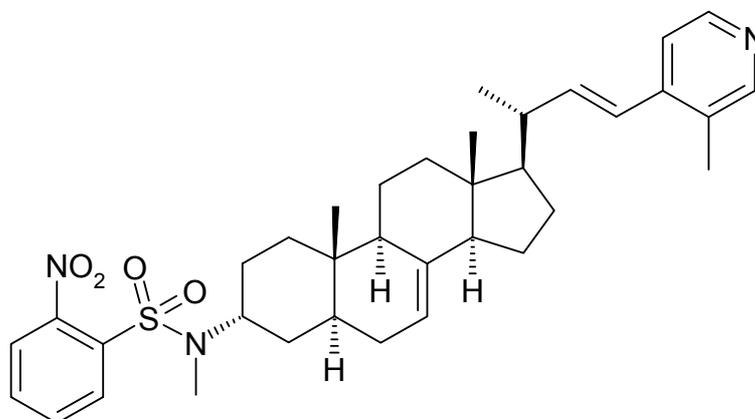
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 148.1 (C-2), 139.6 (C-8'), 134.7 (C-1''), 133.3 (C-1), 133.2 (C-5), 131.5 (C-4), 131.0 (C-3), 127.8 (C-4'''), 126.2 (C-3'''), 124.9 (C-2''), 124.2 (C-6), 117.5 (C-7'), 60.5 (C-2'''), 56.0 (C-17'), 55.2 (C-14'), 52.4 (C-6'''), 51.5 (C-3'), 49.7 (C-9'), 45.7 (1'''-CH₃), 43.5 (C-13'), 41.0 (C-20'), 39.4 (C-12'), 37.2 (C-5'), 34.7 (C-1'), 33.8 (C-10), 33.1 (SO₂N-CH₃), 31.9 (C-4'), 29.7 (C-6'), 28.1 (C-16'), 26.6 (C-5'''), 25.9 (C-2'), 22.8 (C-15'), 21.3 (C-11'), 21.0 (C-21'), 16.5 (3'''-CH₃), 13.1 (C-19'), 12.2 (C-18')

IR: ν (cm⁻¹) = 2931, 1545, 1458, 1371, 1346, 1292, 1217, 1159, 1124, 1059, 964, 922, 850, 779, 759, 740, 727, 661, 642, 579, 532

MS (EI): (m/z) (%) = 635 (3, M⁺), 448 (30), 433 (47), 122 (41), 110 (53), 84 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +23.0^\circ$ (CHCl₃, c = 0.5)

(3*R*,20*R*)-*N*-{20-[2-(3-Methylpyridin-4-yl)-(E)-ethenyl]-pregn-7-en-3-yl}-*N*-methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid (54)



0.88 g (4.0 mmol) *N*-Methyl-2-nitrobenzolsulfonsäureamid und 1.56 g (6.00 mmol) Triphenylphosphan werden in 20 ml wasserfreiem THF gelöst. Unter Stickstoff und Rühren werden zunächst 0.84 g (2.0 mmol) des sekundären Alkohols **40** und danach 1.04 g (6.00 mmol) DEAD zugegeben. Man rührt 3 Stunden bei Raumtemperatur, anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels FSC (Ethylacetat / Hexan 2 : 1) gereinigt.

Ausbeute: 740 mg (60%)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 84 °C

Elementaranalyse: C₃₆H₄₇N₃O₄S (617.86)

Ber.: C: 69.98 H: 7.67 N: 6.80

Gef.: C: 69.59 H: 7.92 N: 6.59

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 8.32 (s, 1 H, 2'''-H + d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, 6'''-H), 8.02 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, 3-H), 7.66 (m, 2 H, 4-H + 5-H), 7.61 (d, *J* = 9.3 Hz, 1 H, 6-H), 7.22 (d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, 5'''-H), 6.41 (d, *J* = 15.7 Hz, 1 H, 2''-H), 6.16 (dd, *J*₁ = 15.7 Hz, *J*₂ = 9.0 Hz, 1 H,

1''-H), 5.15 (m, 1 H, 7'-H), 4.06 (m, 1 H, 3'-H), 3.03 (s, 3 H, N-CH₃), 2.30 (m, 1 H, 20'-H), 2.28 (s, 3 H, 3'''-CH₃), 2.03 (m, 1-H, 12'-HH), 1.90 - 1.20 (m, 19 H) 1.14 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, 21'-H), 0.76 (s, 3 H, 19'-H), 0.59 (s, 3 H, 18'-H)

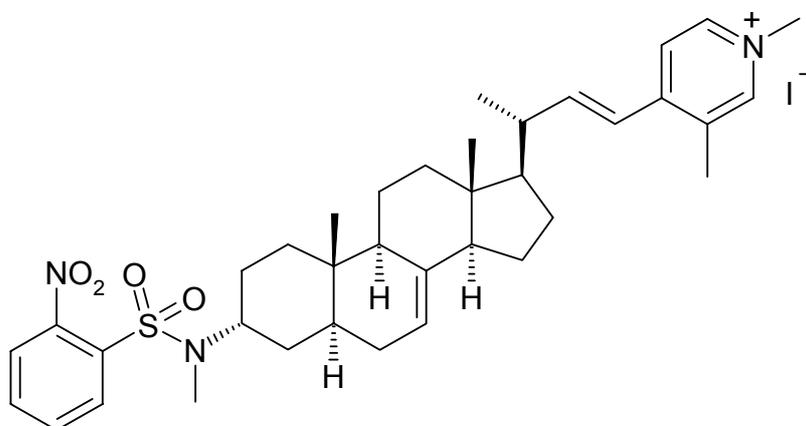
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 151.0 (C-2'''), 148.1 (C-2), 147.4 (C-6'''), 144.4 (C-4'''), 142.6 (C-1''), 139.3 (C-8'), 133.4 (C-1), 133.3 (C-5), 131.5 (C-4), 131.0 (C-3), 129.8 (C-3'''), 124.2 (C-6), 123.1 (C-2''), 119.2 (C-5'''), 117.7 (C-7'), 55.4 (C-17'), 55.0 (C-14'), 51.4 (C-3'), 49.6 (C-9'), 43.7 (C-13'), 41.2 (C-20'), 39.4 (C-12'), 37.2 (C-5'), 34.6 (C-1'), 33.8 (C-10'), 33.1 (N-CH₃), 31.9 (C-4'), 29.7 (C-6'), 28.0 (C-16'), 25.9 (C-2'), 22.8 (C-15'), 21.3 (C-11'), 20.3 (C-21'), 16.6 (3'''-CH₃), 13.1 (C-19'), 12.2 (C-18')

IR: ν (cm⁻¹) = 2933, 1736, 1643, 1590, 1545, 1446, 1406, 1371, 1219, 1159, 1124, 1059, 972, 922, 850, 779, 760, 741, 727, 661, 642, 579, 534

MS (EI): (m/z) (%) = 617 (5, M⁺), 577 (64), 402 (44), 120 (62), 174 (44), 147 (76), 107 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +39.2^\circ$ (CHCl₃, c = 0.5)

(3R,20R)-4-{2-[3-(N-Methyl-2-nitrobenzolsulfamoyl)-pregn-7-en-20-yl]-*(E)*-ethenyl}-1,3-dimethylpyridiniumiodid (55)



0.25 g (0.40 mmol) des Pyridinderivates **54**, in möglichst wenig Aceton gelöst, werden mit 0.14 g (1.0 mmol) Methyljodid versetzt und eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen fällt das entstandene Methiodid größtenteils aus, Zugabe von Diethylether vervollständigt die Fällung. Wurde der Ausgangsstoff in zuviel Aceton gelöst, so bleibt das Produkt nach Abkühlen in Lösung. Auch in diesem Fall kann durch Zusatz größerer Mengen Diethylether eine quantitative Ausfällung erreicht werden. Der Niederschlag wird abfiltriert und aus Ethanol / Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 290 mg (96%)

gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 210 °C

Elementaranalyse: C₃₇H₅₀N₃O₄SI (759.79)

Ber.: C: 58.49 H: 6.63 I: 16.70 N: 5.53

Gef.: C: 58.21 H: 6.96 I: 15.97 N: 5.21

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.76 (s, 1 H, 2-H), 8.67 (d, *J* = 6.6 Hz, 1 H, 6-H),

8.15 (d, $J = 6.6$ Hz, 1 H, 5-H), 7.97 (m, 2 H, 3'''-H + 6'''-H), 7.86 (m, 2 H, 4'''-H + 5'''-H), 6.89 (dd, $J_1 = 15.7$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, 1 H, 2'-H), 6.70 (d, $J = 15.7$ Hz, 1 H, 1'-H), 5.12 (m, 1 H, 7''-H), 4.20 (s, 3 H, 1-CH₃), 3.95 (m, 1 H, 3''-H), 2.98 (s, 3 H, SO₂N-CH₃), 2.45 (m, 1 H, 20''-H), 2.41 (s, 3 H, 3-CH₃), 2.02 (m, 1 H, 12''-HH), 1.90 - 1.20 (m, 19 H), 1.13 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, 21''-H), 0.71 (s, 3 H, 19''-H), 0.57 (s, 3 H, 18''-H)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 151.7 (C-4), 150.7 (C-2'), 147.5 (C-2'''), 145.0 (C-2), 142.1 (C-6), 138.8 (C-8''), 134.3 (C-5'''), 133.7 (C-3), 132.3 (C-4'''), 131.4 (C-1'''), 129.7 (C-3'''), 124.1 (C-6'''), 121.7 (C-5), 120.9 (C-1'), 117.3 (C-7''), 54.4 (C-17''), 54.3 (C-14''), 51.0 (C-3''), 48.6 (C-9''), 46.6 (1-CH₃), 43.3 (C-13''), 40.8 (C-20''), 38.6 (C-12''), 36.3 (C-5''), 33.7 (C-1''), 33.3 (C-10''), 33.0 (SO₂N-CH₃), 31.1 (C-4''), 29.0 (C-6''), 27.1 (C-16''), 25.2 (C-2''), 22.4 (C-15''), 20.7 (C-11''), 19.6 (C-21''), 16.1 (3-CH₃), 12.7 (C-19''), 11.9 (C-18'')

IR: ν (cm⁻¹) = 2933, 1709, 1626, 1543, 1504, 1473, 1371, 1333, 1227, 1159, 1122, 1057, 978, 922, 850, 781, 760, 729, 661, 642, 579, 534

MS (ESI): (m/z) (%) = 632 (24, M⁺+1 - HI), 191 (20), 107 (100)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +49.0^\circ$ (MeOH, $c = 0.5$)

6.4 Testsystem: Agar-Diffusionstest

Als Nährmedien dienen ein All-Culture-Agar (AC-Agar) sowie für *Aspergillus niger* ein Potato-Dextrose-Agar (PD-Agar) der Firma Sigma. Es werden jeweils 5 µl einer 1%igen (m/v) Lösung der entsprechenden Substanz in Methanol oder DCM auf einen Rundfilter mit dem Durchmesser 6 mm aufgetragen (50 µg/disc). Anschließend wird das Lösungsmittel unter leichtem Erwärmen verdampft.

Bei der Durchführung werden 35,2 g des AC- bzw. PD-Agars mit 20 g Agar, der zur Verfestigung dient, in einem Liter Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen werden je 20 ml dieser noch heißen Nährlösung in eine Petrischale gefüllt und zur Verfestigung eine Stunde stehen gelassen. Auf das Nährmedium wird der entsprechende Keim mit einem Wattestäbchen gleichmäßig ausgestrichen und anschließend mit je 5 Substanzplättchen belegt. Als Kontrolle dienen die genannten Referenzsubstanzen. Danach wird 48 Stunden in einem Trockenschrank inkubiert. Die Bruttemperatur beträgt für die Bakterien 32,1 °C und für die Pilze 28,0 °C.

6.5 Testsystem: SBI-Screening

Für die Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit einer Testsubstanz werden 10 Ansätze mit unterschiedlicher Wirkstoffkonzentration vorbereitet. Dazu wird eine ethanolische Stammlösung der Testsubstanz hergestellt, sowie daraus eine 1 : 10 Verdünnung und eine 1 : 100 Verdünnung in Ethanol. Die Zugabe der Stamm- bzw. Verdünnungslösungen erfolgt in 40 ml Nährmedium in Kulturflaschen mit Capsenbergkappen-Verschluss. So kann ein Bereich von 0,02 - 4,00 µg/ml Wirkstoff im Medium abgedeckt werden.

Durch die Wirkstoffzugabe und ergänzende Ethanolzugabe ad 80 µl wird in allen Fällen ein Alkoholanteil im Medium von 0,2 Vol.% eingestellt, was von der Hefe noch ohne Wachstumseinbußen toleriert wird.

Gleichzeitig zu der Testreihe werden zwei Kontrollen, welche nur mit 80 μl Ethanol versetzt sind, vorbereitet. Sie werden später zur Bestimmung der EC_{50} herangezogen und dienen außerdem als Sterolmuster-Blindproben.

Im Allgemeinen werden die Inkubationen in Ruhekultur, d.h. stehend im Brutschrank, durchgeführt. Nach 72 Stunden erfolgt die „Ernte“ der gebildeten Biomasse aller Proben. Dabei werden die Hefekuchen durch Vakuumfiltration an gewogenen Membranfiltern vom Medium getrennt und mit Wasser gewaschen. Hefekuchen und Filter werden 2 h im Trockenschrank bei 90 °C getrocknet und danach gewogen.

Der Hefekuchen samt Filter wird nun für das alkalische Aufschlußverfahren vorbereitet. Um eine photochemische Zersetzung von Ergosterol und evtl. anderen in der Probe enthaltenen Sterolen zu verhindern, müssen die Hydrolyse und die anschließende SPE unter weitestgehendem Ausschluß von Tageslicht durchgeführt werden.

Zunächst wird unter Zugabe von verdünnter HCl und des internen Standards Cholesterol 30 min auf dem Sandbad unter Rückfluß erhitzt. In Folge des Einwirkens der verdünnten Säure löst sich der gequollene Hefekuchen vom Membranfilter ab. Dieser kann nun vorsichtig unter Waschen mit dem eigentlichen Hydrolysereagenz (Ethanol / KOH 70 : 30) entfernt werden. Vor der Zugabe der gesamten Menge an Hydrolysereagenz wird der Hefekuchen mit dem Ultra-Turrax zerkleinert. Anschließend wird 1,5 h auf dem Sandbad unter Rückfluß erhitzt.

Nach beendeter Hydrolyse wird sofort zentrifugiert. Eine zu lange Pause zwischen den Aufarbeitungsschritten und eine starke Abkühlung der Probe sind dabei zu vermeiden, weil sich dies negativ auf die Löslichkeit der Sterole auswirkt.

Es schließt sich sofort die Sterolextraktion aus dem Zentrifugat mittels SPE an. Die SPE-Phase (Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer mit lipophilen Eigenschaften; SPE-Kartuschen: Merck® LiChrolut EN 200 mg, 3 ml) wird erst durch Zugabe von Methanol und dann durch Zugabe eines Wasser-Ethanol-Gemisches vorkonditioniert, anschließend erfolgt die Probenaufgabe. Das bis dahin angefallene Eluat wird verworfen und die Sterole werden von der SPE-Phase mit Ethylacetat eluiert.

Durch den „eingebauten“ Filtrationsschritt bei der SPE steht der gewonnene schwebstofffreie Sterolextrakt direkt für die Untersuchungen mit GC-MS, HPLC-DAD oder HPLC-MS zur Verfügung.

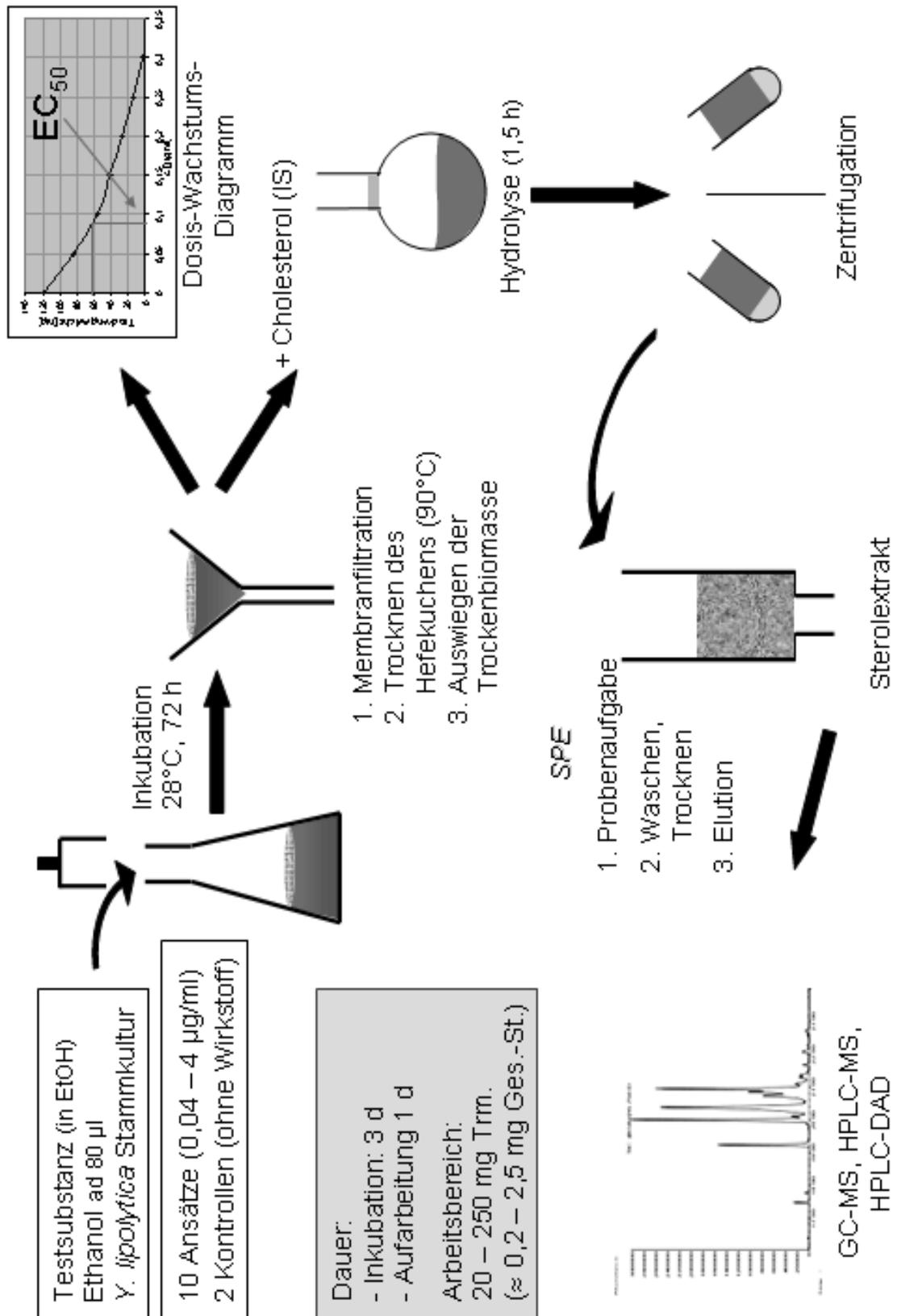


Abb. 34: SBI-Screening

6.5.1 Datenblätter der getesteten Substanzen

Die Tabelle und das Diagramm geben Auskunft über die Dosis-Wachstums-Beziehung und die Konzentrationsspanne, innerhalb der eine Substanz getestet wurde. Zur besseren Orientierung wurden alle Ansätze nummeriert (Y.I. 648, 649, 650.....).

Weiterhin werden der gefundene **Inhibitionstyp** (falls positiv) und die ermittelte **EC₅₀** angegeben.

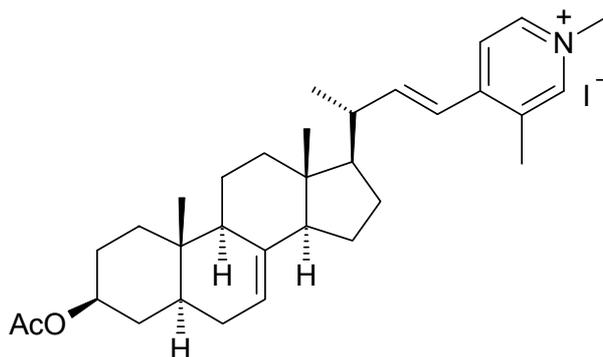
Die EC₅₀-Werte wurden graphisch aus den gezeigten Diagrammen ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit spielen sie eine untergeordnete Rolle, denn die qualitativen Auswirkungen auf das Sterolmuster - und damit der Inhibitionstyp - stehen im Vordergrund der Untersuchungen. Diese können in ihrer Kernaussage auf andere, humanpathogene Hefen übertragen werden. Der EC₅₀-Wert kann selbst bei Variation der Kulturbedingungen verschieden sein und ist damit kein verlässlicher Parameter bei der Übertragung auf einen anderen Pilzstamm. Seine Berechtigung erhält er jedoch, da er die Möglichkeit eines „Rankings“ bei Vergleichen innerhalb einer Substanzklasse zulässt und somit erste Aussagen zu quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen erlaubt.

Der angegebene Inhibitionstyp klassifiziert die Testsubstanzen in folgende Kategorien:

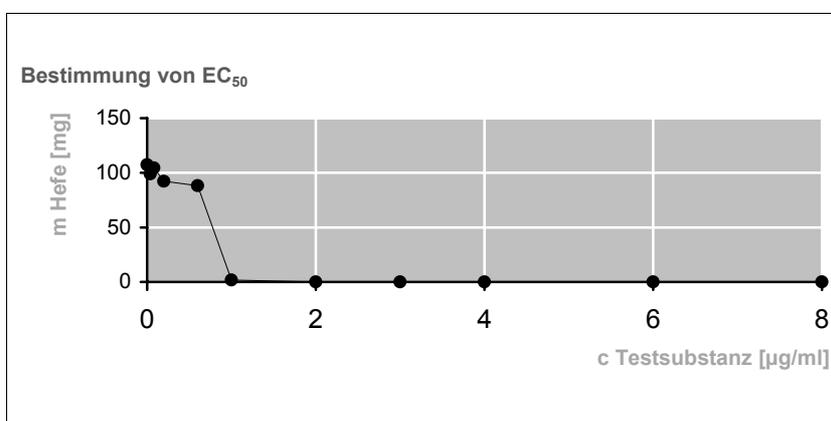
- Squalenepoxidase-Inhibitor
- Sterol-C-14-Demethylase-Inhibitor
- Sterol- Δ^{14} -Reduktase-Inhibitor
- Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitor
- Sterol-C-24-Methyltransferase-Inhibitor
- Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase-Inhibitor
- kein SBI

Das im Anschluß abgebildete Chromatogramm der GC-MS-Analyse zeigt das **Sterolmuster** der Testsubstanz nach Inkubation mit *Yarrowia lipolytica* bei der angegebenen Konzentration. Sofern möglich wurde das Sterolmuster bei einer Wirkstoffkonzentration nahe der EC₅₀ bestimmt.

Da coeluiierende Substanzen im Chromatogramm visuell nicht gut zu unterscheiden sind, gibt die jeweils nebenstehende Tabelle Übersicht über die gefundenen Sterole in der Reihenfolge der Elution unter Angabe der Retentionszeit (t_R).

Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit 13

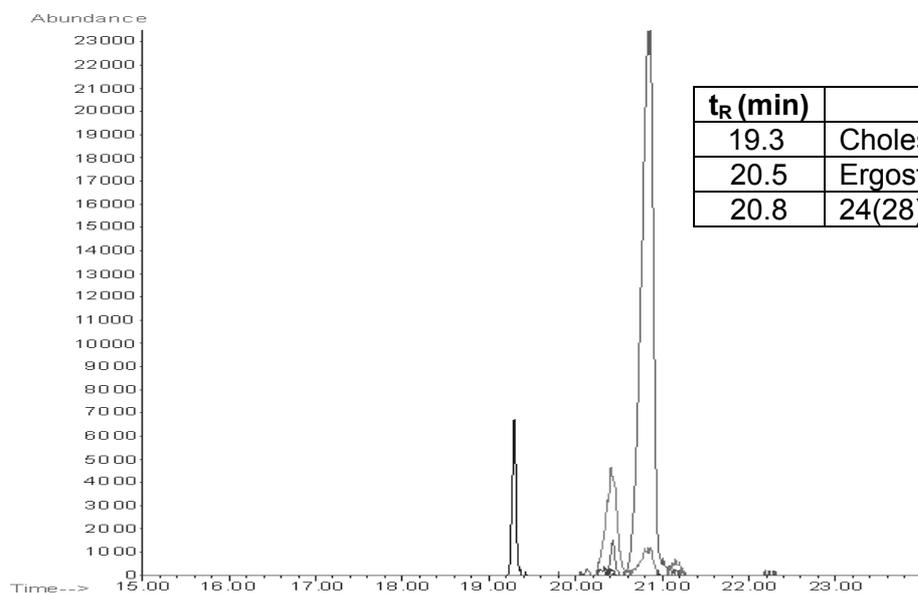
Y.I.	847K	848K	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868
13 [$\mu\text{g/ml}$]	0	0	0.04	0.08	0.2	0.6	1.0	2.0	3.0	4.0	6.0	8.0
Trockengewicht [mg]	99	104	92	88	1.8	0	0	0	0	0	0	0



$\text{EC}_{50} \sim 0.8 \mu\text{g/ml}$

Inhibitionstyp: Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase-Inhibitor

Sterolmuster bei $0.8 \mu\text{g/ml}$:



-
- ⁵⁰ X.D. Zhou, F. Cai, W.S. Zhou, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2537
- ⁵¹ J.S. Yadav, S.V. Mysorekar, *Synth. Commun.* **1989**, 19, 1057
- ⁵² H. Oedinger, F. Möller, K. Eiter, *Synthesis* **1972**, 591
- ⁵³ T. Fukuyama, C.K. Jow, M. Cheung, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6373
- ⁵⁴ B.T. Gillis, P.E. Beck, *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 1947
- ⁵⁵ B.T. Gillis, P.E. Beck, *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 3177
- ⁵⁶ A. van der Gen, J. Lakeman, M.A.M.P. Gras, H.O. Huisman, *Tetrahedron* **1964**, 20, 2521
- ⁵⁷ Dissertation J. Müller, LMU München **2002**

