

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

***Pyridine und hydrierte Derivate
als potentielle Antimykotika***

***Synthese, biologische Prüfung und
Analyse des Inhibitionsverhaltens auf
Enzyme der Ergosterol-Biosynthese***

von

Christian Hantelmann

aus

Wolfenbüttel

2005

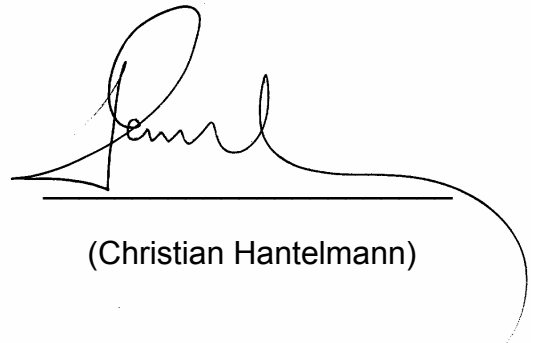
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Franz Bracher betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 10. Februar 2005



(Christian Hantelmann)

Dissertation eingereicht am

10. Februar 2005

1. Gutachter:

Prof. Dr. F. Bracher

2. Gutachter:

Prof. Dr. E. Reimann

Mündliche Prüfung am

14. März 2005

Danksagung

Für die stets großzügige Förderung und Unterstützung dieser Arbeit möchte ich Prof. Dr. F. Bracher herzlich danken.

Prof. Dr. E. Reimann danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Korreferats sowie für die Unterstützung bei theoretischen und praktischen Fragen zur Hochdruckhydrierung.

Ein besonderer Dank gilt E. Armbrust, M. Klimt, C. Neudert und Dr. J. Müller für ihren großen Beitrag am Zustandekommen dieser Arbeit,

meinen Laborkollegen M. Baltrusch, Dr. F. Dombeck, Dr. M. Gans, K. Huber, F. Lirk, Dr. O. Kast, Dr. B. Pohl und Dr. A. Puzik für die schöne gemeinsame Zeit im Labor,

Dr. H.-J. Krauss für seine Hilfsbereitschaft und vielseitige Unterstützung,

Dr. E. Kirchisner, Dr. H. Poschenrieder, A. Ritter sowie allen Kollegen, die an der Betreuung des 8. Semesters beteiligt waren, für die gute Zusammenarbeit,

ferner Dr. H. Lerche und seinem Team für die Anfertigung (und die unverzichtbare Hilfe bei der Interpretation) der NMR- und Massenspektren,

außerdem G. Käser und H. Schulz für die Durchführung der elementaranalytischen Untersuchungen,

nicht zuletzt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für die schöne Zeit und das gute Arbeitsklima.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Frau Katja, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nobody said it was easy...

The Scientist, Coldplay (2002)

Für meine Eltern

und Katja,

die immer an mich geglaubt hat...

1	Einleitung	1
1.1	Die physiologische Bedeutung von Ergosterol	2
1.2	Biosynthese von Ergosterol	4
1.2.1	Der Prä-Squalen-Abschnitt	4
1.2.2	Der Post-Squalen-Abschnitt	6
1.3	Angriffspunkte bekannter Ergosterol-Biosyntheseinhibitoren (SBI)	16
1.3.1	Allylamine	16
1.3.2	Aziridine und Azasqualenoide.....	17
1.3.3	Azole.....	18
1.3.4	Morpholine.....	20
1.3.5	Weitere Inhibitoren der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase und Sterol- Δ^{14} -Reduktase	22
1.3.6	Inhibitoren des Sterol-C-4-Demethylase-Komplexes	22
1.3.7	Inhibitoren der C-24-Methyltransferase (SMT) und Sterol- Δ^{24} -Reduktase	23
1.3.8	Azasteroide und Azasecosteroide als Antimykotika.....	24
1.4	Charakterisierung des Inhibitionsverhaltens anhand der Analytik von freien Sterolen	30
2	Themenstellung	32
3	Präparativ-chemischer Teil.....	37
3.1	6,7-Dihydro-5H-[1]-pyrindine	37
3.1.1	Darstellung von 6,7-Dihydro-5-oxo-5H-[1]-pyrindin.....	37
3.1.2	Darstellung von Seitenkettenanaloge: Die Strategie.....	38
3.1.3	Die <i>Wittig</i> -Reaktion	39
3.1.4	Hydroborierung.....	45
3.1.5	Die <i>Grignard</i> -Reaktion	46
3.1.6	Synthese von 5-Amino-6,7-dihydro-5H-[1]-pyrindin-Derivaten.....	46

3.1.7	Ring A/B-Analoga	49
3.1.8	Umsetzung zu 5-substituierten Octahydro-[1]-pyrindinen	49
3.2	2-Oxo-octahydro-[1]-pyrindine	51
3.2.1	Darstellung des Lactams	52
3.2.2	Die Thionierung	54
3.2.3	Die <i>Eschenmoser</i> -Alkenylierung	55
3.3	4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindine	56
3.3.1	Darstellung des bicyclischen Grundkörpers	56
3.3.2	Schutzgruppen für die Aminfunktion	60
3.3.3	Dynamische NMR-Spektroskopie: Bindungsrotamere der <i>Boc</i> -Schutzgruppe	61
3.3.4	Anbau von Seitenketten: Die Strategie	64
3.3.5	Die <i>Wittig</i> -Reaktion	64
3.3.6	Die <i>Grignard</i> -Reaktion	66
3.3.7	5- <i>N</i> -Alkyl-4a-methyloctahydro-[1]-pyrindine	68
3.3.8	5- <i>O</i> -Alkyl-4a-methyloctahydro-[1]-pyrindine	70
3.3.9	Ring-A-Analoga / Azasecosteroide	74
3.4	4a-Methyl-2,5-dioxo-octahydro-[1]-pyrindine	76
3.4.1	Darstellung des Lactams 53	77
3.4.2	Darstellung von Seitenketten: Die Strategie	79
3.4.3	Versuche einer C-C-Verknüpfung	80
3.4.4	5- <i>N</i> -Alkyl-4a-methyl-2-oxo-octahydro-[1]-pyrindine	81
3.4.5	5- <i>O</i> -Alkylierte-4a-methyl-2-oxo-octahydro-[1]-pyrindine	82
3.4.6	Ring-A-Analoga / Azasecosteroide	83
4	Analytischer Teil	87
4.1	Das Testsystem	87
4.2	Mikrobiologischer Teil	87

4.2.1	Der Testkeim	87
4.2.2	Die Inkubation.....	88
4.3	Analytischer Teil.....	90
4.3.1	Probenvorbereitung	90
4.3.2	Gaschromatographische Analytik des Sterolextraktes.....	91
4.4	Testergebnisse	92
4.4.1	Sterolmuster und Wachstum der Blindprobe	92
4.4.2	Getestete Substanzen aus der Arbeitsgruppe	93
4.4.3	Arzneistoffe.....	113
4.4.4	Isopimarane	115
4.4.5	Anellierte Tetrahydroisochinoline und Derivate.....	116
4.5	Agar-Diffusionstest eigener Substanzen.....	120
4.5.1	Testergebnisse	120
4.5.2	Zusammenfassung der Testergebnisse.....	123
5	Zusammenfassung und Ausblick	124
5.1	Zusammenfassung des präparativ-chemischen Teils.....	124
5.2	Zusammenfassung des Analytischen Teils	128
5.2.1	Nachbetrachtung der Testergebnisse der eigenen Substanzen	128
5.2.2	Inhibitoren der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase	129
5.2.3	Inhibitoren der C-24-Methyltransferase	129
5.2.4	Inhibitoren der Squalenepoxidcylase / Sterol-C-4-Demethylase.....	129
5.2.5	Inhibitoren der Lanosterol-14 α -demethylase	130
5.3	Ausblick.....	131

6	Experimenteller Teil	132
6.1	Geräte und Parameter	132
6.1.1	Geräte des Testsystems auf Sterolbiosynthese-Inhibitoren.....	132
6.1.2	Geräte für den präparativ-chemischen Teil.....	133
6.2	Synthesen	135
6.2.1	6,7-Dihydro-5-oxo-5 <i>H</i> -[1]-pyrindin (11)	136
6.2.2	(<i>E</i>)-5-Ethyliden-6,7-dihydro-5 <i>H</i> -[1]-pyrindin (12).....	138
6.2.3	4-Methyl-1,3,4,9-tetrahydro-2-oxa-8-aza-fluoren (13).....	140
6.2.4	5-(<i>N</i> -Pentylamino)-6,7-dihydro-5 <i>H</i> -[1]-pyrindin (14).....	142
6.2.5	5-(<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -pentylamino)-6,7-dihydro-5 <i>H</i> -[1]-pyrindin (15)	144
6.2.6	5-(<i>N</i> -2-Phenylethylamino)-6,7-dihydro-5 <i>H</i> -[1]-pyrindin (16).....	146
6.2.7	5-[<i>N</i> -2-(4-Methoxyphenyl)-ethylamino]-6,7-dihydro-5 <i>H</i> - [1]-pyrindin (17)	148
6.2.8	<i>N</i> -(2-Phenylethyl)-6,7-dihydro-5 <i>H</i> -[1]-pyrindiniumperchlorat (18)	150
6.2.9	5-Oxo-1,2,3,4,6,7-hexahydro-5 <i>H</i> -[1]-pyrindin (19).....	152
6.2.10	5-(<i>N</i> -Pentylamino)-octahydro-[1]-pyrindin (20).....	154
6.2.11	5- <i>N</i> -2-Phenylethylamino)-octahydro-[1]-pyrindin (21)	156
6.2.12	2-Oxo-1,2,3,4,6,7-hexahydro-5 <i>H</i> -[1]-pyrindin (22).....	158
6.2.13	2-Oxo-octahydro-[1]-pyrindin (23).....	160
6.2.14	2-Thiono-octahydro-[1]-pyrindin (24)	162
6.2.15	(4,4a,5,6,7,7a-Hexahydro-3 <i>H</i> -[1]-pyrindin-2-ylsulfanyl)- essigsäuremethylester (25)	164
6.2.16	(Octahydro-[1]-pyrindin-2-yliden)-essigsäuremethylester (26).....	166
6.2.17	(Octahydro-[1]-pyrindin-2-yl)-essigsäuremethylester (27).....	168
6.2.18	2-Methyl-2-(2-cyanoethyl)-cyclopentan-1,3-dion (28)	170
6.2.19	4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (29).....	172
6.2.20	<i>N</i> -(<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (30)..	174
6.2.21	Hexyltriphenylphosphoniumbromid (31)	176

6.2.22	<i>N</i> -(<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)-5-hydroxy-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (35)	177
6.2.23	5-(Pentylimino)-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (36).....	179
6.2.24	5-(<i>N</i> -Pentylamino)-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (37).....	181
6.2.25	5-(2-Phenylethylimino)-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (38).....	183
6.2.26	5-(<i>N</i> -2-Phenylethylamino)-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (39).....	185
6.2.27	<i>N</i> -(<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-(<i>N</i> -pentylamino)-octahydro-[1]-pyrindin (40)	187
6.2.28	5-Hydroxy-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (41)	189
6.2.29	<i>N</i> -(<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-pentyloxy-octahydro-[1]-pyrindin (42)	191
6.2.30	4a-Methyl-5-pentyloxy-octahydro-[1]-pyrindin (43)	193
6.2.31	<i>N</i> -(<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-pentanoyloxy-octahydro-[1]-pyrindin (44)	195
6.2.32	4a-Methyl-5-pentanoyloxy-octahydro-[1]-pyrindin (45)	197
6.2.33	4a-Methyl-5-oxo-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (46).....	199
6.2.34	1-[2-(3-Methoxyphenyl)-acetyl]-4a-methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (47)	201
6.2.35	5-Hydroxy-4a-methyl-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (48)	203
6.2.36	4a-Methyl-5- <i>N</i> -pentylamino-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (49)	205
6.2.37	4a-Methyl-1-(2-phenylethyl)-5-(<i>N</i> -2-phenylethylamino)-octahydro-[1]-pyrindin (50)	207
6.2.38	4a-Methyl-5-pentyloxy-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (51) ...	209
6.2.39	4a-Methyl-5-pentanoyloxy-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (52)	211
6.2.40	2,5-Dioxo-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (53)	213
6.2.41	2-Methyl-2-(2-carbamoylethyl)-cyclopentan-1,3-dion (54)	215
6.2.42	2,5-Dioxo-4a-methyl-1,3,4,4a,5,7a-hexahydro-2 <i>H</i> -[1]-pyrindin (55).....	217
6.2.43	4a-Methyl-2-oxo-5-pentylimino-octahydro-[1]-pyrindin (56)	219
6.2.44	4a-Methyl-2-oxo-5-pentylamino-octahydro-[1]-pyrindin (57)	221
6.2.45	5-Hydroxy-4a-methyl-2-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (58)	223
6.2.46	3-(1-Methyl-2,5-dioxo-cyclopentyl)-propionsäure (59)	225

6.2.47	2,5-Dioxo-1-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-4a-methyl-1,2,4,4a,5,6-hexahydro-3H-[1]-pyridin (60)	227
6.2.48	5-Hydroxy-1-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-4a-methyl-2-oxo-1,2,4,4a,5,6-hexahydro-3H-[1]-pyridin (61)	229
6.2.49	1,1',2,2',4,4',4a,4a',5,5',6,6'-Hexyhydro-2,2',5,5'-tetraoxo-[3H,3'H]-[6,6']bi-[1]-pyridinyliden (64)	231
6.3	Testung auf SBI-Aktivität	233
6.3.1	SOP – Kultivierung des Testorganismus <i>Yarrowia lipolytica</i> in Stammkultur	234
6.3.2	SOP – Kultivierung von <i>Yarrowia lipolytica</i> unter Zusatz von Testsubstanzen	235
6.3.3	SOP – Gewinnung der Trockenbiomasse aus der Flüssigkultur und Bestimmung von EC_{50}	237
6.3.4	SOP – Aufarbeitung der Trockenbiomasse zum Hefehydrolysat	238
6.3.5	SOP – Extraktion der Sterolfraction aus Hefehydrolysat	239
6.4	Datenblätter der Testsubstanzen	241
6.4.1	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit AM 684	243
6.4.2	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit AM 686	245
6.4.3	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit AM 693	246
6.4.4	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit AM 694	247
6.4.5	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit APU-131	248
6.4.6	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit APU-133	249
6.4.7	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Ciclopiroxolamin	250
6.4.8	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Clonidin	251
6.4.9	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit DR-97	252
6.4.10	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit DR-113	253
6.4.11	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit DR-114	254
6.4.12	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit DR-116	255
6.4.13	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit DR-132	256
6.4.14	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit DR-133	257
6.4.15	Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit DR-137	258

6.4.16 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit EK-12	259
6.4.17 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit EK-13	260
6.4.18 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit EK-14E	261
6.4.19 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit EK-49	262
6.4.20 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit EK-53	263
6.4.21 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit EK-62	264
6.4.22 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit EK-65	265
6.4.23 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit FD-8	266
6.4.24 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit FD-36	267
6.4.25 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit FD-52	268
6.4.26 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit FD-68	269
6.4.27 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit FD-69	270
6.4.28 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit FD-72	271
6.4.29 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit FD-74	272
6.4.30 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit FD-78	273
6.4.31 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit FD-103	274
6.4.32 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit FD-109	275
6.4.33 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GEP 159	276
6.4.34 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GEP 330	277
6.4.35 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GEP 425	278
6.4.36 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GEP 469	279
6.4.37 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GEP 489	280
6.4.38 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GEP 500	281
6.4.39 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GEP 501	282
6.4.40 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GES 12	283
6.4.41 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GES 16	284
6.4.42 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GET 19	285
6.4.43 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GET 123	286
6.4.44 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GET 182	287
6.4.45 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit GET 220	288

6.4.46 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit JCB-35	289
6.4.47 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit JCB-37	290
6.4.48 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit (-)-Ketoconazol	291
6.4.49 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit (+)-Ketoconazol.....	292
6.4.50 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-18.....	293
6.4.51 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-18H	294
6.4.52 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-22.....	295
6.4.53 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-22H	296
6.4.54 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG 34	297
6.4.55 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-34H	298
6.4.56 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG 35	299
6.4.57 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-35H	300
6.4.58 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-35-1	301
6.4.59 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-47.....	302
6.4.60 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit MG-47-2.....	303
6.4.61 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit Naphazolin.....	304
6.4.62 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-51.....	305
6.4.63 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-57.....	306
6.4.64 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-61.....	307
6.4.65 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-68.....	308
6.4.66 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-69.....	309
6.4.67 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-70.....	310
6.4.68 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-72.....	311
6.4.69 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-73.....	312
6.4.70 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-76.....	313
6.4.71 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-77.....	314
6.4.72 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-79.....	315
6.4.73 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-80.....	316
6.4.74 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-81	317
6.4.75 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-82.....	318

6.4.76 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit NS-87.....	319
6.4.77 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit OK-45.....	320
6.4.78 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit OK-47.....	321
6.4.79 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 1-4	322
6.4.80 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 1-5	323
6.4.81 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 1-8	324
6.4.82 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 2-1	325
6.4.83 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 2-3	326
6.4.84 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 3-2	327
6.4.85 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 3-3	328
6.4.86 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 4-2	329
6.4.87 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 5-1	330
6.4.88 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 5-2	331
6.4.89 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL 5-3	332
6.4.90 Inkubation von <i>Yarrowia lipolytica</i> mit SL N4.....	333
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	334
LITERATURVERZEICHNIS	336

1 Einleitung

Pilze sind in der Umwelt weit verbreitete eukaryontische Mikroorganismen. Sie sind weniger differenziert als Pflanzen, zeigen aber einen höheren Grad der Organisation auf als die prokaryontischen Bakterien. Unter den nahezu 1 Million Pilzarten sind weniger als 300 als Krankheitserreger des Menschen bekannt. Viele sind Opportunisten. Diese stellen keine Gefahr für das gesunde menschliche Immunsystem dar, können jedoch bei einer Abwehrschwäche gesundheitlich problematisch werden. Die Ursache der Zunahme von Pilzinfektionen begründet sich daher auch mit der stetig steigenden Zahl von Patienten mit Immunschwächen. Zu ihnen zählen insbesondere HIV-positive Personen, Senioren sowie Menschen, deren Immunsystem aufgrund einer Organtransplantation künstlich unterdrückt werden muß. Aber auch Patienten, deren physiologische Bakterienflora aufgrund einer antibakteriellen Chemotherapie geschädigt ist, sind für Mykosen anfällig.

Neben Pilzallergien und den Mykotoxikosen sind Infektionen bei weitem die häufigsten Pilzkrankungen. Diese so genannten Mykosen werden eingeteilt in

- primäre Systemmykosen
- opportunistische Systemmykosen
- subkutane Mykosen
- kutane Mykosen.

Während die oberflächlichen Pilzkrankungen auch bei Nicht-Risikopatienten vorkommen, sind sie jedoch im Allgemeinen mehr unangenehm als gefährlich. Darüber hinaus sind zu ihrer Behandlung zahlreiche Therapiemöglichkeiten verfügbar. Im Gegensatz dazu sind lokalisierte und generalisierte Pilzkrankungen häufig tödlich. Sie treten beispielsweise im Gastrointestinaltrakt, im genitourinären System bzw. in den Atemwegen auf („lokalisiert“) bzw. betreffen auch innere Organe oder das Nervensystem („generalisiert“).

Die Taxonomie der Pilze beruht im Wesentlichen auf morphologischen Merkmalen. Diese Einteilung erweist sich für den medizinischen Alltag jedoch als wenig praktikabel. Hier greift man eher auf die praktikable, aber naturwissenschaftlich inkorrekte Einteilung in das DHS-System zurück. Demnach unterteilt man Pilze in Dermatophyten, Hefen (z. B. *Candida* und *Cryptococcus*), Schimmelpilze (z.B. *Aspergillus*).

Wie eingangs bereits erwähnt handelt es sich bei Pilzen um Eukaryonten. Sie besitzen also einen von einer Zellmembran umgebenen Kern, Mitochondrien und ein endoplasmatisches Retikulum. Diese Ähnlichkeit zur menschlichen Zelle erschwert die Entwicklung selektiver und nebenwirkungsarmer Antimykotika. Dieses betrifft neben Wirkstoffen zur Anwendung als Humanarzneimittel auch Fungizide in der Landwirtschaft, da diese aufgrund ihrer häufig schweren biologischen Abbaubarkeit über die behandelten Nahrungsmittel aufgenommen werden können.

1.1 Die physiologische Bedeutung von Ergosterol

Hauptangriffspunkt der meisten Antimykotika ist die Zellmembran, die im Unterschied zur menschlichen Zelle Ergosterol anstatt von Cholesterol enthält. Die Arbeitsgruppen um *Nes*, *Bloch* und *Parks* haben übereinstimmend herausgefunden, daß Ergosterol zumindest zwei Hauptfunktionen in der Zellmembran innehat:

Ergosterol erfüllt 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 Ergosterol für die nötige Festigkeit und Struktur, um eine optimale Funktion der zahlreichen membranständigen Enzyme und der Membranpermeabilität zu gewährleisten. Bei normalen Wachstumsbedingungen wurde für die Plasmamembran ein Ergosterol-Phospholipid-Verhältnis von 3,3 (mol/mol) bei *S. cerevisiae* ermittelt.¹ Zur Erfüllung dieser strukturellen Funktion werden offensichtlich große Mengen an Sterol benötigt, daher spricht man auch von einer „*bulk*“-Funktion des Ergosterols.

Die Pilzzelle verfügt im Gegensatz zur Säugerzelle über einen Chitinpanzer unterhalb der Plasmamembran. Für das Wachstum muß diese stabile Chitinschale aufgebrochen und wieder neu geschlossen werden. Dafür ist ein membranständiges Enzym der Pilzzelle, die Chitinsynthetase zuständig. Ihre Funktion ist unverzichtbar für Zellwachstum und -teilung.² Sie weist in Abhängigkeit von der Festigkeit der Membran eine unterschiedliche Struktur und Aktivität auf. Ihre Arbeitsfähigkeit ist damit indirekt abhängig von der Struktur und der Menge der in die Membran eingelagerten Sterole.

Zahlreiche Untersuchungen, ob Ergosterol in dieser so genannten „*bulk*“-Funktion ersetzbar ist, zeigten, daß diese benötigte große Menge mit einer verhältnismäßig großen Strukturtoleranz einhergeht.^{3,4,5} Beinahe jedes Sterol ist in der Lage, die

„*bulk*“-Funktion zu erfüllen, wenn seine Struktur den nachfolgenden Bedingungen entspricht. Demnach ist die 3 β -OH-Gruppe essentiell, die Länge der Alkylkette an C-20 soll nicht über 6 C-Atome betragen und die Stereochemie an C-20 muß *R* sein. Verzweigungen an C-20, C-24 oder C-25 sind fakultativ, ebenso wie eine Methylgruppe an C-14. Auch Doppelbindungen im Molekül müssen nicht zwingend vorhanden sein. Obligatorisch wiederum ist das Fehlen der geminalen Methylgruppen an C-4. Somit sind sterolartige Triterpenoide wie z.B. Cycloartenol oder Lanosterol nicht in der Lage als „*bulk*“-Sterole zu fungieren. Die Einlagerung solcher Sterole in den Bilayer stört die Funktion membranständiger Enzyme, wie z.B. der Chitinsynthetase, erheblich, was sich in einem Ausbleiben von Wachstum zeigt. Das alle genannten Mindestanforderungen erfüllende Cholestanol ist als „*bulk*“-Sterol geeignet. Wichtig jedoch ist, daß in vielen Experimenten gefunden wurde, daß Spuren (10 ng/ml) 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, welche große Mengen an Sterol benötigt, aber eine relativ geringe Strukturspezifität aufweist, 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*“-Funktion³, „*synergistic*“-Funktion⁶ oder „*sparing*“-Funktion⁷ bezeichnet. Über die genauen Aufgaben des Ergosterols im Wachstumsprozeß des Pilzes ist noch nicht viel bekannt, allerdings sind einige Vorschläge gemacht worden⁸, 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 strukturellen Anforderungen wurden von *Parks et al.* an einer *S. cerevisiae*-Mutante erforscht.³ Dabei fand man heraus, daß eine Doppelbindung an C-5,6 (Δ^5) die Grundvoraussetzung für „*sparkling*“-Sterole ist, während die - verzichtbaren - Funktionalisierungen in der Reihenfolge $\Delta^{22} > \Delta^5 > \text{C-24-Methylierung}$ nur die Wartezeit bis zur „Zündung“ des Wachstums verkürzen konnten.

Zusammenfassend kann man also hervorheben, daß Ergosterol (zumindest in kleinen Mengen) für das Pilzwachstum essentiell ist. Eingriffe in die Ergosterol-Biosynthese eröffnen also einen guten Ansatz für die Entwicklung von Antimykotika.

1.2 Biosynthese von Ergosterol

1.2.1 Der Prä-Squalen-Abschnitt

Die Synthese von Cholesterol bei Säugetieren und Ergosterol bei Pilzen verläuft in den ersten Schritten identisch. Ausgangssubstanz ist das Acetyl-Coenzym A, das in zwei Schritten zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) kondensiert und anschließend zu Mevalonat reduziert wird. Aus Mevalonsäure entsteht in zwei weiteren Schritten Isopentenylpyrophosphat (IPP), welches mit Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) in einem enzymatisch katalysierten Gleichgewicht steht (Abb. 1).

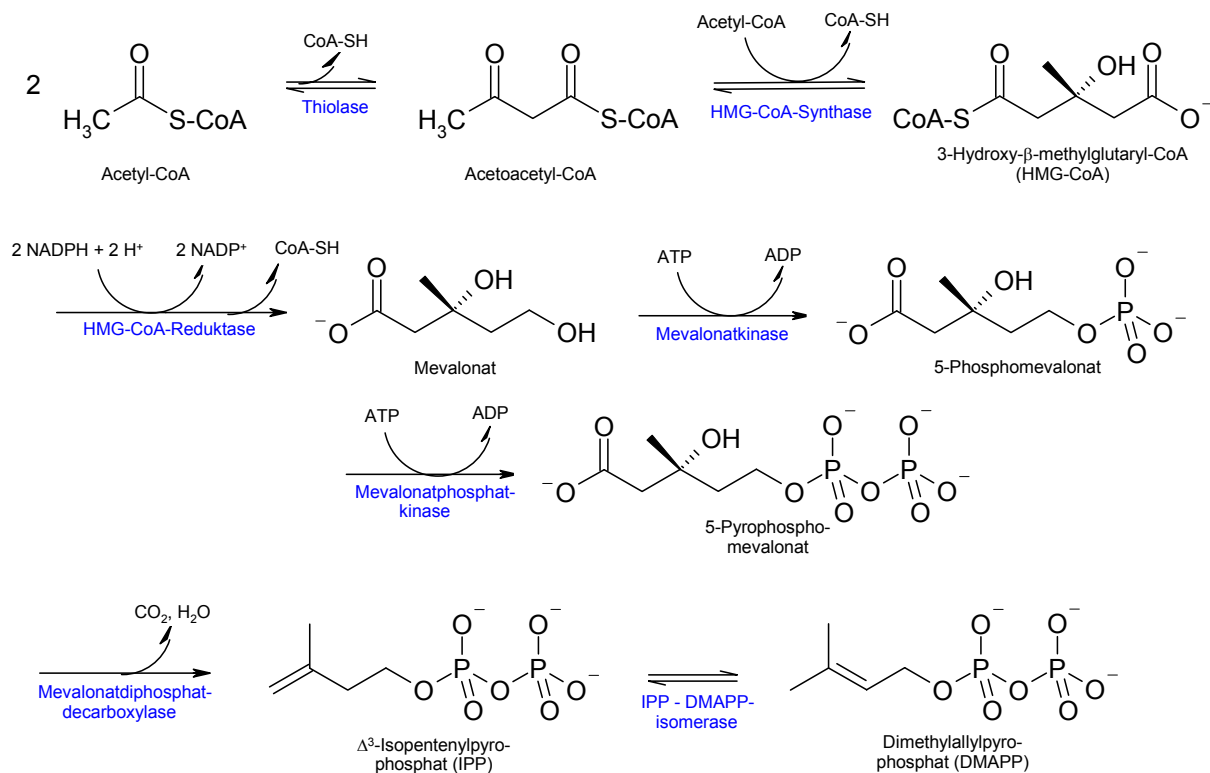


Abb. 1: Biosynthese von Isopentenylpyrophosphat

Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat reagieren anschließend unter Verlust einer Pyrophosphatgruppe in einer Kopf-Schwanz-Reaktion zu einem Monoterpen, dem Geranylpyrophosphat (GPP). In einer weiteren Kopf-Schwanz-

Reaktion wird mit einem weiteren Molekül IPP das Sesquiterpen Farnesylpyrophosphat (FPP) gebildet. Zwei dieser Moleküle werden nun unter Verlust ihrer Pyrophosphatgruppen zu Squalen, einem C₃₀-Körper, umgesetzt (Abb. 2).

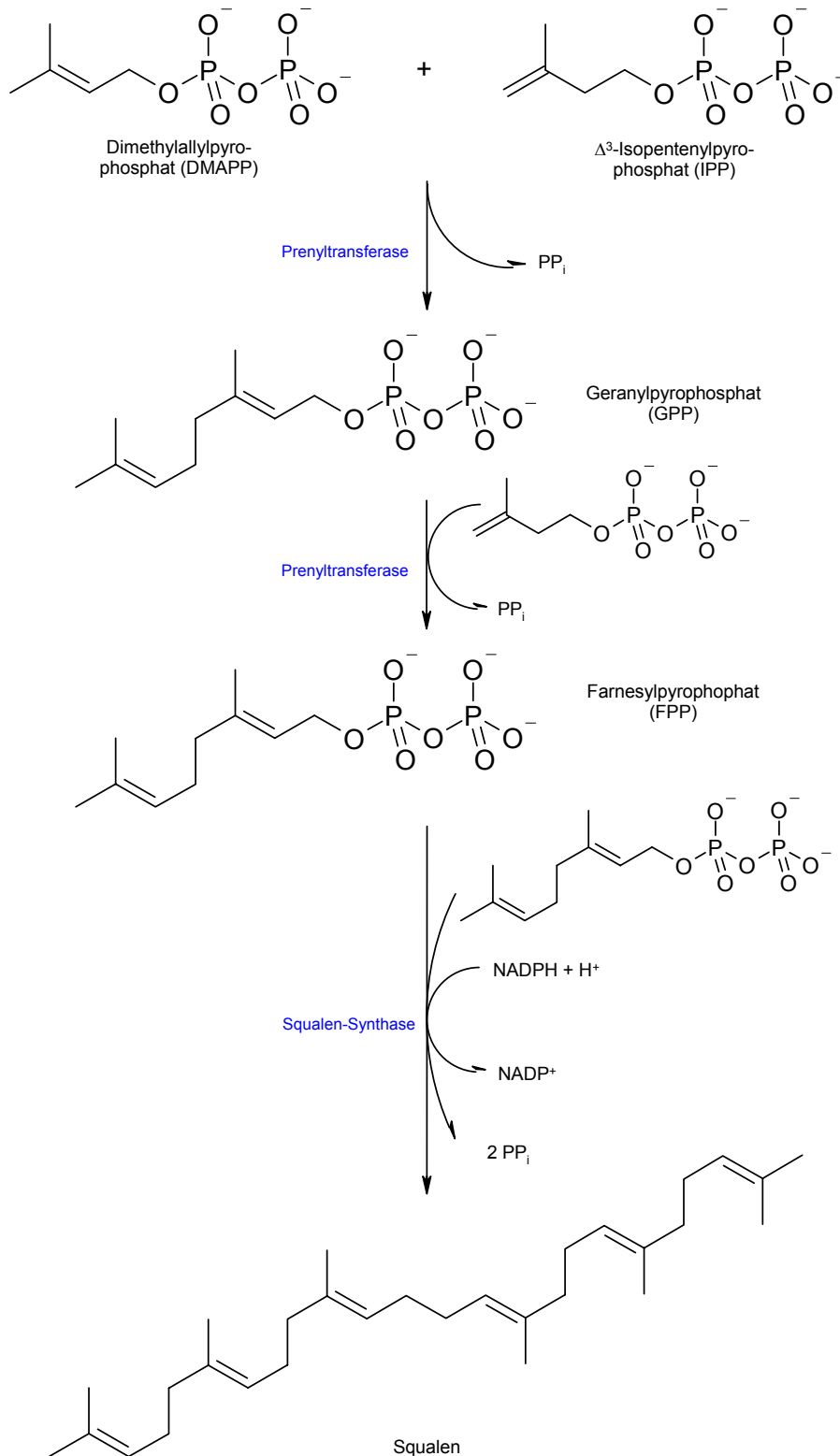


Abb. 2: Biosynthese von Squalen

1.2.2 Der Post-Squalen-Abschnitt

Der Post-Squalen-Abschnitt beginnt mit der Epoxidierung des Squalens (1) zum entsprechenden 2,3-Epoxid. Dieses ist das Substrat für die Squalenepoxidcyclase, welche schließlich Lanosterol (2), das erste Sterol der Biosynthese von Ergosterol, produziert. Es folgt eine Reihe von Demethylierungen, Reduktionen und Isomerisierungen, bis schließlich Ergosterol gebildet wird.

Ergosterol ist nachfolgend entsprechend des Nummerierungsvorschlages der IUPAC, sowie der üblichen Benennung der Ringe gezeigt:

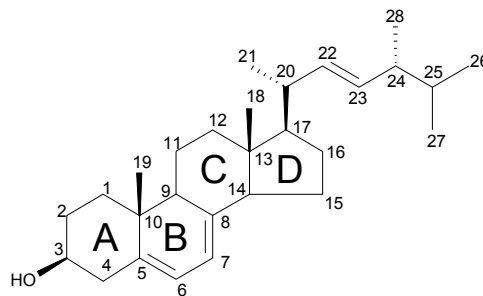


Abb. 3: Nummerierung von Ergosterol

Abb. 4 zeigt die Ergosterol-Biosynthese im Post-Squalen-Abschnitt am Beispiel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. In der anschließenden Übersicht (Tabelle 1) finden sich die einzelnen Reaktionsschritte nebst beteiligten Enzymsystemen.

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.

1.2.2.1 Squalenepoxidase

Squalen (1) kann unter dem Einfluß von Enzymen in eine bestimmte Anordnung gezwungen werden. Erster Schritt ist dabei die durch das Enzym Squalenepoxidase katalysierte Bildung von 2,3-Squalenepoxid (a). Die eigentliche Sterolbiosynthese beginnt so mit einer Vorstufe, in der vier Ringe in der Sessel-Wanne-Sessel-Wanne-Konformation vorfixiert sind (Abb. 5).

Die Squalenepoxidase katalysiert die stereospezifische Epoxidierung der Δ^2 -Doppelbindung von *all trans*-Squalen (**1**) zu *all-trans*-(3S)-2,3-Squalenepoxid. Sie ist eine zellwandgebundene FAD-abhängige Monooxygenase und benötigt daher Sauerstoff. Sie ist vergesellschaftet mit einer Reduktase, deren Aufgabe es ist, Reduktionsäquivalente auf die Epoxidase zu übertragen.

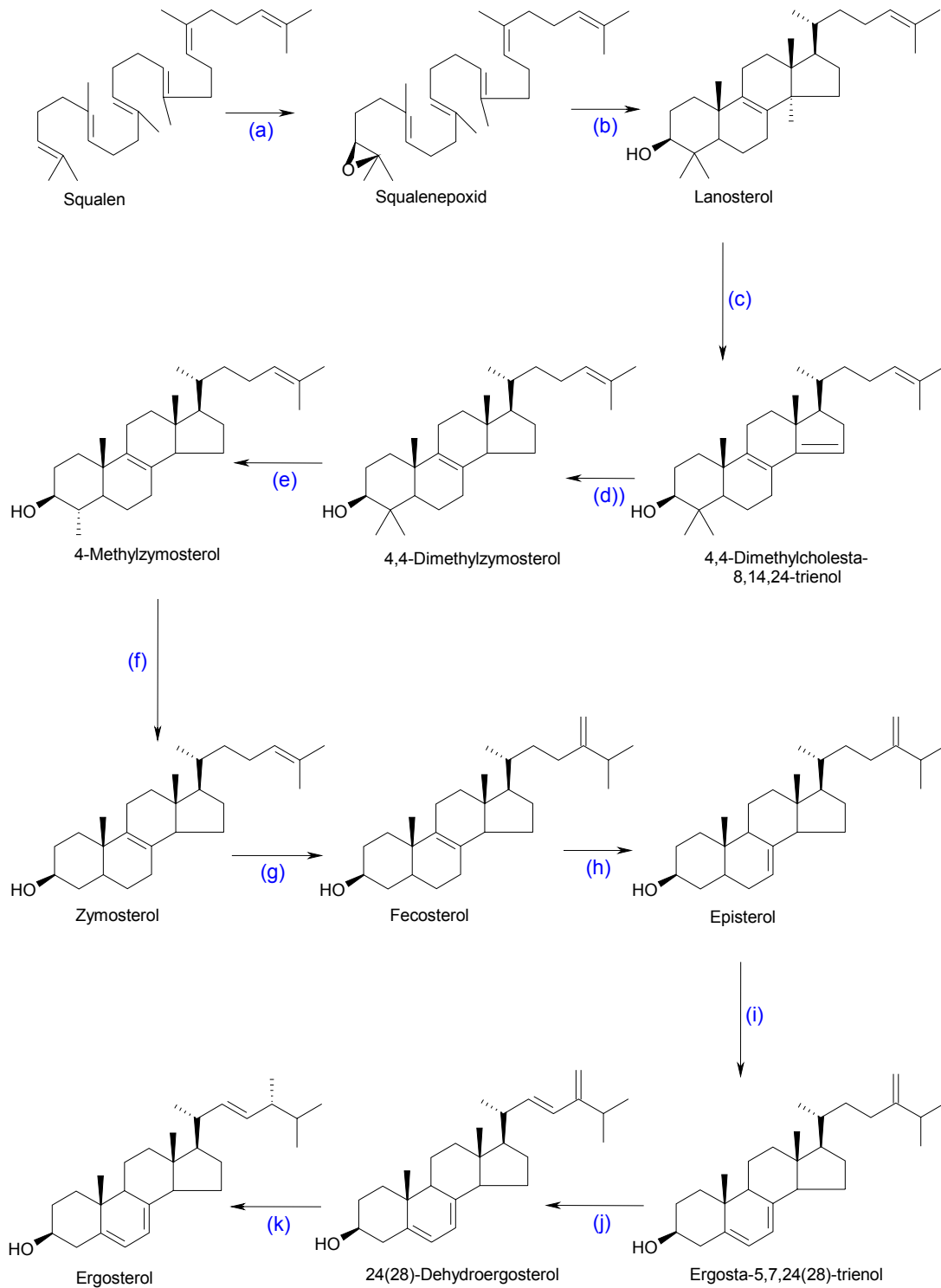


Abb. 4: Ergosterol-Biosynthese bei *Saccharomyces cerevisiae*

	Reaktionsschritt	Enzym(-system)
(a)	Oxidation von Squalen zu 2,3-Squalenepoxid	Squalenepoxidase
(b)	Cyclisierung von Squalenepoxid zu Lanosterol	Squalenepoxidcyclase
(c)	Demethylierung an C-14 von Lanosterol	CytochromP ₄₅₀ -Sterol-C-14-Demethylase
(d)	Reduktion der Δ^{14} -Doppelbindung zu Dimethylzymosterol	Sterol- Δ^{14} -Reduktase
(e)	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
(f)	Abspaltung der 4 α -Methylgruppe zu Zymosterol	Sterol-C-4-Demethylase-Komplex
		→ Sterol-C-4-Methyl-Mono-oxygenase
		→ Sterol-C-4-Decarboxylase
(g)	Methylierung an C-24 zu Fecosterol	Sterol-C-24-Methyltransferase (SMT)
(h)	Isomerisierung der Δ^8 -Doppelbindung zu Episterol (Δ^7)	Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase
(i)	Einführung der Δ^5 -Doppelbindung zu Ergosta-5,7,24(28)-trienol	„Sterol-C-5-Desaturase“
		→ Sterol-C-6(5)-Hydroxylase
(j)	Einführung der Δ^{22} -Doppelbindung zu 24(28)-Dehydroergosterol	→ 6(5) α -Hydroxysterol-Dehydratase
		CytochromP ₄₅₀ -Sterol-C-22-Desaturase
(k)	Reduktion der $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung zu Ergosterol	Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

Tabelle 1: Übersicht über die an der Ergosterol-Biosynthese beteiligten Enzyme

Unter strikt anaeroben Bedingungen ist keine Epoxidierung des Squalens möglich und der weitere Biosyntheseweg ist unterbrochen. Es kann kein Ergosterol gebildet werden, somit kommt es zur Fungistase. Gleichzeitig wirkt die Akkumulation von

Squalen zusätzlich fungizid. Unter diesen Bedingungen wird *S. cerevisiae* in Kultur sterolauxotroph und nimmt Ergosterol oder dessen Precursoren aus dem Medium auf, während es unter aeroben Bedingungen strikt autotroph ist, also seine Sterole selbst synthetisiert, selbst wenn Ergosterol im Medium enthalten ist.

1.2.2.2 Squalenepoxidcyclase

Die Squalenepoxidcyclase katalysiert die Umwandlung von 2,3-Squalenepoxid in einer Kettenreaktion zu Lanosterol (2), der gemeinsamen ersten cyclischen Sterol-Vorstufe sowohl von Tieren als auch Pilzen, während im Pflanzenreich letztendlich Cycloartenol, der Precursor von Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol entsteht. Ab hier gabelt sich der Sterolbiosyntheseweg zwischen photosynthesefähigen und nicht-photosynthesefähigen Organismen.

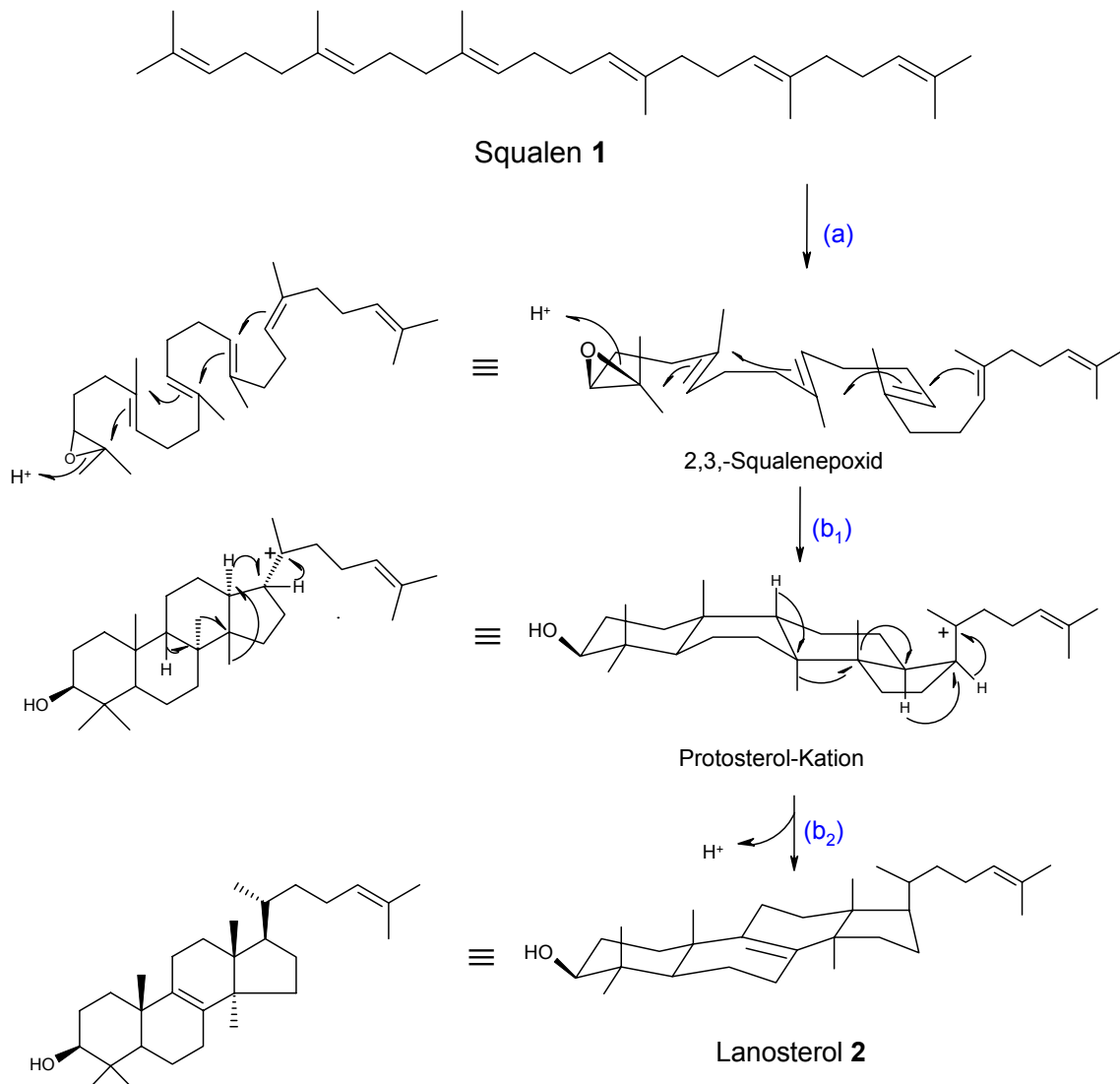


Abb. 5: Squalenepoxidierung und Cyclisierung zum Lanosterol

Die angesprochene Kettenreaktion verläuft in mehreren durch Protonen initiierten Cyclisierungen (b_1). Das entstehende C-20 Protosterolkation durchläuft anschließend fünf *1,2-trans* Wagner-Meerwein-Umlagerungen, gefolgt von einer Stabilisierung durch Protonenabgabe (b_2). Das gebildete Lanosterol (**2**) ist das letzte gemeinsame Sterol von Pilzen, Hefen und Säugetieren (Abb. 5).

1.2.2.3 Cytochrom P_{450} -Sterol-C-14-Demethylase

Die C-14-Demethylierung von Lanosterol (**2**) läuft in vier Schritten ab, wovon die ersten drei Sauerstoff und NADPH benötigen. Im Einzelnen sind dies: (c_1) Oxidation der C-14 α -Methylgruppe zur Hydroxymethyl-Gruppe, (c_2) Weiteroxidation zur Formyl-Gruppe, (c_3) Weiteroxidation unter *Baeyer-Villiger*-artiger Umlagerung zur Formyloxy-Gruppe und (c_4) Eliminierung der Formyloxy-Gruppe und des benachbarten 15 α -Protons in Form von Ameisensäure. Es entsteht 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol (**3**; Abb. 6).

Es ist bekannt, daß ein Cytochrom P-450-System, welches als CYP51A1 identifiziert wurde, in *S. cerevisiae* alle vier Schritte katalysiert. Das Enzym ist membranständig und wird häufig als Cyt. P-450_{14DM} abgekürzt. Da das Substrat nur bei Hefen Lanosterol ist, während es bei filamentösen Pilzen 24-Methylen-24,25-dihydro-lanosterol ist, differenziert man noch genauer: Cytochrom P-450_{Lano14DM} bzw. Cytochrom P-450_{MeLano14DM}.

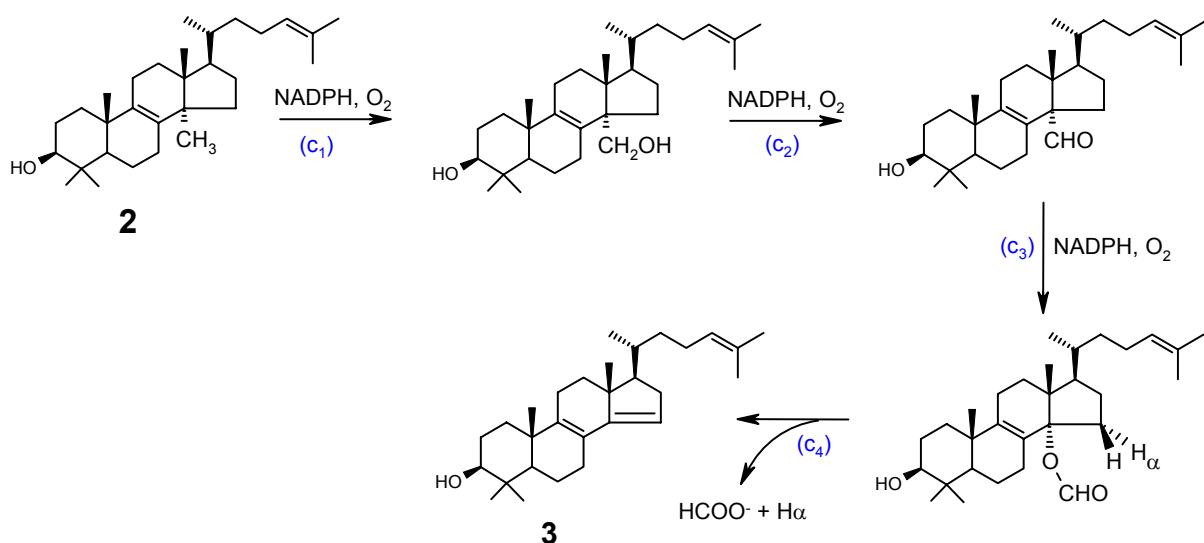


Abb. 6: Mechanismus der C-14-Demethylierung von Lanosterol

1.2.2.4 Sterol- Δ^{14} -Reduktase

Diese membranständige Oxidoreduktase katalysiert die Reduktion der von der Cyt. P450_{Lano14DM} eingeführten Doppelbindung. In Hefen ist das bevorzugte Substrat 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol (**3**). Als Reduktionsmittel dient NADPH. Nach enzymvermittelter Protonenübertragung aus dem Wasser des Mediums an C-15 wird ein Hydridäquivalent auf das intermediär auftretende kationische *High Energy Intermediate* (HEI) übertragen.

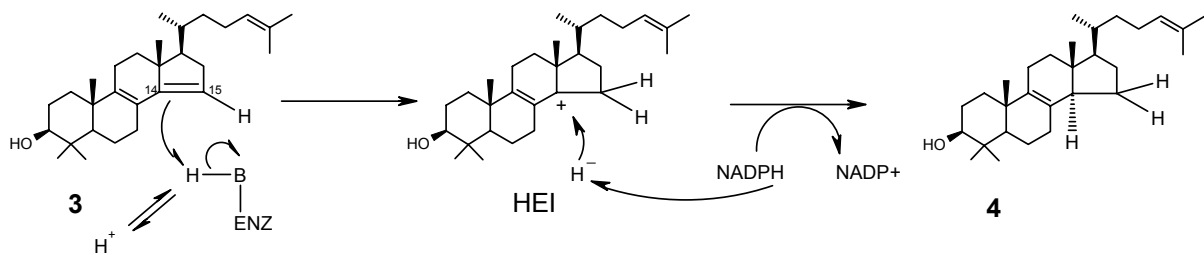


Abb. 7: Mechanismus der Reduktion durch die Sterol- Δ^{14} -Reduktase

1.2.2.5 Sterol-C-4-Demethylase-Komplex

Die Demethylierung von 4,4-Dimethylzymosterol (**4**) wird von einem microsomalen Enzymkomplex katalysiert der aus einer Monooxygenase, einer NAD⁺-abhängigen Sterol-C-4-Decarboxylase und einer NADPH-abhängigen 3-Keto-Sterol-Reduktase besteht. Dieser Enzymkomplex katalysiert die schrittweise Oxidation der 4 α -Methylgruppe eines 4,4-Dimethylsterols oder 4-Methylsterols bis zur 4 α -Carboxylgruppe über die Zwischenstufen 4 α -Hydroxymethyl- bzw. 4 α -Formylgruppe. Es folgt eine oxidative Decarboxylierung unter gleichzeitiger Eliminierung des 3 α -Wasserstoffs als „H“ durch NAD⁺. Daran schließt sich eine nicht-enzymatische Tautomerisierung des entstandenen Enols zum 3-Keto-Sterol an. Im Falle der ersten Demethylierung orientiert sich die verbleibende 4 β -Methylgruppe in die 4 α -Position um und ist damit für den nächsten Demethylierungsschritt richtig positioniert. Der letzte Schritt der Demethylierung ist die Reduktion der 3-Ketogruppe zur 3 β -Hydroxygruppe, katalysiert durch die 3-Keto-Sterol-Reduktase. Es entstehen aus 4,4-Dimethylzymosterol (**4**) schrittweise (e₁₋₇) 4-Methylzymosterol (**5**), und (f₁₋₇) Zymosterol (**6**) (Abb. 8).

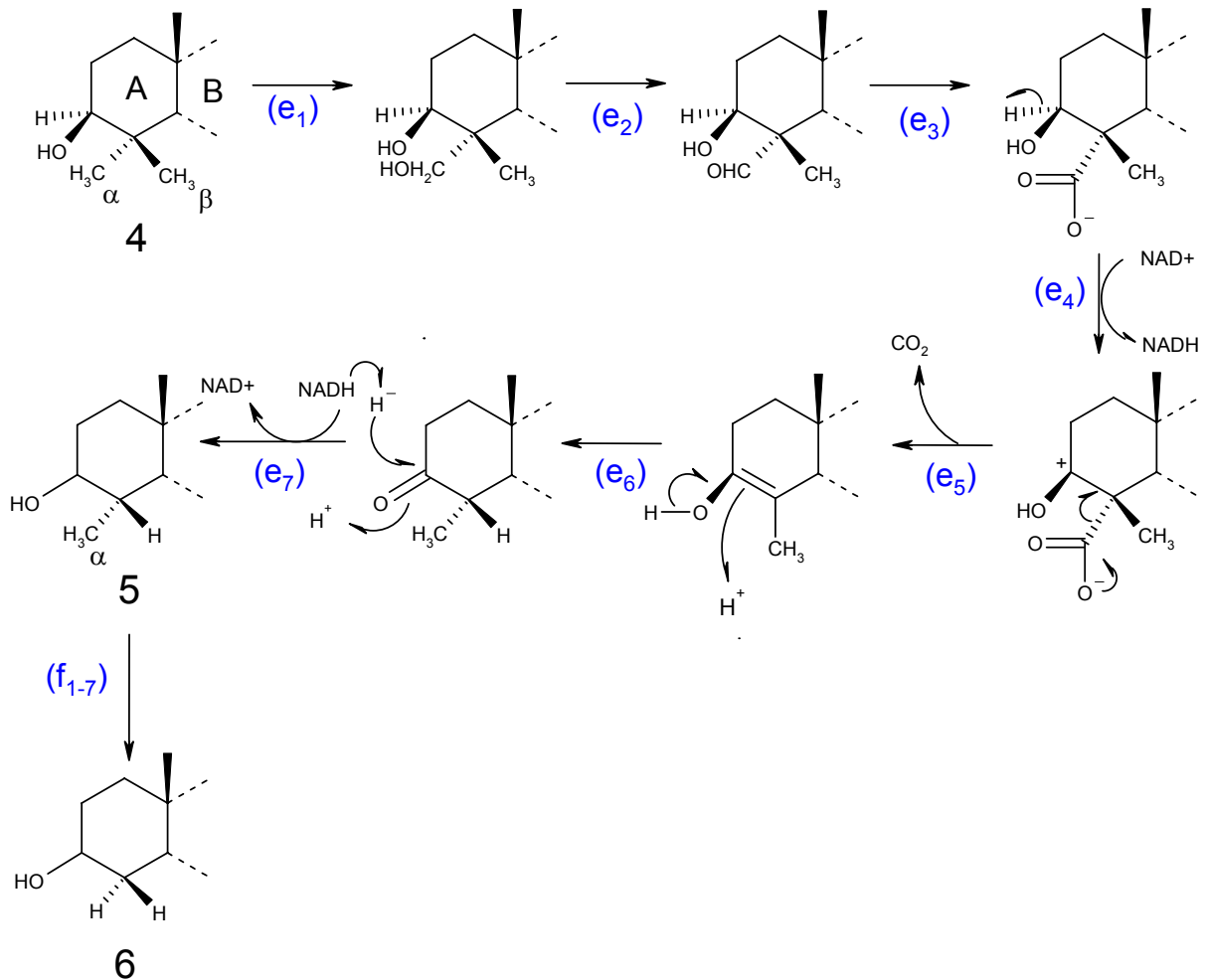


Abb. 8: Mechanismus der Sterol-C-4-Demethylierung

1.2.2.6 C-24-Sterol-Methyltransferase (24-SMT)

Das bei Hefen bevorzugte Substrat der 24-SMT ist Zymosterol (**6**). Damit unterscheidet sich hier der Ergosterol-Biosyntheseweg von dem der Pilze, wo meist Lanosterol (**2**) als Substrat dient. Im tierischen Organismus fehlt dieses Enzym, welches im Endoplasmatischen Reticulum, in Lipidtröpfchen und als integrales Membranprotein anzutreffen ist, völlig.

Das Methyl-übertragende Agens ist S-Adenosyl-L-methionin, welches unter Abspaltung von Triphosphat aus ATP und Methionin gebildet wird. Über den genauen enzymatischen Mechanismus besteht noch keine völlige Klarheit. Beispielsweise ist noch nicht geklärt, ob die Methylierung in einem zweistufigen Prozeß (S_N1) abläuft und dabei zwei carbokationische HEIs an C-25 bzw. C-24 erzeugt, oder ob nach einer konzertierten Additions-Umlagerungs-Aktion nur ein cyclischer Übergangszustand nach einem S_N2-Mechanismus existiert. 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 so genannte *steric-electric plug model*, 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.⁹ In dieser Variante wird ein Methylierungsmechanismus nach b) favorisiert (Abb. 9).

Dieser Reaktionsschritt erzeugt das erste Sterol der „Ergostan-Reihe“, Fecosterol (**7**) (= *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 (**2**) in dieser Biosynthese, sowie der „Cholestan-Reihe“, mit den Sterolen (**3**) – (**6**) (z.B. Zymosterol = *Cholesta*-8,24-dienol), weist die „Ergostan-Reihe“ eine C-24-Methylen- oder C-24 β -Methylgruppe auf.

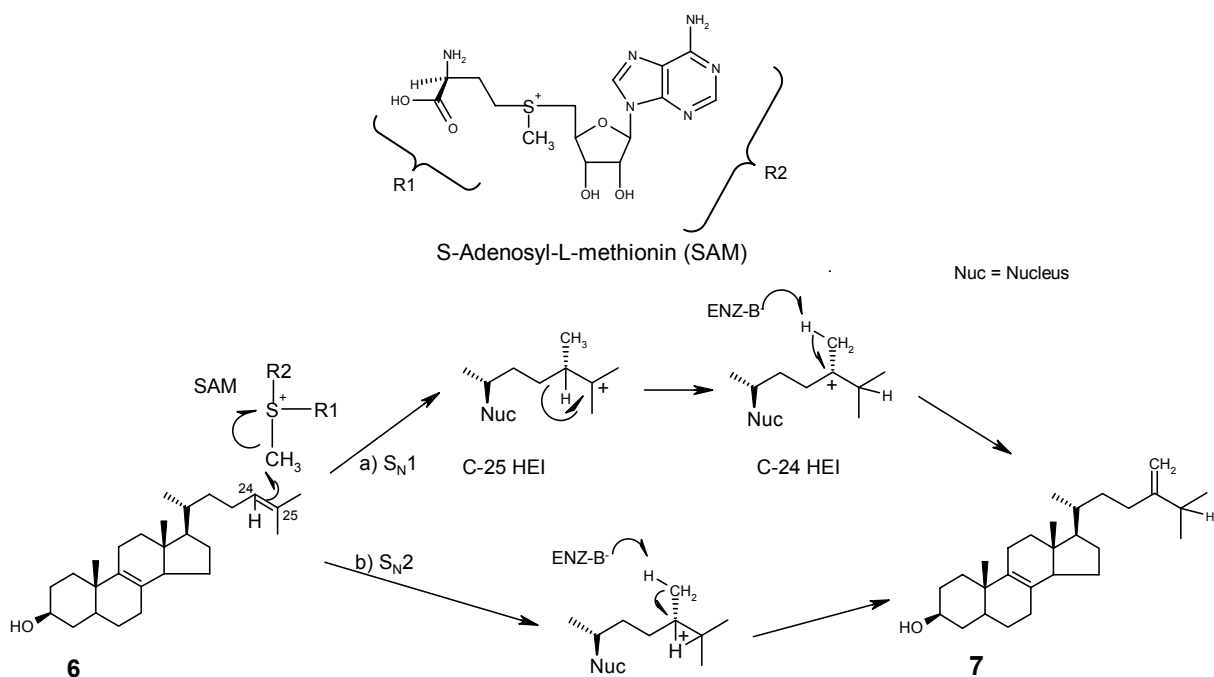


Abb. 9: SAM und Sterol-C-24-Methyltransferase-katalysierte Methylierung

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 mehr vor einem historischen, als einem logischen Hintergrund gesehen werden.

1.2.2.7 $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase

Als membranständiges Enzym ist die $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase zuständig für die Isomerisierung von Fecosterol (**7**) zu Episterol (**8**), sowohl bei Hefen als auch bei Pilzen. Es zeigen sich auch Ähnlichkeiten bei der Reaktionsfolge mit der bereits erwähnten Δ^{14} -Reduktase und der im Pflanzenreich vorkommenden Cycloeucaenol-Obtusifoliol-Isomerase (COI), welche eine protonenkatalysierte $9\beta,19$ -Cyclopropylring-Öffnung durchführt und das intermediäre C-9-HEI durch H^+ -Eliminierung am benachbarten C-8 in ein Δ^8 -Sterol überführt.

Während der Isomerisierung von Fecosterol (**7**) wird, in Analogie zur Δ^{14} -Reduktase- und zur COI-vermittelten Umsetzung, in einem ersten Schritt zunächst protoniert, und zwar an C-9 (h_1), wobei ein enzymstabilisiertes carbokationisches C-8-HEI gebildet wird. Dieses stabilisiert sich durch 7α - H^+ -Eliminierung zu Episterol (**8**; h_2 ; Abb. 10).

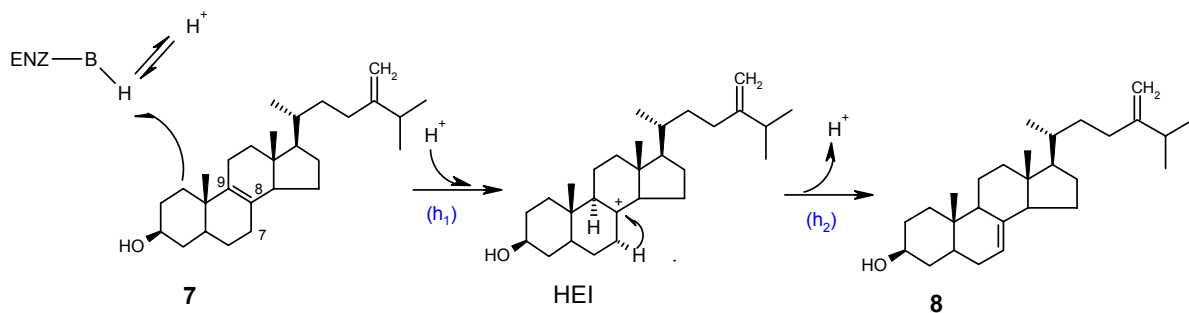


Abb. 10: $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Reaktion

1.2.2.8 Sterol-C-5-Desaturase

Die Einführung einer Δ^5 -Doppelbindung erfolgt üblicherweise an Δ^7 -Sterolen. Das Substrat dieses membranständigen Multienzymkomplexes ist daher Episterol (**8**). In der Hefe vollzieht sich die Desaturierung in einem zweistufigen Prozeß. Zunächst wird an C-6 oder C-5 hydroxyliert. Die Reaktion wird von der Sterol-C-6(5)-Hydroxylase, einer NADPH-Cytochrom b_5 -abhängigen Monooxygenase katalysiert (i_1). Das resultierende $3\beta,6\alpha$ -Diol konnte in Inhibitionsversuchen mit *S. cerevisiae* und *Ustilago maydis* nachgewiesen werden und in Fütterungsversuchen mit Ergosta-7,24(28)-dien- $3\beta,5\alpha$ -diol konnte die Umsetzung zu Ergosterol belegt werden. Dieser Sauerstoff verbrauchende erste Reaktionsschritt benötigt aerobe Bedingungen.

In einem zweiten Schritt erfolgt die Dehydratisierung zur Δ^5 -Doppelbindung durch die

6(5) α -Hydroxysterol-Dehydratase (i_2). Mit Episterol (**8**) als Substrat entsteht Ergosta-5,7,24(28)-trienol (Abb. 11).

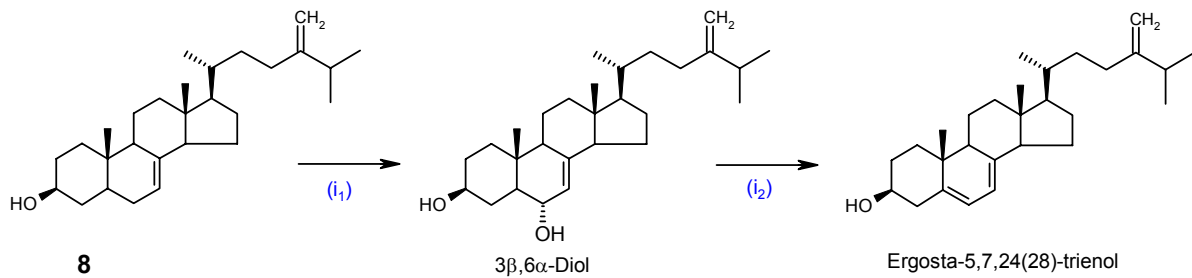


Abb. 11: Sterol-C-5-Desaturase-Reaktion

1.2.2.9 Cytochrom P_{450} -Sterol- Δ^{22} -Desaturase

Die Cytochrom P_{450} -Sterol- Δ^{22} -Desaturase ist eine Oxidoreduktase und führt die zweite Doppelbindung der Seitenkette in Konjugation zur $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung ein ((j) in Abb. 4).

Reaktionsprodukt ist das Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol (**9**). Dabei werden Sauerstoff und NADPH verbraucht. Über den Reaktionsmechanismus ist nur wenig bekannt. Das Enzym konnte in den Microsomen lokalisiert werden.

1.2.2.10 $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase

Der finale Schritt in der Biosynthese von Ergosterol (**10**) ist die Reduktion der $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung (k_{1+2}). Da bei Säugetieren keine C-24-Methylierung stattfindet, kommt dieses Enzym nur bei Pilzen und Pflanzen vor.

Diese Oxidoreduktase wurde im Endoplasmatischen Reticulum und der Microsomenfraktion gefunden. Die stereoselektive Reduktion zum Ergosterol erfolgt unter Verbrauch von NADPH und erzeugt eine 24 β -Methylgruppe (Abb. 12). Auch bei dieser Reaktion tritt ein HEI mit positiver Ladung an C-24 auf.

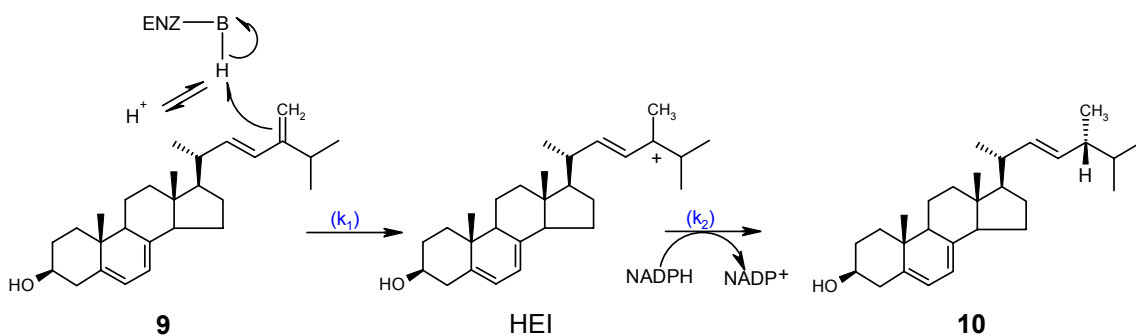


Abb. 12: $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase-Reaktion

1.3 Angriffspunkte bekannter Ergosterol-Biosyntheseinhibitoren (SBI)

Eine Beeinträchtigung der Ergosterol-Biosynthese bzw. der bereits beschriebenen physiologischen Funktionen des Ergosterols in der Membran führt über zahlreiche, noch nicht vollständig verstandene Folgeeffekte zur Wachstumshemmung oder dem Absterben der Pilze.¹⁰

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß es neben Ergosterol-Biosyntheseinhibitoren auch Antimykotika mit anderen Angriffspunkten (z.B. DNA-Synthese oder Spindelgifte) gibt. Diese spielen in der Therapie jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Antimykotika mit völlig neuen molekularen Angriffspunkten (Inhibitoren der Biosynthese von Chitin, Sphingolipiden, Proteinen oder des Elektronentransports) sind in der Entwicklung.¹¹ Ihre Markteinführung ist noch nicht in Sicht.

Im Folgenden werden neben den verschiedenen Klassen der bekannten SBIs auch einige neuartige Vertreter dieser Klasse, die im Wesentlichen für die Themenstellung dieser Arbeit verantwortlich waren, besprochen.

1.3.1 Allylamine

Die Allylamine sind nicht-kompetitive Inhibitoren der Squalenepoxidase (vgl. Tabelle 1). Die Squalenepoxidase-vermittelte Cyclisierung von Squalenepoxid zu Lanosterol kommt sowohl in der Biosynthese von Ergosterol in Pilzen als auch in der Biosynthese von Cholesterol in Säugern vor (die Biosynthesen verzweigen sich erst später, ab dem Lanosterol). Trotzdem kann mit den im Handel befindlichen Allylaminen selektiv die Ergosterol-Biosynthese in Pilzen gehemmt werden, da diese Enzyminhibitoren eine wesentlich höhere Hemmwirkung auf die fungale Squalenepoxidase als auf die Squalenepoxidase von Säugetieren haben (Faktor ≥ 1000). Dies zeigt einmal mehr, daß 2 Enzyme aus unterschiedlichen Organismen, die die gleiche Reaktion katalysieren, auf Grund ihres leicht unterschiedlichen Aufbaus durch gezielt entwickelte Inhibitoren sehr unterschiedlich stark gehemmt werden können (ein weiteres Beispiel hierfür ist die unterschiedliche starke Hemmung der Dihydrofolat-Reduktase in Bakterien und Säugern, die Basis für die antibakterielle Aktivität von Benzylpyrimidinen wie Trimethoprim).

Die Hemmung des Enzymkomplexes (vgl. Abb. 5) verhindert die Bildung von Ergosterol und wirkt so fungistatisch. Zusätzlich wirkt die Akkumulation von

toxischem Squalen fungizid. Die bekanntesten Vertreter sind Naftifin und Terbinafin (Abb. 13), beides basisch substituierte Naphthaline.

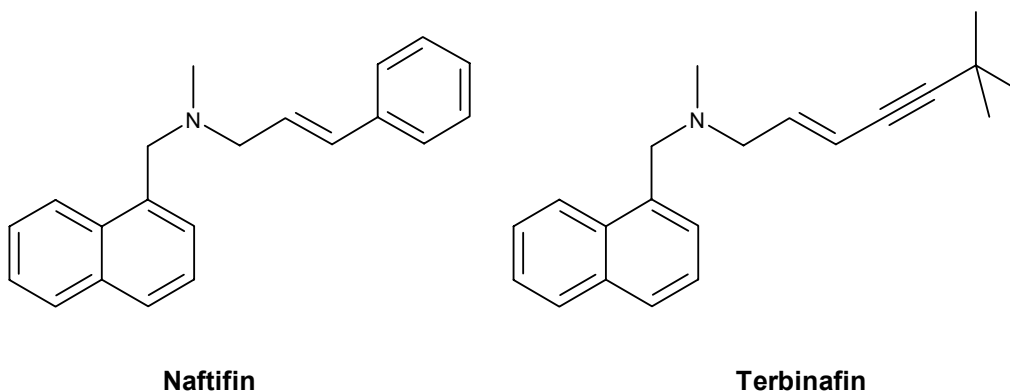


Abb. 13: Strukturen der Allylamine Naftifin und Terbinafin

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.¹²

1.3.2 Aziridine und Azasqualenoide

Die Squalenepoxidcyclase stellt ebenfalls grundsätzlich ein attraktives Target dar. Inhibitoren dieses Enzyms, wie 2,3-Dihydro-2,3-epimosqualen oder das 2-Aza-2,3-dihydrosqualen-*N*-oxid, sind seit langem als potente antimykotische Substanzen bekannt. Diese wirken allerdings nicht spezifisch auf Pilze und werden daher nur der Vollständigkeit halber erwähnt (Abb. 14).^{13, 14}

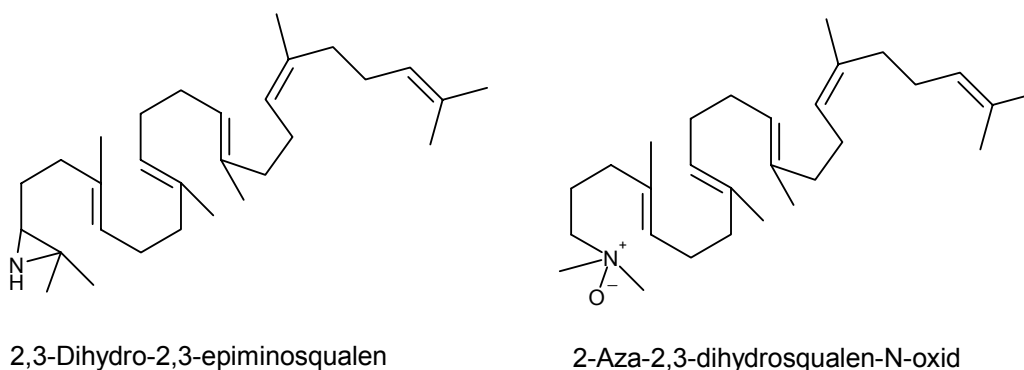


Abb. 14: Inhibitoren der Squalenepoxidcyclase

Dennoch treten bei der Cyclisierung an weiteren Positionen carbokationische Zwischenstufen (HEIs) auf (vgl. Abb. 15). Die Stickstoffatome der von *Lange*¹⁵

synthetisierten Azasecosteroide sollen diese Positionen abdecken und somit dazu verhelfen, daß diese Verbindungen als selektive Inhibitoren dieses Enzyms fungieren (vgl. Tabelle 5). Einige Substanzen sind im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der später vorgestellten Screening-Methode auf eine selektive Inhibierung hin untersucht worden.

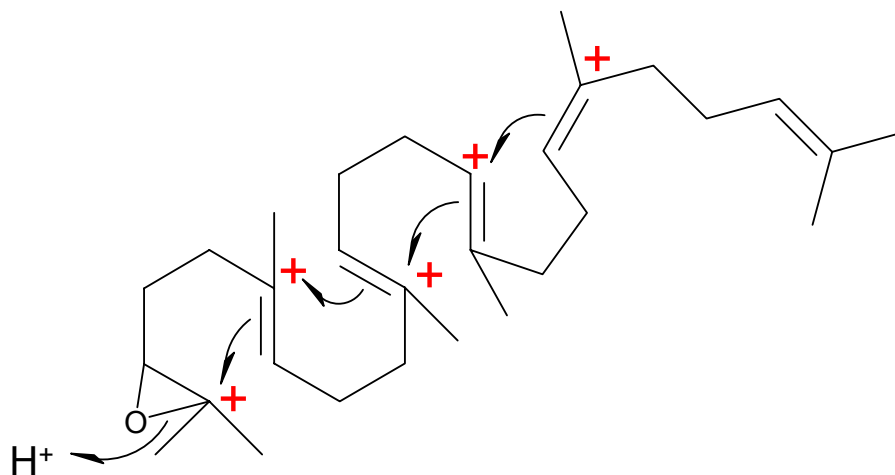


Abb. 15: Carbokationische Zwischenstufen bei der Cyclisierung von Squalenepoxid*

1.3.3 Azole

Azole lassen sich, bei gleichem Wirkprinzip, chemisch in zwei große Klassen einteilen, die Imidazole und die Triazole. Sie stellen zahlenmäßig die größte Gruppe der auf dem Markt befindlichen antimykotischen Wirkstoffe dar und haben auch die größte ökonomische Bedeutung.¹⁶

Ihre Stickstoff-Heterocylen haben eine hohe Affinität zum Häm-Eisen von Cytochrom P450, welches für die Funktion der Lanosterol-14 α -demethylase der Pilze essentiell ist.

In Abb. 16 ist schematisch die Bindung von Fluconazol (rechts) über einen der Triazolstickstoffe an das Eisen-Zentralatom des Häms (links) dargestellt. So wird kompetitiv die Aktivierung von Sauerstoff und somit die Oxidation von Lanosterol verhindert.

* Die roten „+“-Zeichen markieren Positionen, an denen intermediär während der konzertierten Cyclisierung positive Ladungen auftreten können.

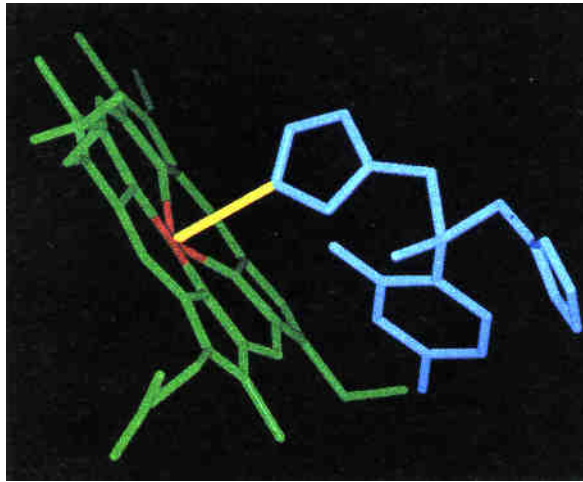


Abb. 16: Wechselwirkung von Azolen mit dem Häm-Eisen (aus ¹⁷)

Die Inhibierung der enzymatischen C-14-Demethylierung führt in der Folge zu einer Akkumulation dieses Substrates. Dadurch kommt es, wie auch bei anderen Inhibitoren der Ergosterol-Biosynthese, in der Pilzzelle zu einer Verarmung an Ergosterol. Zusätzlich werden mitochondriale peroxisomale Enzyme beeinflusst, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration toxischer Peroxide führt. In Abb. 17 sind exemplarisch einige bedeutende Azol-Antimykotika dargestellt

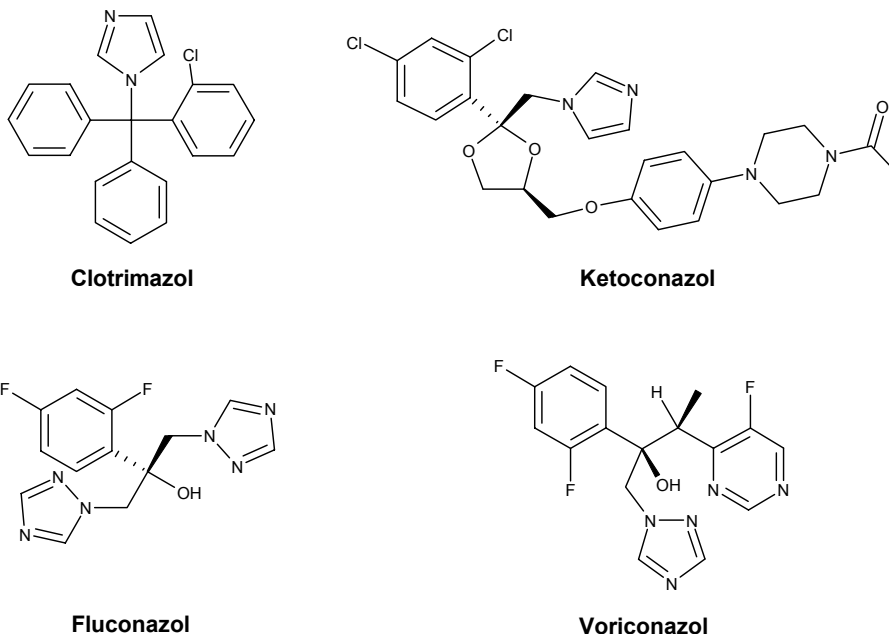


Abb. 17: Imidazol- und Triazol-Antimykotika

Azole wirken fungistatisch, in hohen Konzentrationen teils auch fungizid. Zurzeit sind zwölf Imidazole und drei Triazole in Deutschland im Handel.

In der Literatur 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 des Wirkstoffes mit der lipophilen Tasche des Enzyms.¹³ Nur so ist zu erklären, warum es Unterschiede in der Inhibitionsintensität gegenüber Pilzen verglichen mit Pflanzen oder Säugetieren gibt, welche ebenfalls eine Sterol-C-4-Demethylase besitzen.

1.3.4 Morpholine

Die Besonderheit der Morpholin-Antimykotika liegt im Wirkmechanismus begründet. Wie bereits erwähnt, postuliert man bei den Reaktionen der Sterol- Δ^{14} -Reduktase, $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase und der im Pflanzenreich vorkommenden Cycloeucaleenol-Obtusifoliol-Isomerase (COI) carbokationische Übergangszustände, die *High Energy Intermediates* (vgl. 1.1.1.1 und 1.2.2.7). Betrachtet man diese C-8-, C-9- und C-14-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 in der Lage, auf Grund ihrer Geometrie und Elektronendichteverteilung die energiereichen Carbeniumionen mit hinreichender Genauigkeit zu imitieren (Mimikry; Abb. 19).

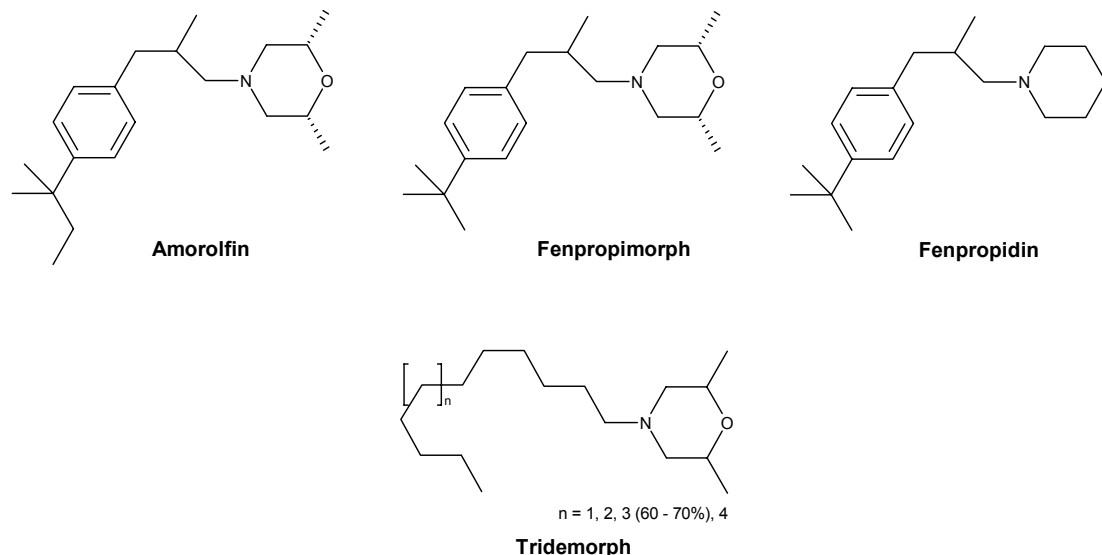


Abb. 18: Morpholin-Antimykotika

Als einziger in der Humantherapie eingesetzten Vertreter der Morpholin-Antimykotika ist das Amorolfin zu nennen. Weitere strukturverwandte Stoffe wie beispielsweise das Tridemorph, Fenpropidin oder das Phenpropimorph kommen in der Tiermedizin

bzw. beim Pflanzenschutz zur Anwendung (Abb. 18).

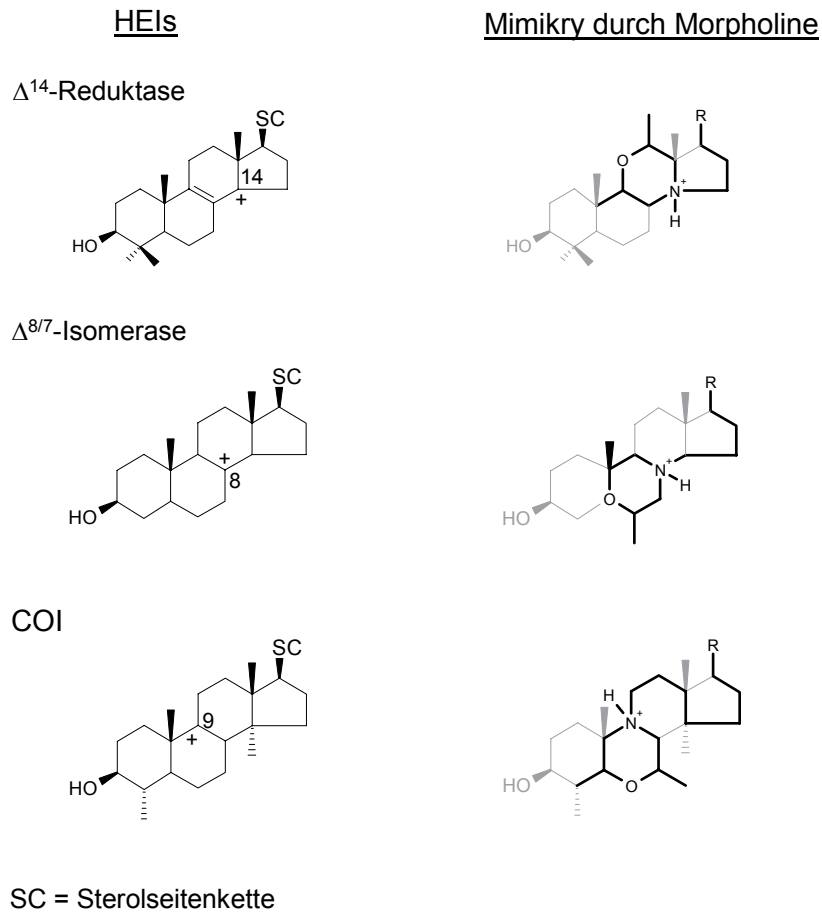


Abb. 19: Strukturelle und elektronische Mimikry der HEIs durch Morpholin-Antimykotika

Obwohl Morpholine generell in der Lage sind, sowohl die Sterol- Δ^{14} -Reduktase als auch die Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase zu hemmen, gibt es zwischen den genannten Vertretern bezüglich der Affinitäten bestimmte Präferenzen zu dem einen oder anderen Enzym. Nach Inhibierungsversuchen mit Amorolfiin und Fenpropimorph akkumulieren sowohl Δ^8 - als auch $\Delta^{8,14}$ -Sterole, was darauf hindeutet, daß beide Enzyme Targets darstellen. Bei Tridemorph wurde eine sehr viel stärkere Inhibitionswirkung auf die Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase festgestellt. Fenpropidin zeigt zwar eine ähnliche Hemmung wie Fenpropimorph, jedoch überwiegt der Anteil an gefundenen $\Delta^{8,14}$ -Sterolen deutlich.¹⁸

Während bei Allylaminen und Azolen fungistatische Effekte auch auf die Akkumulation der entsprechenden Sterole zurückzuführen ist, ist dies bei Morpholinen hauptsächlich auf der Verarmung an Ergosterol zurückzuführen.¹⁸

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

Basierend auf dem postulierten Wirkungsmechanismus der Mimikry der *High Energy Intermediates* (HEIs) durch protonierte Amine 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.^{19, 20} Diese imitieren die Ringe A und B des Sterolgrundgerüsts und tragen eine *N*-Oxid-Funktion bzw. eine bei physiologischem pH durch Protonierung eine positive Ladung am Stickstoffatom 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 Sterolseitenkette mehr oder weniger gut imitieren. In Inhibitionsversuchen an Mais-Embryonen konnten einige davon als potente $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase- bzw. Sterol- Δ^{14} -Reduktase- bzw. COI-Inhibitoren charakterisiert werden (v.l.n.r. in dieser Reihenfolge, Abb. 20).

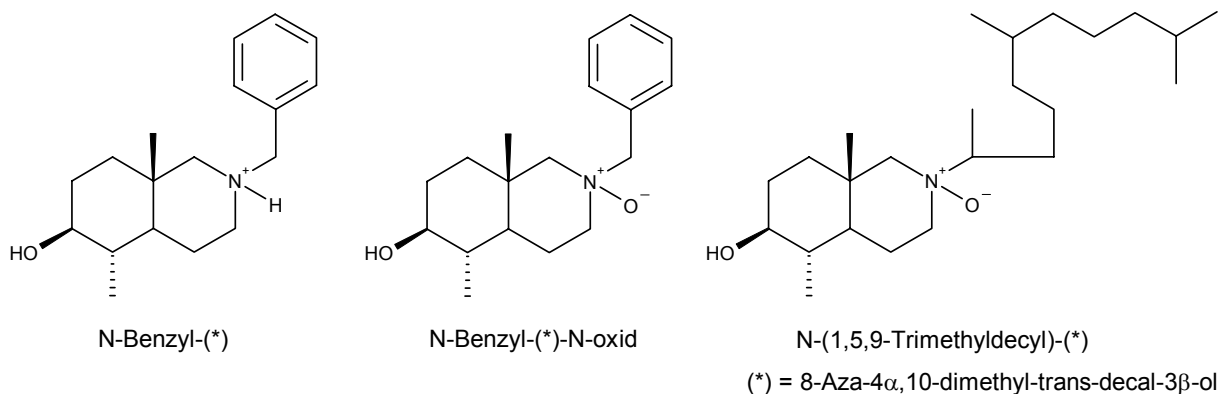


Abb. 20: Azasecosteroide von Benveniste et al.

1.3.6 Inhibitoren des Sterol-C-4-Demethylase-Komplexes

Die Inhibition des Sterol-C-4-Demethylase-Komplexes ist für die Entwicklung potentieller SBIs in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen bietet er drei Enzyme als mögliche Angriffsziele. Zum anderen wären C-4-methylierte Sterole nicht in der Lage die „*bulk*“-Funktion zu erfüllen (vgl. 1.1).

In der Tat sind derzeit nur wenige Substanzen bekannt, die als Inhibitoren der C-4-Demethylase identifiziert werden konnten (Abb. 21), über das „Laborstadium“ jedoch nicht hinausgekommen sind.^{21, 22, 23}

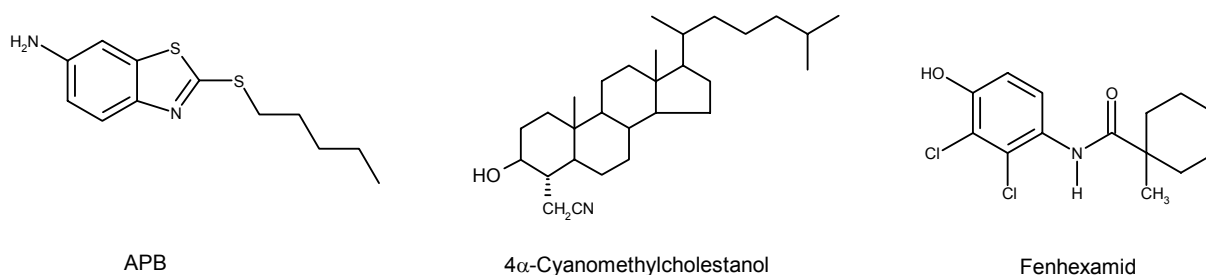


Abb. 21: Inhibitoren des Sterol-C-4-Demethylase-Komplexes

Während beim 4 α -Cyanomethylcholestanol noch eine gewisse Ähnlichkeit zum Substrat 4,4-Dimethylzymosterol (**4**) zu erkennen ist, kann man bei APB und Fenhexamid nur spekulieren, warum sie die Sterol-C-4-Demethylase hemmen.

1.3.7 Inhibitoren der C-24-Methyltransferase (SMT) und Sterol- Δ^{24} -Reduktase

Da die C-24-Methyltransferase (SMT) und Sterol- Δ^{24} -Reduktase in der Ergosterol-Biosynthese von Säugetieren nicht vorkommen, eröffnen diese Enzyme ein sehr attraktives Target für die Entwicklung selektiv antimykotisch aktiver Wirkstoffe. Durch Einbringen einer positiven Ladung in die Seitenkette sollte es möglich sein, Analoga von HEIs als wirksame Inhibitoren zu synthetisieren (vgl. 1.2.2.6 und 1.2.2.10). In ersten Arbeiten anderer Autoren konnte gezeigt werden, daß das auch bei den Morpholinen angewandte Prinzip der Imitation von *High Energy Intermediates* durch kationische Analoga auch an dieser Stelle funktioniert (Abb. 22).

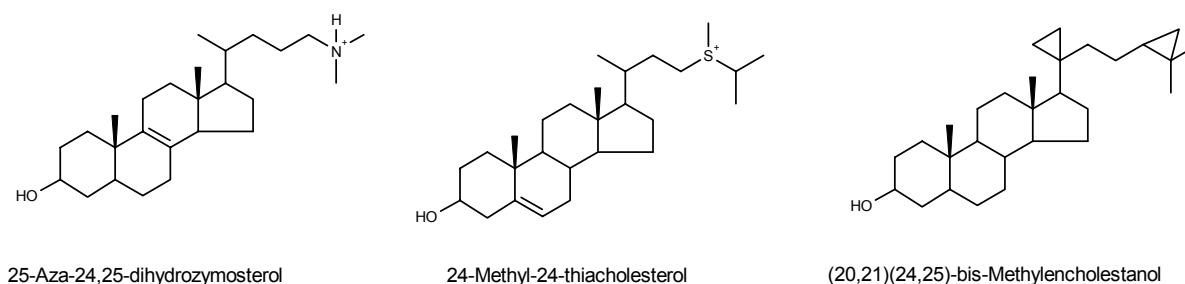


Abb. 22: Inhibitoren der SMT und Sterol- Δ^{24} -Reduktase

Bei (20,21)(24,25)-bis-Methylencholestanol kann über den Wirkmechanismus aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Ausbildung einer positiven Ladung erneut nur spekuliert werden. Wie in 1.2.2.6 gezeigt, postuliert man an C-24 und C-25 carbokationische Zwischenstufen, die man durch Synthese geeigneter „*transition-state-analogues*“ zu imitieren versuchen kann, welche eine höhere Bindungsaffinität zum Enzym aufweisen.¹⁴

Bisher haben sich jedoch alle SMT-Inhibitoren als zu toxisch für die menschliche bzw. tierische Physiologie erwiesen.¹⁴ Da jedoch diese ersten Resultate recht viel versprechend waren und weiterhin ein kommerzielles Interesse an potentiellen Inhibitoren dieser Enzyme besteht, wurden auch in unserer Arbeitsgruppe von *Gans*²⁴ und *Renard*⁷² potentielle Hemmstoffe synthetisiert und mit Hilfe der später vorgestellten Screening-Methode auf eine selektive Enzyminhibition hin untersucht.

1.3.8 Azasteroide und Azasecosteroide als Antimykotika

Azasteroide zeigen ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten. Bei ihnen sind ein oder mehrere Kohlenstoffatome durch Stickstoffatome ersetzt. Beispiele hierfür sind der 5 α -Reduktasehemmer Finasterid, der GABA-Rezeptorantagonist RU-5135, sowie Muskelrelaxantien wie Pancuroniumbromid und Chandoniumiodid (Abb. 23).

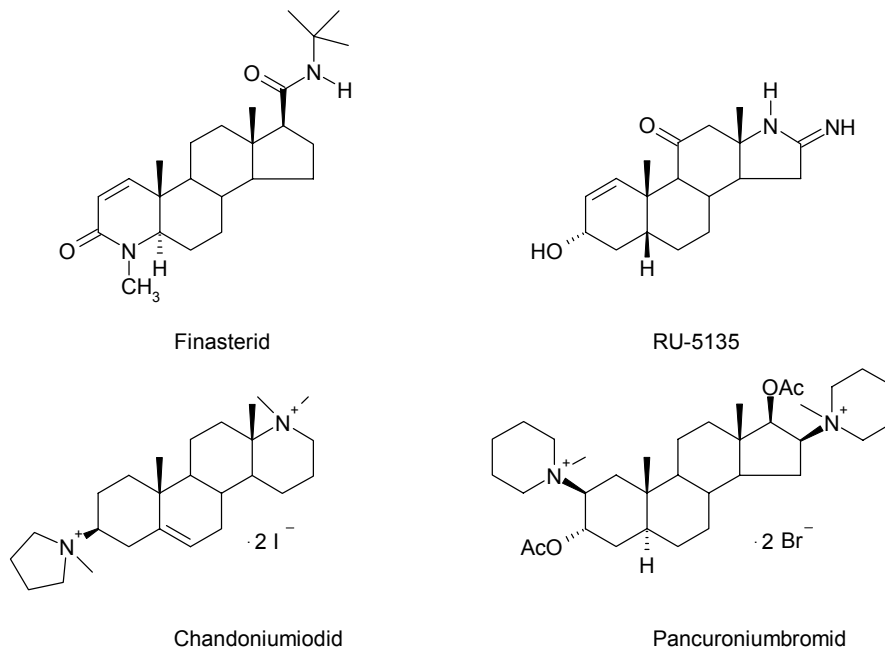


Abb. 23: Biologisch aktive Azasteroide

Da die meisten Arbeitsgruppen mit Forschungsschwerpunkt Azasteroide an anderen biochemischen Zielen interessiert waren, spielen Azasteroide, obwohl ihr antimykotisches Potential bekannt ist²⁵, als Fungistatika heute eher eine untergeordnete Rolle.

Im Folgenden werden unterschiedliche Azasterole vorgestellt, deren antimykotische Wirkungsweise richtungweisend sowohl für die Themenstellung dieser Arbeit als auch für andere in unserer Arbeitsgruppe synthetisierte und in dieser Arbeit auf Ihre Wirkungsstärke und ihren Wirkmechanismus untersuchte Substanzen war.

1.3.8.1 4-Azasteroide

In den sechziger Jahren beschreiben *Doorenbos* et al. Substanzen, die eine antimikrobielle Wirkung auf gram-positive Bakterien, Hefen und Schimmelpilze haben.²⁶ Sie gehören zur Klasse der 4-Azasteroide. Die drei wirksamsten, ND-307, ND-326 und ND-354, sind in Abb. 24 abgebildet. Es konnte nachgewiesen werden, daß die biologische Aktivität nicht nur auf den oberflächenaktiven Eigenschaften der Substanzen beruht, sondern von spezifischer Natur ist.^{27, 28} Eine genaue Screening-Methode zur genauen Bestimmung des Target-Enzyms stand jedoch nicht zur Verfügung.

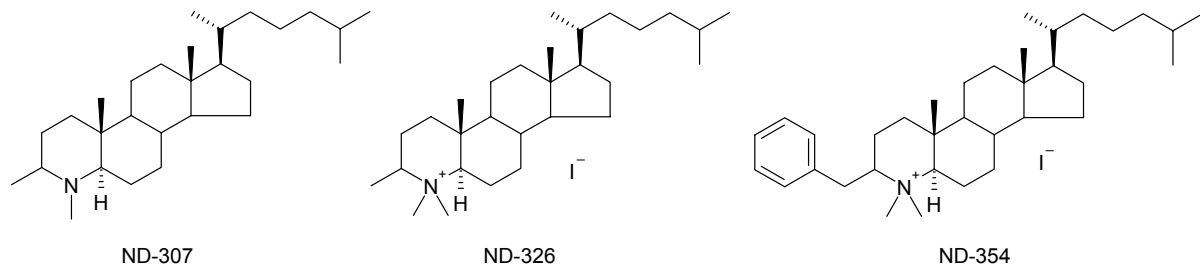


Abb. 24: Azasteroide von *Doorenbos* et al.

Trotzdem konnte dieselbe Arbeitsgruppe nach ausführlicher Bearbeitung des Themas feststellen, daß der fungizide Effekt in hohem Maße von der Struktur des Azasteroids abhängig ist. So sind ein basischer Stickstoff oder eine Ammoniumgruppe und eine lipophile Seitenkette absolut essentiell.^{29, 30}

Betrachtet man die in Abb. 24 dargestellten Verbindungen, so kommen zwei Enzyme als mögliche Targets in Frage. Da der Stickstoff eine carbokationische Zwischenstufe in der Position 4 imitieren kann, könnten also die Squalenepoxidcyclase oder/und Sterol-C-4-Demethylase betroffen sein.

1.3.8.2 8-Azasteroide und Analoga

Bei der Ergosterol-Biosynthese kommt bei mindestens zwei Schritten ein carbokationisches *High Energy Intermediate* (HEI) an der Position 8 vor. 8-Azasteroide könnten also einerseits die Cyclisierung des Squalenepoxids zu Lanosterol durch „Blockierung“ der 2,3-Oxidosqualencyclase als auch die Isomerisierung des Fecosterols zu Episterol durch „Blockierung“ der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase hemmen.

Wie bereits in 1.3.5 erwähnt, entwickelten *Taton*, *Benveniste* und *Rahier* Isochinoline, die das A-B-Ringsystem von Steroiden simulieren. An isolierten Enzymen und an zellulären Systemen getestet zeigten diese Substanzen eine hohe Spezifität für die $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase und zeigten erneut, daß ein basischer Stickstoff und lange lipophile Seitenketten für die Wirkung essentiell sind.³¹ Die Untersuchungen dieser Gruppe legen nahe, daß das tetraedrische, sp^3 -hybridisierte Ammoniumion den Platz von planaren, sp^2 -hybridisierten carbokationischen Zentren im HEI einnehmen kann.³²

Eine Gruppe um *Quégiuner* versuchte mit substituierten Chinolizidinen, die die Ringe B und C des Steroidgrundgerüsts simulieren sollten, HEIs mit einer carbokationischen 8-Position nachzubilden. Es konnte eine deutliche Wirkung auf ein zellfreies Testsystem für $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase nachgewiesen werden, die für das in Abb. 25 dargestellte Isomer etwas besser war, als für das an der markierten Stelle (*) isomerisierte.

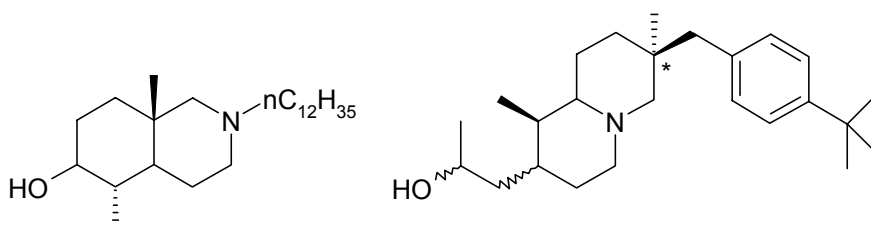


Abb. 25: Ein Isochinolin und ein Chinolizidin mit fungistatischer Wirkung

Daab aus unserer Arbeitsgruppe beschäftigte sich u.a. mit der Synthese verschiedener Pyridiniumverbindungen und deren hydrierten Pendants, den Octahydropyridinen.³³ Mit einer am heterocyclischen Grundgerüst fixierten positiven Ladung in Position 8 des Sterolgrundgerüsts sollten HEI-Analoga synthetisiert werden, die potentielle Hemmstoffe der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase darstellen (Abb. 26).

Es zeigte sich, daß *N*-(2-Phenylethyl)-6,7-dihydro-5*H*-pyridiniumperchlorat (Abb. 26) und 5-(2-Phenylethyl)-1,2,3-trihydroindolizidiniumchlorid (Abb. 28) in ihrer antimykotischen Aktivität und in ihrem Wirkungsspektrum dem kommerziell erhältlichen Miconazol überlegen sind. Von den potentiellen $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitoren ist *N*-(2-Phenylethyl)-6,7-dihydro-5*H*-pyridiniumperchlorat im Agar-Diffusionstest gut gegen *Candida albicans* wirksam. Allerdings betrifft der Wirkmechanismus nicht, wie erhofft, die Ergosterol-Biosynthese. Die fehlende Sterolseitenkette lässt sich als möglicher Hauptgrund anführen.

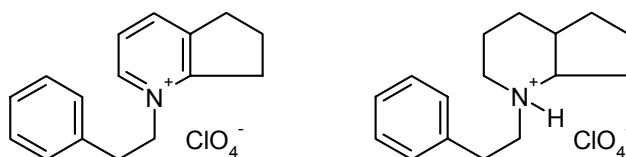


Abb. 26: 6,7-Dihydro-5H-pyridinium- bzw. Octahydropyridinsalze

Auch die Arbeiten von *Burbiel*³⁴ und *Salman*³⁵ aus unserer Arbeitsgruppe befassten sich mit Strukturen, die mit einer carbokationischen 8-Position HEIs simulieren können. Ähnlich wie bei *Daab* werden auch hier die Ringe C und D des Sterolgrundgerüsts nachgebildet. Ausgehend von Vitamin D wurden 2-Azabicyclo-[5.3.0]decan-Derivate synthetisiert. Vorteil dieser Synthesestrategie ist eine dem natürlichen Substrat entsprechende Stereochemie. So sind beide Ringe, wie beim Sterolgrundgerüst *trans*-ständig verknüpft und weisen die natürlich vorhandene, anguläre Methylgruppe auf. Auch entspricht die Seitenkette im Wesentlichen der Ihres natürlichen Vorbilds. Einige hochgradig fungizid wirkende Vertreter sind in Abb. 27 dargestellt.

In einer in unserer Arbeitsgruppe neu entwickelten Screening-Methode, auf die im Späteren noch eingegangen wird und die wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist, zeigten diese Azasecosteroide nicht nur ihr potentes antimykotisches Potential. Sie konnten auch eindeutig als Inhibitoren der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase identifiziert werden.

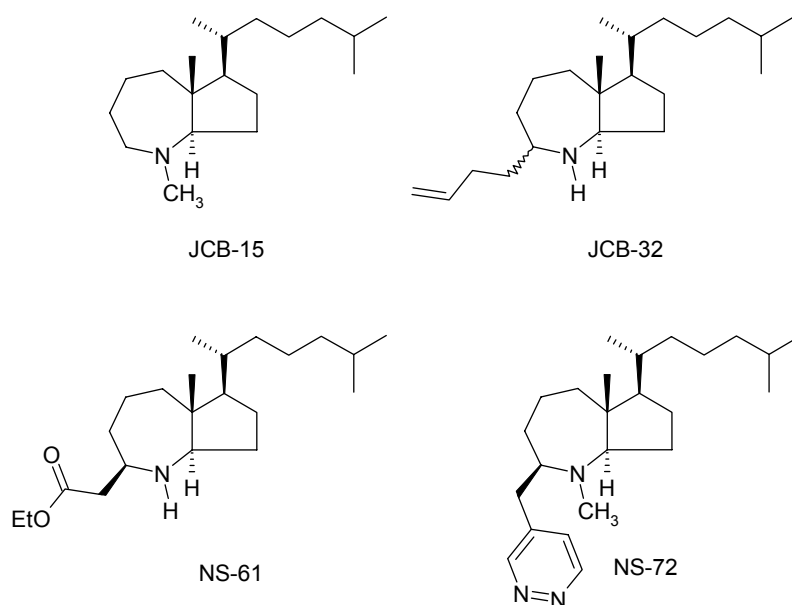


Abb. 27: Azasecosteroid-Analoga von *Burbiel* und *Salman*

1.3.8.3 14-Azasteroide und Derivate

Neben den im vorherigen Kapitel beschriebenen Grundkörpern widmete sich *Daab* außerdem der Totalsynthese der Naturstoffe Ficuseptin und Ipalbidinium, zwei Trihydroindolizidiniumalkaloiden.³³ Die Indolizidinium-Verbindungen decken die Ringe C und D des Sterolgrundgerüsts ab und sollten mit ihrer positiven Ladung in Position 14 das HEI der Sterol- Δ^{14} -Reduktase imitieren (Abb. 7).

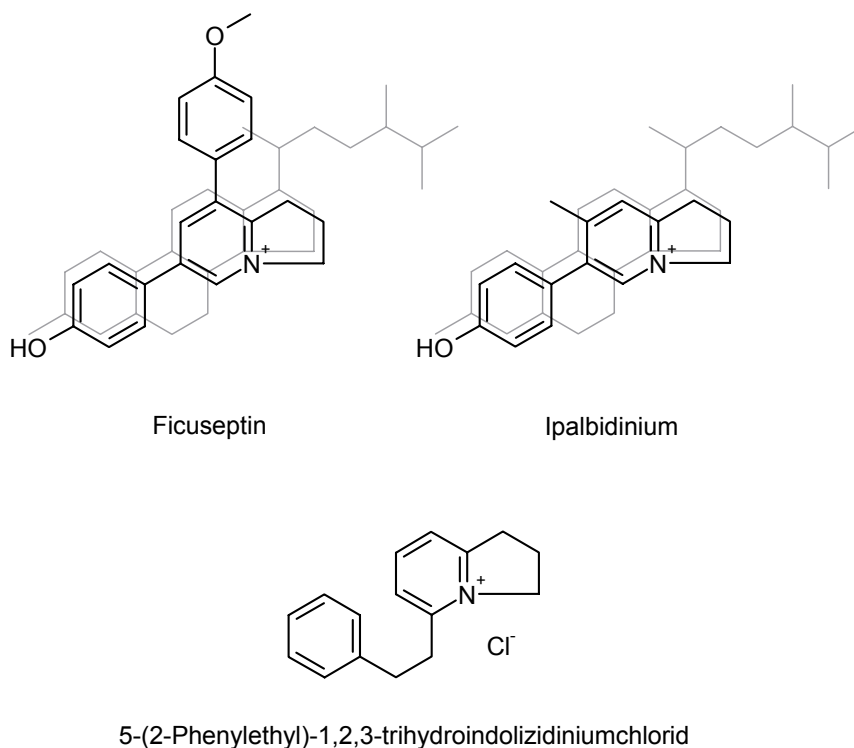


Abb. 28: Postulierte HEI-Imitation durch Ficuseptin und Ipalbidinium sowie Derivat

Diese Substanzen erwiesen sich ebenfalls auch als antimykotisch aktiv (Ficuseptin zeigte gegenüber *Candida albicans* eine den Azolen deutlich überlegene Wirkung), jedoch war die Ergosterol-Biosynthese wiederum nicht betroffen. Als Erklärung hierfür läßt sich erneut das Fehlen einer Sterolseitenkette anführen.

1.3.8.4 15-Azasteroide

In Abb. 29 ist das 15-Azasterol A25822B dargestellt, ein fungizider Naturstoff der aus *Geotrichum flavo-brunneum*-Kulturen isoliert wurde.²⁵ Bei Vertretern dieser Klasse handelt es sich um sehr seltene natürlich vorkommende Azasteroide, bei denen sich der Stickstoff im Steroidgrundgerüst befindet.

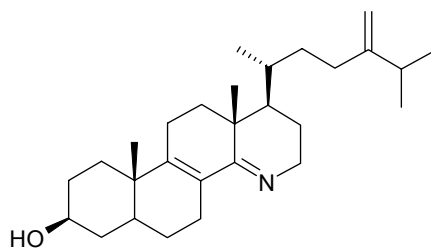


Abb. 29: Das 15-Azasteroid A25822B

Parks und *Rodriguez* zeigten 1983, daß A25822B drei Enzyme der Ergosterol-Biosynthese hemmt. Am stärksten ist die Sterol- Δ^{14} -Reduktase (nicht-kompetitiv) betroffen. Daneben zeigte sich auch eine deutliche Hemmung der C-24-Methyltransferase und der Sterol- $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase (beide kompetitiv).³⁶

1.3.8.5 Seitenketten-Azasteroide

Wie in 1.3.7 bereits erwähnt, wurde das Gebiet der Seitenkettenazasterole als Fungistatika auch schon früher bearbeitet. Für Synthesestufen und Derivate des von *Gans*²⁴ in unserer Arbeitsgruppe synthetisierten marinen Naturstoffs Plakinamin B (Abb. 30) konnte *Müller*³⁷ eine antimykotische Wirkung nachweisen. Darüber hinaus konnte die C-24-Methyltransferase als Angriffspunkt nachgewiesen werden.

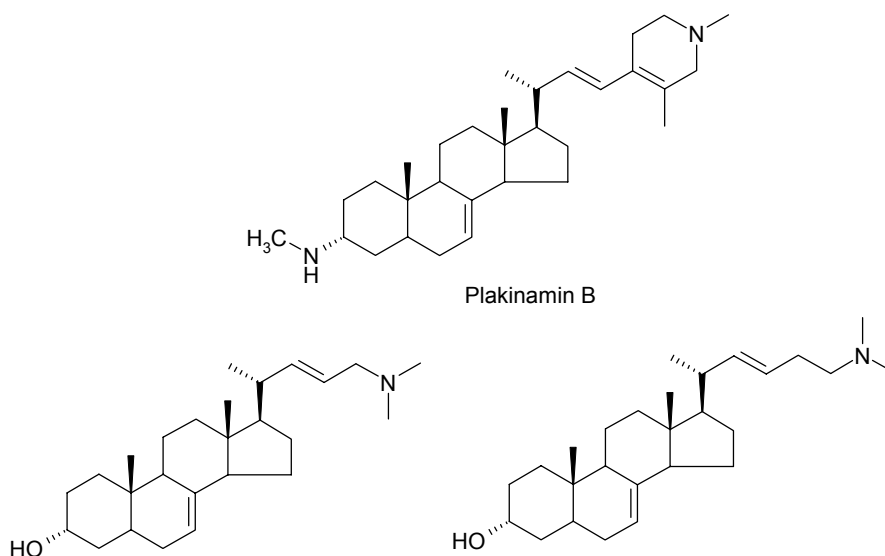


Abb. 30: Plakinamin B und antimykotisch wirksame Derivate

1.4 Charakterisierung des Inhibitionsverhaltens anhand der Analytik von freien Sterolen

Vor einigen Jahren entwickelte Müller³⁷ in unserer Arbeitsgruppe ein Testsystem mit dem er in der Lage war, neue, potentielle Ergosterol-Biosyntheseinhibitoren als solche zu erkennen und hinsichtlich ihres Zielenzym richtig einzuordnen.

Das Prinzip dieses Testsystems beruht auf der Inkubation eines Testorganismus mit subletalen Mengen an Wirkstoff. Bei einem Inhibitionserfolg verändert sich das Sterolmuster des Pilzes in typischer Weise abhängig vom Zielenzym des Wirkstoffes in der Ergosterol-Biosynthese. Diese Veränderungen gegenüber dem normalen Sterolmuster können nach Extraktion der Sterolfraktion chromatographisch dargestellt und interpretiert werden. Dies konnte durch Abgleich mit einer zum Teil selbst erstellten Datenbank von Massenspektren bewerkstelligt werden, welche es ermöglicht, alle neu auftretenden Sterole zu identifizieren.

Als geeigneter Testkeim wird die nicht-pathogene Hefe *Yarrowia lipolytica* eingesetzt, da diese innerhalb eines kurzen Inkubationszeitraums (72 Stunden) genügend Biomasse erzeugt und auch in der Handhabung unkompliziert ist. In weiten Teilen stimmt das Verhalten dieser Hefe mit dem von phyto- und humanpathogenen Pilzen gezeigten Verhalten überein, so daß die Ergebnisse zumindest qualitativ übertragbar sind.

Die entwickelte Methode zur Isolierung der Sterolfraktion aus Hefe beruht auf dem Prinzip der Festphasenextraktion (SPE). Dabei wird im Anschluß an eine modifizierte alkalische Hydrolyse der Hefe das zentrifugierte Hydrolysat auf eine Polymerphase gegeben, wobei die Parameter so gewählt sind, daß nur die Sterolfraktion an die Phase adsorbiert. Die Phase besteht aus Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer (Abb. 31) und zeichnet sich neben lipophile Eigenschaften auch durch eine hohe pH-Stabilität aus. Ein einmaliger Elutionsschritt mit einem kleinen Volumen an Ethylacetat desorbiert die Sterolfraktion vollständig von der Phase und bewirkt eine starke Aufkonzentrierung. So bewirkt die SPE zusätzlich eine Filtration der Probe.

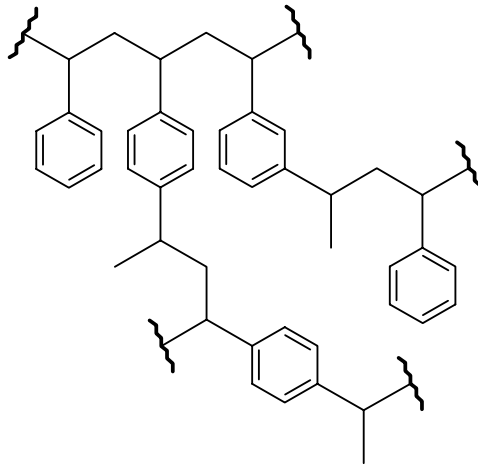


Abb. 31: Strukturausschnitt einer Polymerphase

Mit dem von *Müller* entwickelten Testsystem, aber auch der von ihm aufgebauten MS-Datenbank konnten nun Sterole chromatographisch mittels GC/MS anhand von Retentionszeit und Abgleich von Massenspektren verlässlich identifiziert werden.

Die genaue Durchführung dieser Screening-Methode wird in Kapitel 4.2 beschrieben.

2 Themenstellung

Angesichts der stetig steigenden Resistenzbildung gegenüber Antimykotika, aber auch der wachsenden Zahl an immunschwachen und daher für Mykosen besonders anfälligen Menschen, ist es nötig, neue Wirkstoffe zu entwickeln. Wie im vorangegangenen Kapitel skizziert, bietet die Ergosterol-Biosynthese hierbei einen ausgezeichneten Angriffspunkt, wie die bereits vorgestellten und teilweise am Markt befindlichen Antimykotika beweisen. Trotzdem ist ein „optimales“ Antimykotikum noch nicht gefunden und es besteht weiter Forschungsbedarf. Neben der Synthese neuer Verbindungen ist es jedoch vor allem nötig diese auch als antimykotisch wirksam zu erkennen und hinsichtlich ihres Angriffsortes richtig einzuordnen.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Wirkstofffindung potentieller Antimykotika, sowohl im präparativ-chemischen wie aber auch im analytischen Sinne.

Wie die Arbeiten von *Daab*, *Burbiel* und *Salman* gezeigt haben, können Enzyme häufig wirksam durch Substanzen inhibiert werden, die dem enzymgebundenen Übergangszustand des natürlichen Substrats („*transition state*“) ähnlich sind. Dabei sind hochenergetische Zwischenstufen („*high energy intermediates*“, HEIs), wie sie bei enzymatischen Reaktionen vorkommen, eine gute Annäherung an diese enzymgebundenen Übergangszustände.

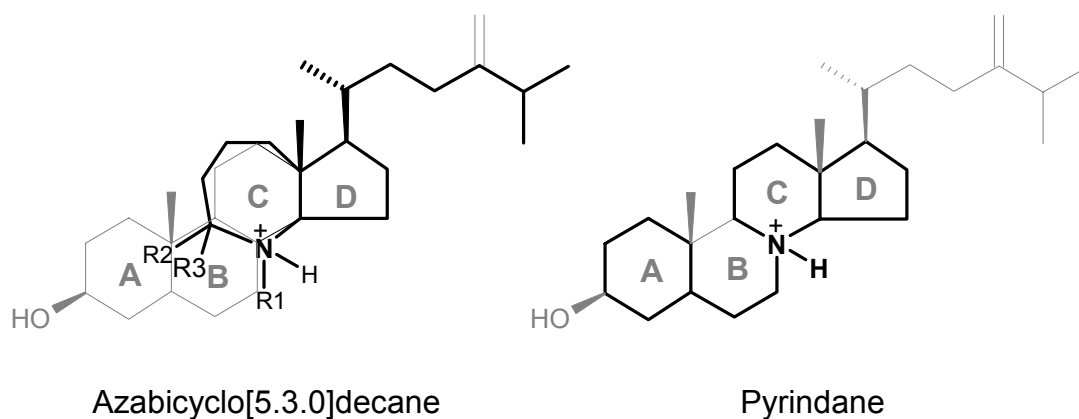


Abb. 32: Mimikry des HEI der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerisierung

Die von *Daab* synthetisierten Pyrindinderivate auf der einen, wie aber auch die von *Burbiel* und *Salman* hergestellten 2-Azabicyclo[5.3.0]decane auf der anderen Seite, ähneln dem HEI der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase (Abb. 32).

Während *Daabs* Octahydropyrindine in ihrer abgebildeten Form zwar antimykotisch

aktiv ist, zeigte sich im Screening, daß es sich bei diesen Verbindungen nicht um Sterolbiosynthese-Inhibitoren handelt. Mögliche Ursachen könnten, wie bereits in der Einleitung erwähnt, die fehlende Seitenkette bzw. auch eine dem natürlichen Steroidgrundgerüst nicht entsprechende stereochemische Ring-C/D-Verknüpfung sein. Außerdem könnte das Fehlen der angulären Methylgruppe eine Rolle spielen.

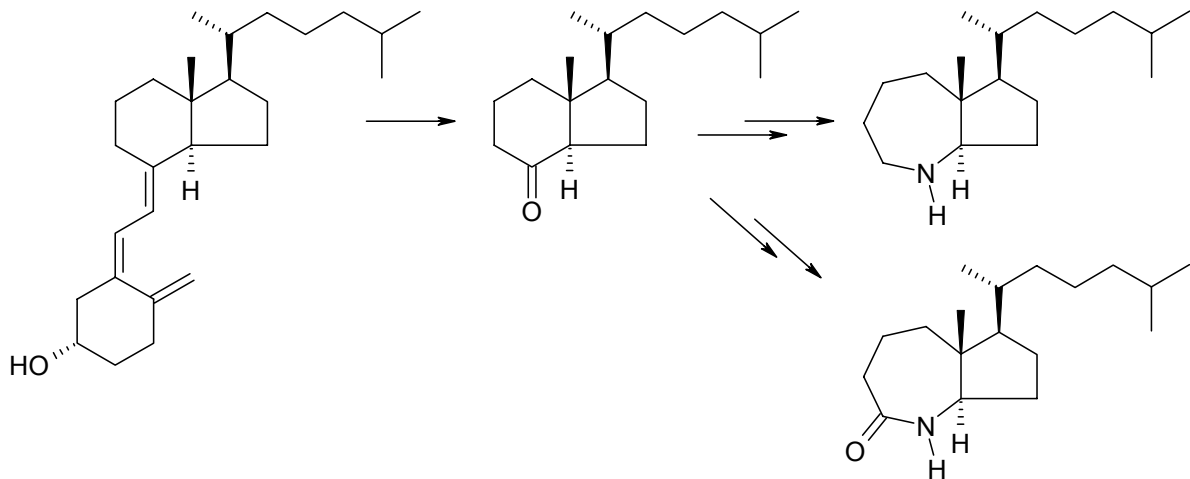


Abb. 33: Azasecosteroidsynthese ausgehend von Vitamin D

Dem gegenüber bringt Cholecalciferol als Edukt für Azasecosteroide eine definierte Stereochemie mit, die der des „*high energy intermediate*“ entspricht. Ferner ist es als industrielles Produkt in beliebigen Mengen erhältlich (Abb. 33). Im Gegensatz zu den Pyridinderivaten konnten die aus Vitamin-D synthetisierten Azabicyclo[5.3.0]decane als SBIs identifiziert werden.

Da jedoch die Herstellungskosten bei Humanarzneimitteln, insbesondere jedoch bei Fungiziden für die Landwirtschaft, eine gewichtige Rolle spielen, ist Cholecalciferol als Syntheseausgangsstoff eher von Nachteil, da es vergleichsmäßig teuer ist.

Basierend auf den Ergebnissen der biologischen Testung von Pyridinen und Azasecosteroiden und in Anlehnung an die strukturellen Merkmale dieser Grundkörper, sollten Substanzen synthetisiert werden, die folgende Vorgaben erfüllen:

- Synthese von 1-Pyrindan- bzw. 1-Pyridin-Grundkörpern als Ring C/D-Analoga nach Vorbild von *Daab*, *Burbiel* und *Salman*
- Spätere Substitution mit Seitenketten- und/oder Ring-A/B-Analoga (vgl. R_1 , R_2 und R_3)
- Verwendung kostengünstiger Edukte

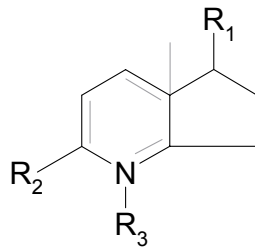


Abb. 34: Geplanter Grundkörper

Der analytische Teil der Arbeit sollte umfassen:

- Vergleich der antimykotischen Aktivität der neuen Substanzen mit ähnlich strukturierten Verbindungen von *Daab*, *Burbiel* und *Salman*
- Ableitung von Struktur–Aktivitäts–Beziehungen von Grundkörpern, Stereochemie und Substituenten
- Untersuchung anderer bekannter bzw. potentieller Antimykotika auf ihr SBI-Potential und, sofern möglich, eine exakte Zuordnung ihres Zielenzym, sowie ein Vergleich der Wirkstärken mit denen anderer bereits getesteten Substanzen.

Präparativ-chemischer Teil

Ausgehend von Pyrindan sollte über selektive Oxidation der Position 5 eine Carbonylgruppe eingeführt werden. Der so erhaltene 5-Oxo-pyrindan-Grundkörper **A** sollte im Anschluß mit einfachen Reaktionen (nach *Wittig*, *Grignard*, *Williamson* (über Alkohol) bzw. durch reduktive Aminierung) mit verschiedenen, die Sterolseitenkette imitierenden Substituenten versehen werden (Zielverbindungen vom Typ **B**; vgl. Abb. 35).

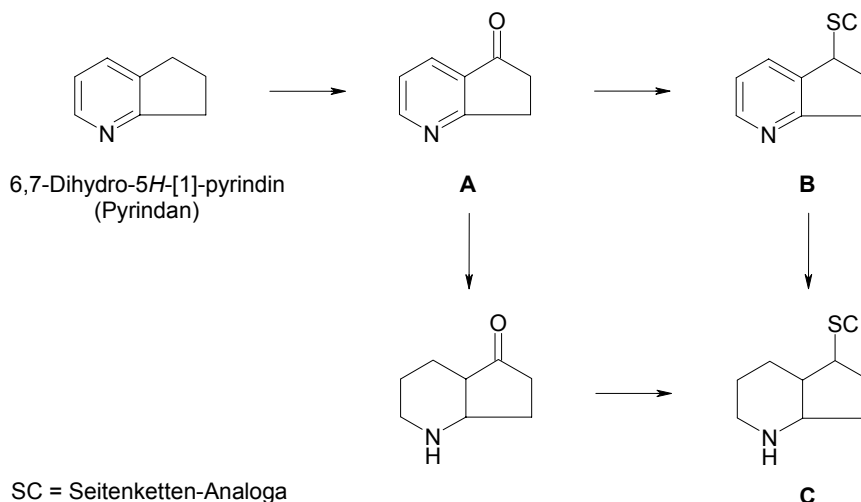


Abb. 35: Geplanter Syntheseweg ausgehend vom Pyrindan

Durch Hydrierung sollte das aromatische Pyridin in das voll gesättigte Pyridin **C** überführt werden. Somit wäre wegen der stärkeren Basizität des resultierenden sekundären bzw. tertiären Amins eine vollständige Protonierung des Stickstoffs unter physiologischen pH und eine optimale HEI-Imitation gewährleistet.

Parallel dazu sollten Perhydro-Derivate auch auf anderen Wegen synthetisiert werden. Da viele Ring-A/B-Substituenten (R und R') von *Burbiel* und *Salman* über das in Abb. 33 gezeigte Lactam eingeführt wurden, sollte ein analoges Lactam **D** allerdings ohne Seitenkette und anguläre Methylgruppe synthetisiert werden. Im Anschluß sollten Substituenten eingefügt werden, die sich als positiv für die antimykotische Wirkung dieser Substanzen erwiesen hatten (Abb. 36). Somit wäre ein direkter Vergleich der vereinfachten Struktur **E** mit der bekannten Azasecoosteroid-Struktur von *Burbiel* und *Salman* möglich.

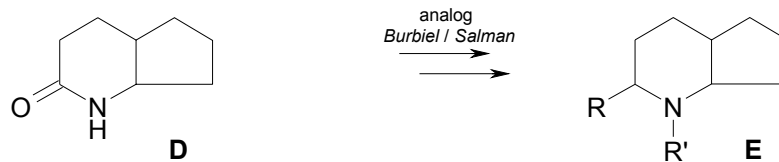


Abb. 36: 2-Oxo-octahydro-pyridine

Ferner sollte untersucht werden, wie sich die Einfügung der dem C-18 des Sterolgrundkörpers (vgl. Abb. 3) entsprechenden Methylgruppe auf die Aktivität der Pyridine auswirkt. Um sich weiter an den natürlichen Sterol-Grundkörper anzunähern, sollten Methoden erarbeitet werden, den Pyridin-Grundkörper mit einer angulären Methylgruppe und einer Ketogruppe für die Einführung von Mimikry der Sterol-Seitenkette (R^1) zu versehen (Typ **F**) und diesen mit geeigneten Methoden zu funktionalisieren. Außerdem bot es sich an, zusätzlich ein Oxolactam vom Typ **G** herzustellen, so daß man neben den Funktionalisierungsmöglichkeiten der Ketogruppe (R^1 = Seitenketten-Mimikry) und des Amins (R^2 = Ring-A/B-Analoga) zusätzlich eine weitere Einführungsmöglichkeit für Ring-A/B-imitierende Substituenten (R^3) erhält.

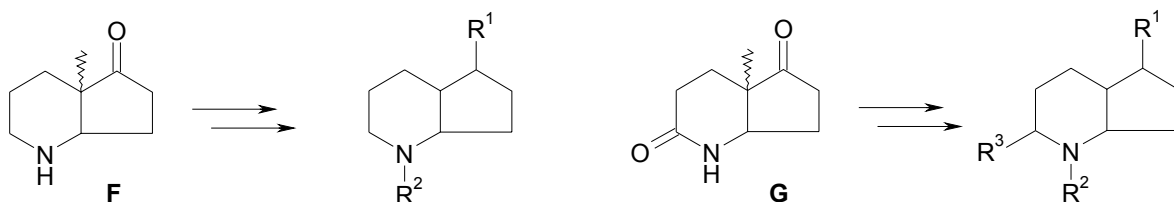


Abb. 37: 5-Oxo- und 2,5-Dioxo-4a-methyl-octahydro-[1]-pyridine

Durch diese sukzessive Annäherung ausgehend vom einfachen Pyridin bzw. von einfachen Pyridinen an die strukturellen Gegebenheiten bei Burbiels und Salmans Sterolbiosynthese-Inhibitoren sollte abgeklärt werden, ob es möglich ist, ausgehend von billigen, kommerziell erhältlichen Edukten in möglichst wenigen Syntheseschritten zu SBIs von vergleichbarer Aktivität zu gelangen.

3 Präparativ-chemischer Teil

3.1 6,7-Dihydro-5H-[1]-pyrindine

Obwohl *Daabs* Pyrindine, insbesondere die mit *N*-Arylethylrest, theoretisch bereits die Ringe A, C und D des Sterolgrundgerüsts abdecken, handelt es sich bei ihnen eindeutig nicht um SBIs. Grund hierfür könnte unter anderem das Fehlen einer lipophilen Seitenkette sein. Wie bereits in der Einleitung bemerkt, ist neben einem basischen Stickstoff oder einer Ammoniumgruppe das Vorhandensein dieser (lipophilen) Seitenkette offensichtlich essentiell.^{29, 30}

Ein anderer Grund für den fehlenden Einfluß von *Daabs* Pyridinderivaten auf die Ergosterol-Biosynthese könnte in der Aromazität der Pyridinringes liegen. Dieser ist im Gegensatz zum Ring C des Sterolgrundgerüsts planar und wird als schwache Base bei physiologischem pH-Milieu nicht in ausreichendem Maße protoniert. Voraussetzung für eine Anwendung der Pyridine als HEI-Analoga wäre also eine *N*-Quarternisierung um so eine ständige positive Ladung in das Molekül zu bekommen.

Trotzdem ist das 6,7-Dihydro-5H-[1]-pyrindin eine interessante Ausgangsverbindung für die Synthese neuartiger SBIs, da es sich durch Hydrierung in den vermutlich geeigneten Baustein Octahydro-1H-pyrindin überführen lassen sollte. Dieser würde als nicht aromatische Verbindung mit basischem Stickstoff theoretisch wieder alle Voraussetzungen für ein potentiell Mimikry erfüllen.

3.1.1 Darstellung von 6,7-Dihydro-5-oxo-5H-[1]-pyrindin

Um Pyridan in Position 5 mit einem Seitenkettenäquivalent zu substituieren, ist das Einfügen einer entsprechenden funktionellen Gruppe nötig. Als ideal ist hier die Carbonylgruppe anzusehen, da über sie mit Hilfe von Standardreaktionen theoretisch eine Vielzahl von sterolähnlichen Seitenketten in das Molekül eingefügt werden könnte.

Ausgangssubstanz war das käufliche 6,7-Dihydro-5H-pyrindin (Pyridan). 1991 gelang *Caprathe* et al. eine Oxidation dieser Verbindung unter Verwendung von Chrom-(VI)-oxid, Essig- und Schwefelsäure bei 0 °C. Die unter diesen Bedingungen resultierende Substanz beschrieben die Autoren jedoch als instabil und nicht analysenrein.³⁸

Abweichend von dieser Methode gelang in der vorliegenden Arbeit die Umsetzung bei Raumtemperatur mit *tert.*-Butanol, Magnesiumsulfat und Kaliumpermanganat als Oxidationsmittel.³⁹ Die Literatur beschreibt für diese Reaktionsbedingungen die selektive Oxidation von *meta*-ständigen Alkylgruppen an Pyridinen. Der resultierende grau-violette Feststoff war für sämtliche Analysemethoden stabil genug und konnte eindeutig als das gewünschte Keton **11** identifiziert werden.



Abb. 38: Oxidation von Pyridan zur 5-Ketoverbindung

3.1.2 Darstellung von Seitenkettenanaloga: Die Strategie

Die nun im Molekül neu vorhandene Carbonylgruppe eröffnet ein weites Spektrum an möglichen Folgereaktionen. Dabei sollte ein potentieller Substituent primär zwei Voraussetzungen erfüllen. Das wäre zum einen ein ähnliches räumliches Volumen wie die am Fecosterol, dem natürlichen Substrat der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase, vorhandene Seitenkette. Zum anderen sollte dieser neue Substituent eine dieser Seitenkette entsprechende Lipophilie haben. Seitenkettenverzweigungen wie im Fecosterol (Abb. 39) sollten hierbei in den meisten Fällen erst einmal vernachlässigt werden.

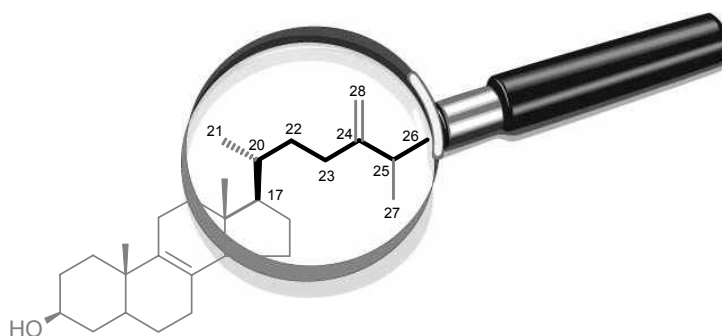


Abb. 39: Das "natürliche" Vorbild: **Fecosterol**

Der naheliegende Schritt wäre die Verknüpfung mit einer Alkylkette aus 6 Kohlenstoffatomen unter Bildung einer C-C-Verknüpfung. Hierbei bieten sich einige allgemein gebräuchliche Synthesemöglichkeiten an.

3.1.3 Die Wittig-Reaktion

Bei der Totalsynthese von 24,24-Difluoro-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, der biologisch aktiven Form von Vitamin D₃, wurde von *Konno* et al. bei der Seitenkettensynthese Ethylidientriphenylphosphoran eingesetzt, um aus dem Keton in Position 17 des Sterolgerüsts ein Olefin darzustellen und damit die Kohlenstoffatome der Positionen 20 und 21 einzuführen.⁴⁰

Vorteile dieser Methode liegen zum einen in der selektiven Darstellung des Z-Olefins, so daß in den folgenden Syntheseschritten die Kette unter Erzeugung der korrekten Stereochemie an C-20 verlängert werden kann. Zum anderen erhält man die stereochemisch mit dem Fecosterol übereinstimmende Methylverzweigung in Position 21 (Abb. 40).

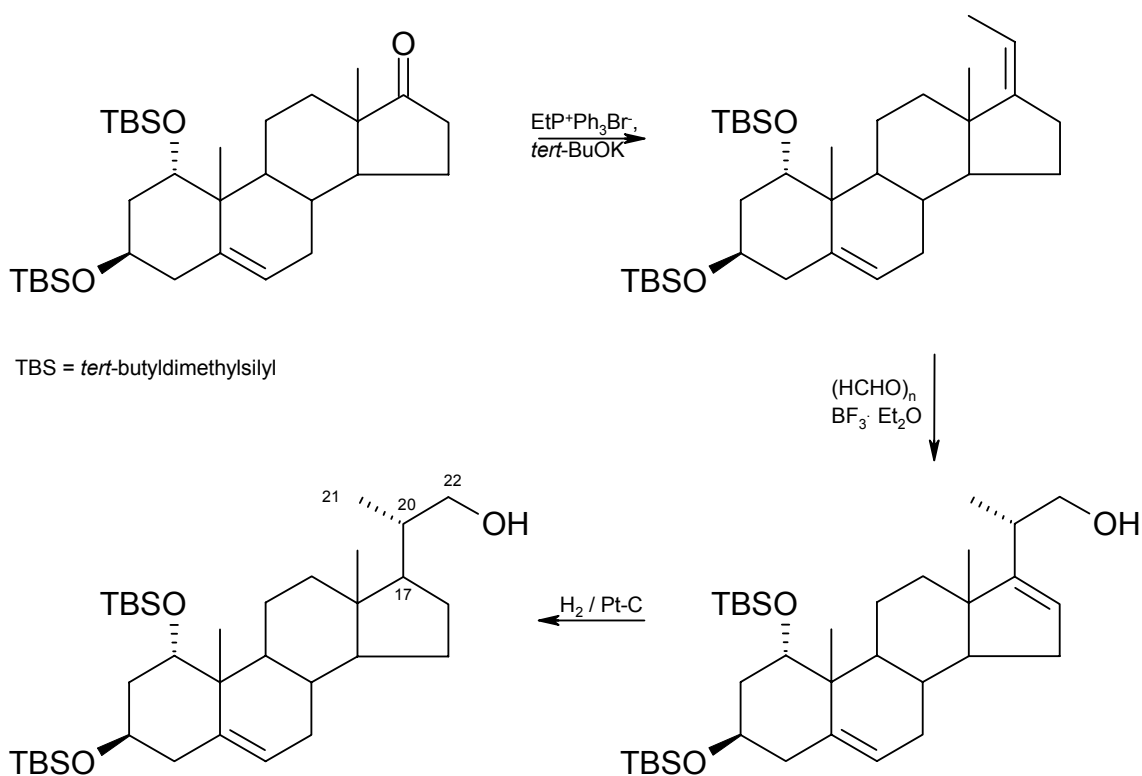


Abb. 40: Erste Schritte einer Seitenkettensynthese (nach *Konno* et al.)

Obwohl bei dieser Strategie die Seitenkette entgegen der ursprünglichen Zielsetzung in mehreren Schritten aufgebaut wird, ist der Alkohol in Position 22, speziell nach einer Oxidation zum Aldehyd, für die weitere Umsetzung höchst interessant. Dies zeigt unter anderem die Arbeit von *Gans* aus unserer Arbeitsgruppe, der, ausgehend von einem Aldehyd in Position 22, verschiedene antimykotisch wirksame Seitenkettenazasteroide synthetisiert hat.²⁴

Entsprechend Literatur⁴⁰ wurde **11** in THF mit Ethyltriphenylphosphoniumbromid und Kalium-*tert.*-butoxid umgesetzt.

Das dabei gebildete Olefin **12** wurde hinsichtlich der stereochemischen Anordnung seiner terminalen Methylgruppe untersucht. Aufschluß darüber konnte ein NOE-Experiment geben. Bei Einstrahlung der Resonanzfrequenz bei $\delta = 7.62$ ppm (4-H) steigt wie in Abb. 41 dargestellt, die relative Intensität der Signale $\delta = 7.04$ ppm (3-H) und $\delta = 6.04$ ppm (8-H), so daß man für das Olefin die *E*-Konfiguration postulieren kann.

Obwohl damit eine mögliche Kettenverlängerung ein Produkt mit der falschen Konfiguration an der dem C-20 entsprechenden Kohlenstoffatom liefern sollte, wurde die Verbindung in Anlehnung an die Vitamin D₃-Synthese (Abb. 40) mit Paraformaldehyd und Bortrifluoridetherat weiter umgesetzt.

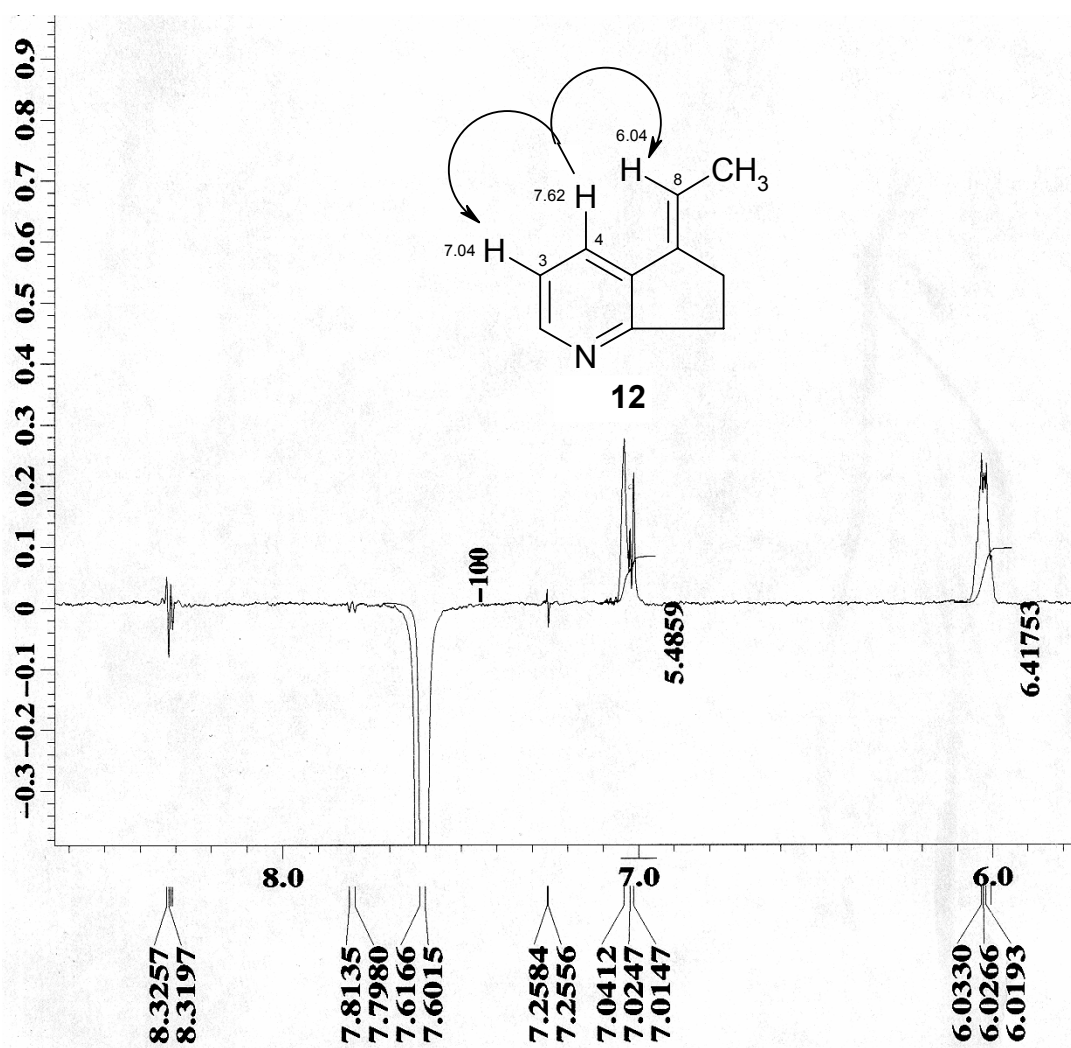


Abb. 41: NOE-Differenz-Spektrum von **12**

Im Hinblick auf die ursprüngliche Synthesepanung verliefen diese Ansätze allerdings erfolglos, eine Umsetzung zum gewünschten Alkohol blieb aus. Unter der Annahme, daß die Lewis-Säure Bortrifluoridetherat durch das freie Elektronenpaar des Pyridinstickstoffs als Lewis-Base „verbraucht“ wird, wurde die Konzentration von 0.1 Äquivalenten auf 8.0 Äquivalente erhöht.

Statt des gewünschten Alkohols entstand unter diesen Bedingungen jedoch eine neuartige Verbindung **13**, die sich jedoch als äußerst instabil erwies. Trotzdem gelang eine Strukturaufklärung mittels NMR, die durch die massenspektroskopischen Ergebnisse bestätigt wurde (Abb. 43).

Bei dem Produkt handelt es sich um ein 2-Oxo-8-aza-fluoren, einen bisher noch nicht beschriebenen Heterocyclus (Abb. 42).

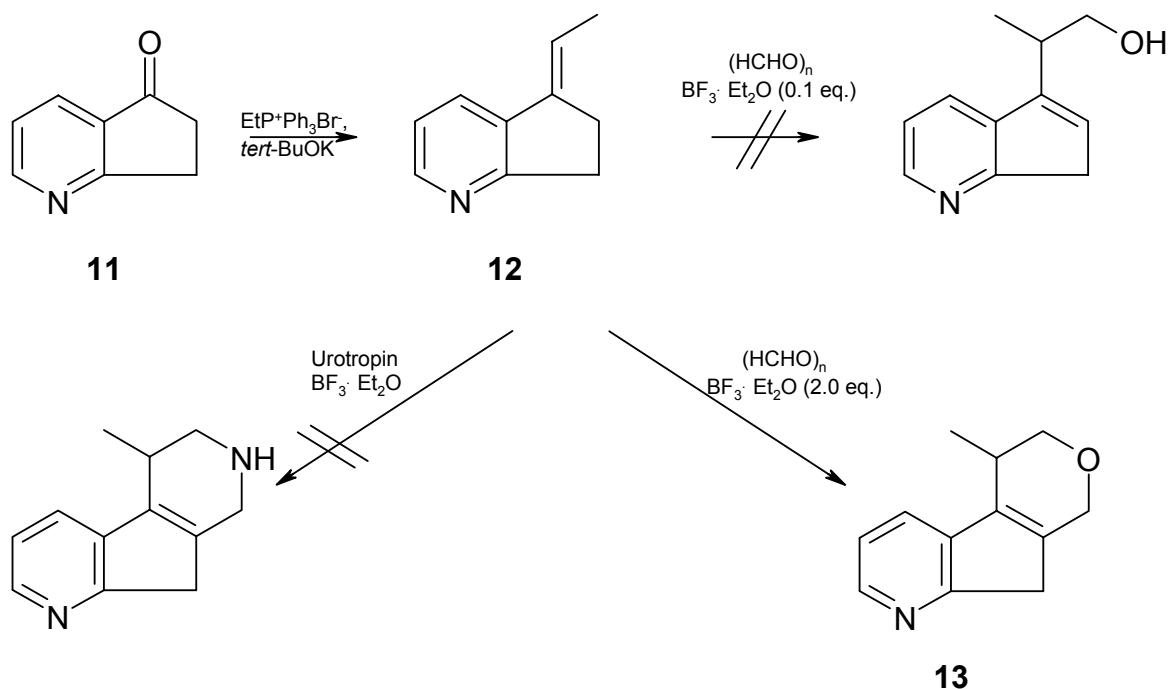


Abb. 42: Wittig-Reaktion und Folgereaktionen

Beflügelt durch diese Ergebnisse wurden abseits von der Thematik „Seitenkettensynthese“ einige Versuche unternommen, analog einen Diazafluorengrundkörper zu synthetisieren indem der Paraformaldehyd durch Urotropin ersetzt wurde, leider jedoch ohne Erfolg.

Das angestrebte Ziel der „einfachen“ Synthese einer Seitenkette auf die in Abb. 40 skizzierte Weise, konnte trotz zahlreicher Veränderungen der Reaktionsbedingungen leider nicht erreicht werden.

Das auf dieser Seite dargestellte Spektrum wurde mit der *HMQC-Technik (Hetero Multi-Quantum Correlation)* aufgenommen und zeigt die $^1J_{CH}$ -Kopplungen als cross-peaks. Es ermöglicht auf diese Weise eine Zuordnung von ^{13}C - und 1H -Signalen.

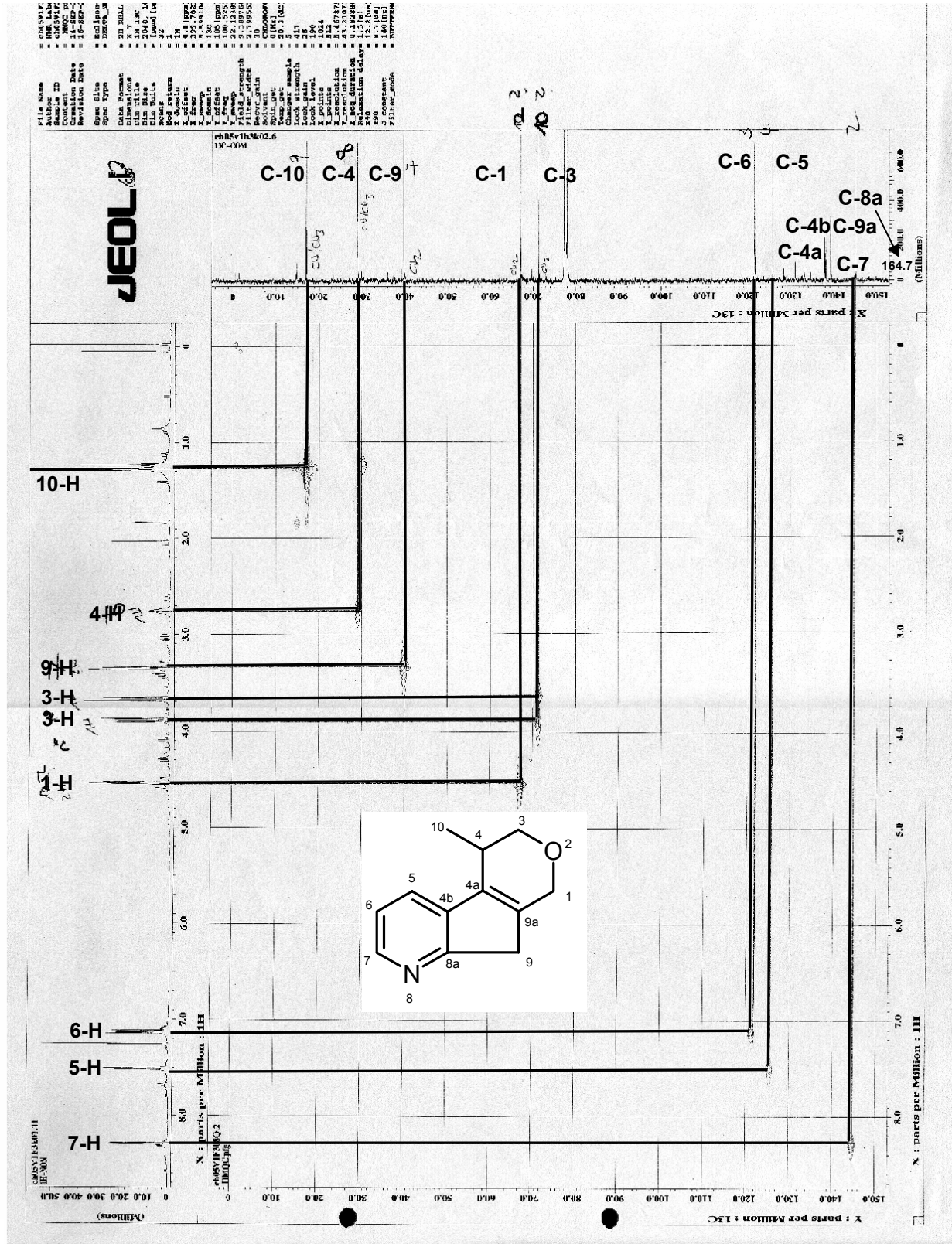


Abb. 43: HMQC-Spektrum von 13

Unter Verwendung von Hexyltriphenylphosphoniumbromid, dessen Herstellung aus 1-Bromhexan in Kapitel 3.3.5 noch beschrieben wird, sollte als nächstes die bei **12** erfolgreich durchgeführte *Wittig*-Reaktion mit einem C-6-Körper wiederholt und somit in einem Schritt eine reine Alkylseitenkette dargestellt werden. Es gelang jedoch mit Kalium-*tert.*-butoxid in THF nicht, das gewünschte Olfin darzustellen. Auch mit Natriumhydrid (60%ige Suspension in Paraffinöl) in DMSO⁶¹ war keinerlei Umsetzung zu beobachten.

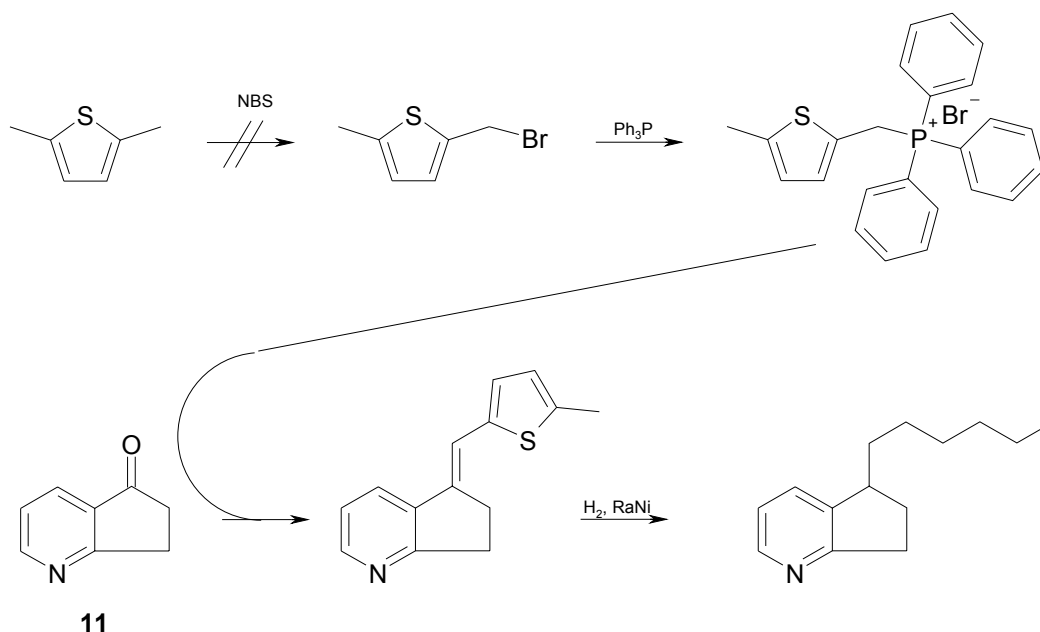


Abb. 44: Die „Thiophen-*Wittig*“-Strategie

Anstelle von 1-Bromhexan wurde deshalb 2-Brommethyl-5-methylthiophen mit Triphenylphosphan zum entsprechenden Phosphoniumsalz umgesetzt. Das daraus herzustellende benzyliche Phosphoran sollte reaktiver sein als das Hexylidenphosphoran. Der Trick dieser Strategie besteht in einer geplanten, auf die *Wittig*-Reaktion folgende Hydrierung des Vinylthiophensubstituenten zur Hexylkette mittels Raney-Nickel unter reduktiver Entschwefelung.

Der erste Schritt, die Monobromierung von 2,5-Dimethylthiophen zu 2-Brommethyl-5-methylthiophen, ist literaturbekannt.⁴¹ Hierbei wird das Edukt mit *N*-Bromsuccinimid in Chloroform auf 60 °C erhitzt. Anschließend wird das entstandene Succinimid abfiltriert und das Monobromderivat von anderen entstandenen Produkten per FSC abgetrennt.

Nach Durchführung der Reaktion zeigten sich bei einer Umsatzkontrolle mittels GC-MS mehrere Produkte gleicher und unterschiedlicher Massen (Abb. 45).

Theoretische Strukturmöglichkeiten für die entsprechenden Peaks sind in Tabelle 2 aufgeführt. Das gewünschte monobromierte Derivat hat die theoretische Masse von 191, wie auch der Hauptpeak im dargestellten Chromatogramm. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung wurde dieses Hauptprodukt kernresonanzspektroskopisch genauer untersucht.

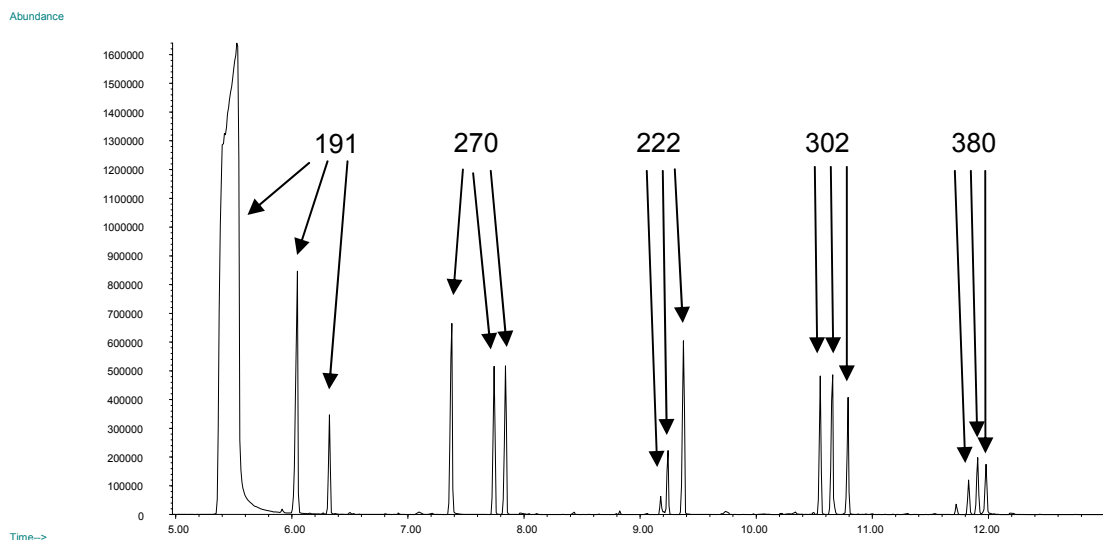


Abb. 45: Gaschromatogramm nach der Bromierung von 2,5-Dimethylthiophen mit Angabe der Molmassen der einzelnen Peaks

Masse 191	Monobromiertes Dimethylthiophen		<table border="1"> <tr><td>R₁</td><td>R₂</td></tr> <tr><td>H</td><td>Br</td></tr> <tr><td>Br</td><td>H</td></tr> </table>	R ₁	R ₂	H	Br	Br	H										
R ₁	R ₂																		
H	Br																		
Br	H																		
Masse 270	Dibromiertes Dimethylthiophen		<table border="1"> <tr><td>R₁</td><td>R₂</td><td>R₃</td></tr> <tr><td>H</td><td>Br</td><td>Br</td></tr> <tr><td>Br</td><td>H</td><td>Br</td></tr> <tr><td>Br</td><td>H</td><td>Br</td></tr> </table>	R ₁	R ₂	R ₃	H	Br	Br	Br	H	Br	Br	H	Br				
R ₁	R ₂	R ₃																	
H	Br	Br																	
Br	H	Br																	
Br	H	Br																	
Masse 222	„Dimer“																		
Masse 302	Monobromiertes „Dimer“		<table border="1"> <tr><td>R₁</td><td>R₂</td></tr> <tr><td>H</td><td>Br</td></tr> <tr><td>Br</td><td>H</td></tr> </table>	R ₁	R ₂	H	Br	Br	H										
R ₁	R ₂																		
H	Br																		
Br	H																		
Masse 380	Dibromiertes „Dimer“		<table border="1"> <tr><td>R₁</td><td>R₂</td><td>R₃</td><td>R₄</td></tr> <tr><td>H</td><td>Br</td><td>Br</td><td>H</td></tr> <tr><td>Br</td><td>Br</td><td>H</td><td>H</td></tr> <tr><td>Br</td><td>H</td><td>H</td><td>Br</td></tr> </table>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	H	Br	Br	H	Br	Br	H	H	Br	H	H	Br
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄																
H	Br	Br	H																
Br	Br	H	H																
Br	H	H	Br																

Tabelle 2: Theoretische Produktmöglichkeiten der Thiophenbromierung gem. GC-MS

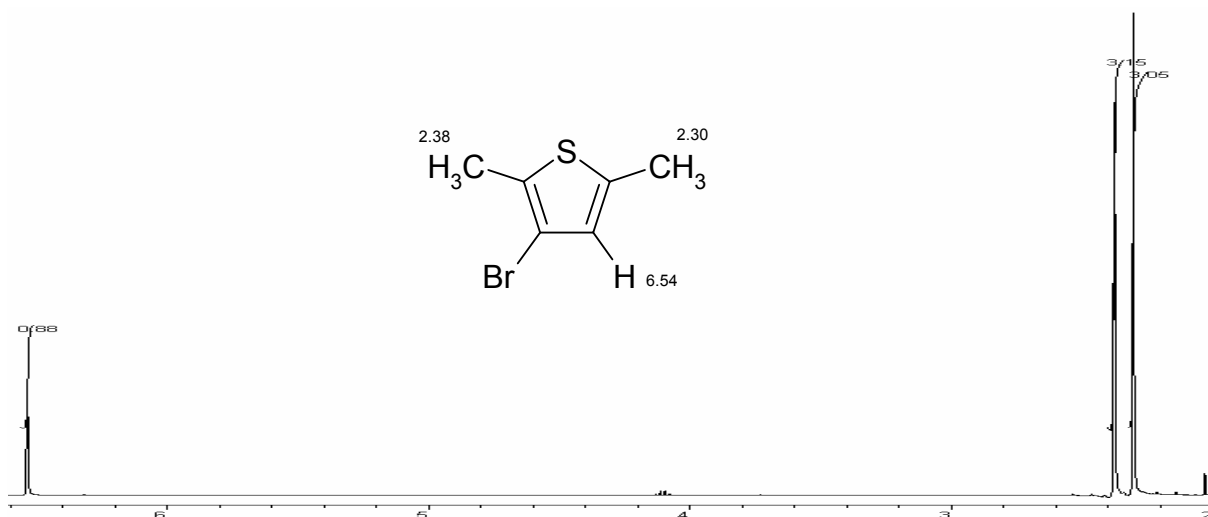


Abb. 46: ^1H -NMR-Spektrum des Hauptproduktes mit Masse 191

So zeigt das ^1H -NMR-Experiment zwei Singulett mit einer Integration von je 3 Protonen bei 2.14 und 2.19 ppm, aber nur ein Singulett mit der Integration 1 H im Aromatenbereich (Abb. 46). Man muß daher leider festhalten, daß unter den genannten Reaktionsbedingungen der Thiophenkern anstelle eines Methylsubstituenten bromiert wurde.

Da es nicht möglich war, einen der anderen Kandidaten mit Masse 191 mit akzeptablen Ausbeuten zu isolieren, wurde die Möglichkeit, die 5-Carbonylgruppe des Dihydropyridins mittels *Wittig*-Reaktion zu substituieren, fallengelassen und zu anderen Methoden übergegangen.

3.1.4 Hydroborierung

Ein weiterer Versuch, eine reine Kohlenstoffseitenkette aufzubauen, bestand in der Hydroborierung des in Kapitel 3.1.3 dargestellten Olefins **12**. Hierzu wurde die Verbindung bei 0 °C in THF gelöst und mit einer äquimolaren Menge 9-Borbi-cylo[3.3.1]nonan (9-BBN) versetzt.⁴²

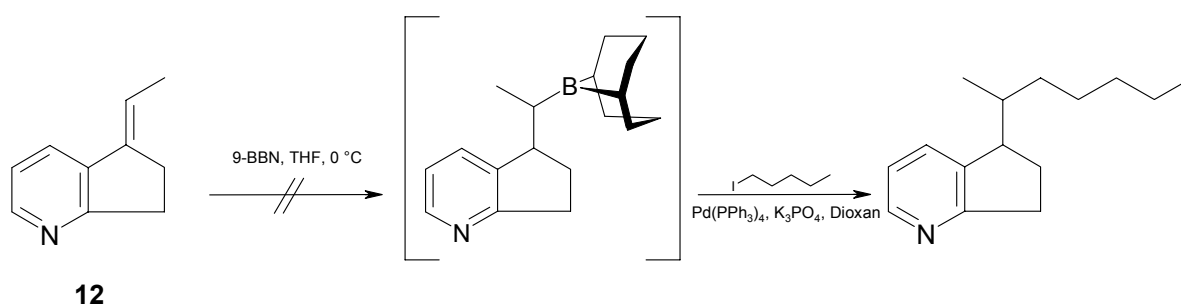


Abb. 47: Geplanter Verlauf der Hydroborierung von **12**

Nachdem das Gemisch über Nacht gerührt hatte, sollte das so erzeugte Trialkylboran

weitere 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt unter Palladium(0)-Katalyse in Gegenwart von Kaliumphosphat eine Verknüpfung mit Iodpentan eingehen. Leider konnte aus dem Ansatz nur das eingesetzte Edukt **12** isoliert werden (Abb. 47).

3.1.5 Die Grignard-Reaktion

Die Umsetzung von organometallischen Reagenzien mit Carbonylverbindungen ist eine in der präparativen Chemie seit langem gebräuchliche Methode zur Darstellung neuer C-C-Bindungen. Dabei greift das an das Metall gebundene, negativ polarisierte Kohlenstoffatom der Grignard-Verbindung das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe nucleophil an. Bei Ketonen entstehen so tertiäre Alkohole, die unter anschließendem Mineralsäurezusatz leicht dehydratisiert werden können.

Genau diese nach seinem Entdecker Victor Grignard benannte Reaktion wurde mit Pyrindanon **11** durchgeführt (Abb. 48).

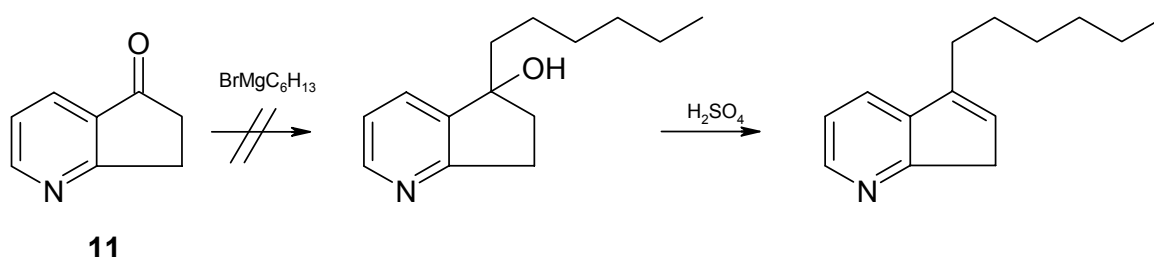


Abb. 48: Die Grignard-Strategie

Dabei wurde zunächst die Organomagnesium-Verbindung aus Magnesiumspänen und 1-Bromhexan in Diethylether synthetisiert. Anschließend wurde eine äquimolare Menge **11** in Diethylether zugetropft und 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach Aufarbeitung des Ansatzes konnte jedoch nur das Edukt wiedergewonnen werden. Modifikationen der Reaktion wurden im Gegensatz zu **11** nur an zeitgleich bearbeiteten Grundkörpern **29/30** und **53**, die an spätere Stelle dieser Arbeit beschrieben werden, durchgeführt, da deren Strukturen für eine antimykotische Wirkung als viel versprechender angesehen wurden.

3.1.6 Synthese von 5-Amino-6,7-dihydro-5H-[1]-pyrindin-Derivaten

Nachdem die ersten Versuche zur Darstellung einer reinen Kohlenstoffseitenkette, also der Ausbildung einer neuen C-C-Bindung erfolglos blieben, wurde die Synthesepanung dahingehend verändert, auch Heteroatome als Bindungsglieder zwischen Grundgerüst und Seitenkette zuzulassen.

Interessant ist die Einführung einer Alkylamino-Gruppe und damit eines Stickstoffatoms in der Position 20 des Sterolgrundgerüsts. Eine solche Verbindung könnte einerseits wegen ihres Pyrindin-Stickstoffs das HEI der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Reaktion imitieren, wäre aber potentiell auch in der Lage carbokationische Intermediate während der Cyclisierungsreaktion von Squalenepoxid zu Lanosterol zu imitieren. Wie Abb. 5 zeigt, tritt genau an der Stelle des Stickstoffs beim Protosterol-Kation ein positiv geladenes Zwischenprodukt auf. Der Stickstoff eines sekundärenamins ließe sich darüber hinaus leicht methylieren, so daß man eine Seitenkettenverzweigung (Position 21) gleich mit dargestellt hätte.

Ein selektives Verfahren zur Darstellung von Aminen aus Ketonen ist die *reduktive Aminierung*. Dabei kondensieren Carbonylverbindungen mit Aminen zu Iminen, die sich durch geeignete Reaktionsbedingungen bzw. nach Hydrierung weiter zu Aminen umsetzen lassen. Dabei ist die Selektivität des Reduktionsmittels ausschlaggebend für den Erfolg der Reaktion.

Ein besonders selektives Verfahren wurde von *Kim* et al. beschrieben.⁴³ Dabei wird neben Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel wasserfreies Zinkchlorid eingesetzt. Durch den Zusatz der Lewis-Säure wird die Selektivität erhöht.

Der Synthesepfad sah also vor, daß das Pyrindanon **11** über reduktive Aminierung zu einem sekundären Amin umgesetzt und anschließend zum tertiären Amin methyliert wird (Abb. 49).

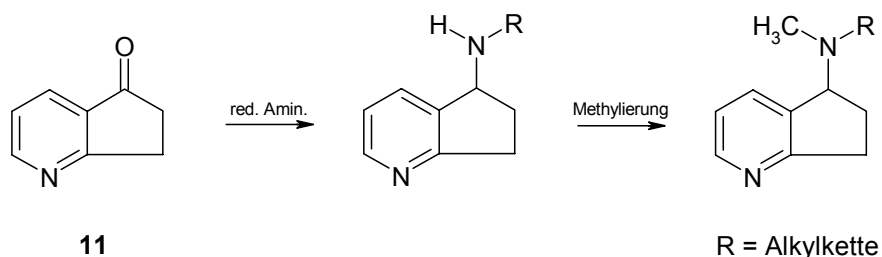


Abb. 49: Reduktive Aminierung von **11**

Die Umsetzung zum sekundären Amin **14** mit Pentylamin gelang auf zwei Wegen (Abb. 50). Zum einen bei pH 6 (methanolische HCl) in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid über 72 Stunden bei Raumtemperatur (Ausbeute 48%). Zum anderen mit demselben Reduktionsmittel unter Zuhilfenahme von Zinkchlorid über 3 Stunden bei Raumtemperatur (Ausbeute 45%). Die anschließende *N*-Methylierung des sekundären Amins **14** mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid bei pH 6 zum tertiären Amin **15** ließ sich ebenfalls in guter Ausbeute (56%) durchführen.

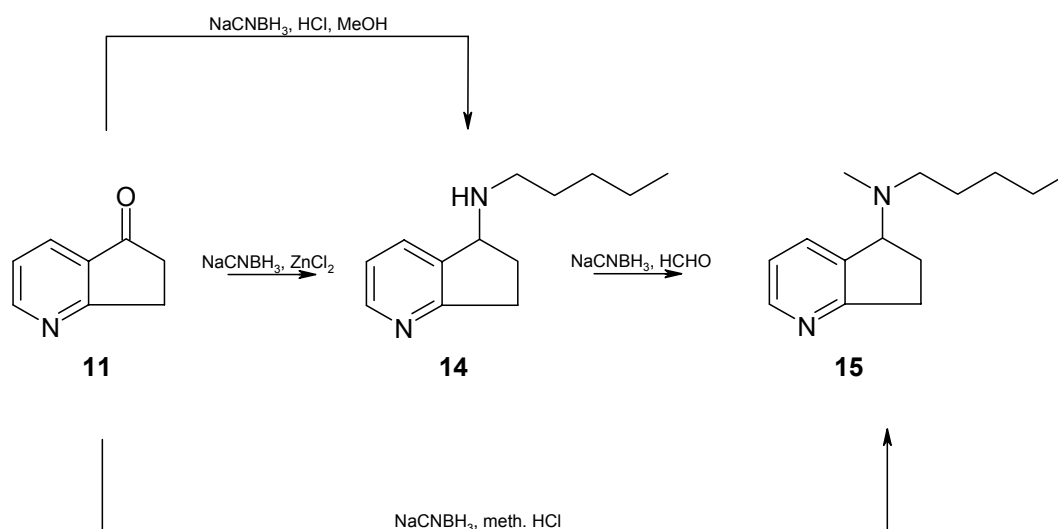


Abb. 50: Synthese von **14** und anschließender *N*-Methylierung zu **15**

Das tertiäre Amin **15** war auch direkt durch reduktive Aminierung von **11** mit *N*-Methylpentylamin in 45% Ausbeute zugänglich (Abb. 50).

Neben der *N*-Pentylkette wurden auf diese Weise zwei weitere Seitenketten eingeführt. Dabei wurden die letzten 3 Kohlenstoffatome durch einen voluminöseren Phenylring ersetzt. Dieser sollte die Verzweigungen am Ende der Orginalkette besser imitieren (Abb. 39). Neben dem unsubstituierten Phenylethylaminderivat **16** wurde auch ein *para*-Methoxyderivat **17** synthetisiert (Abb. 51).

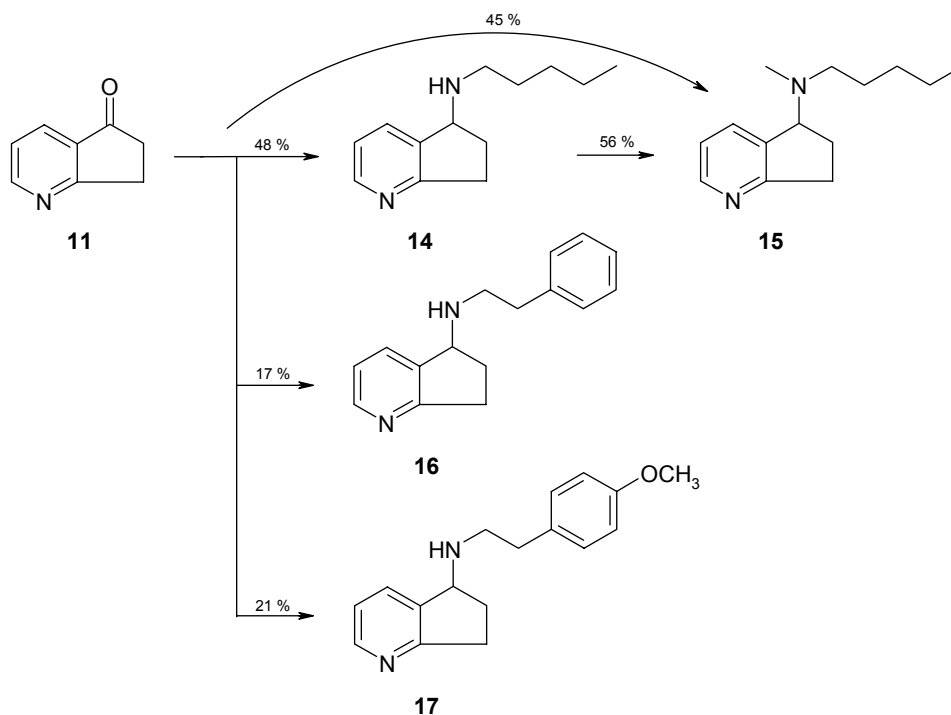


Abb. 51: Aminoseitenketten-Derivate

3.1.7 Ring A/B-Analoga

Das bereits von *Daab* synthetisierte und antimikrobiell aktive *N*-(2-Phenylethyl)-6,7-dihydro-5*H*-pyrindiniumperchlorat **18** sollte durch *N*-Phenylethylierung von **11** nachgekocht und nach einer Oxidation an Position 5 über reduktive Aminierung mit einer Seitenkette versehen werden. Doch wie in der Literatur konnte auch bei der *N*-Alkylierung nur eine leidliche Umsetzung (24 %) beobachtet werden. Trotz Schutzmaßnahmen (Lichtschutz, Raumtemperatur, Schutzgasatmosphäre) färbte sich die Lösung auch in diesem Fall schwarz. Die anschließende Oxidation von **18** wurde nicht mehr durchgeführt.

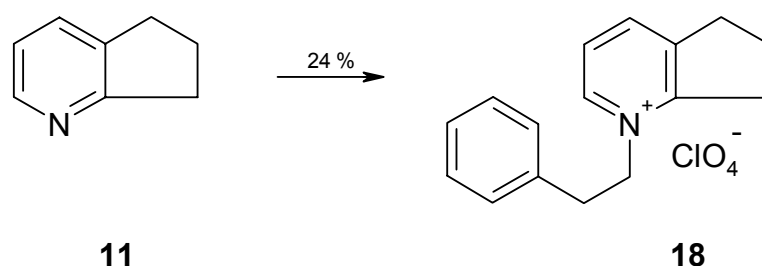


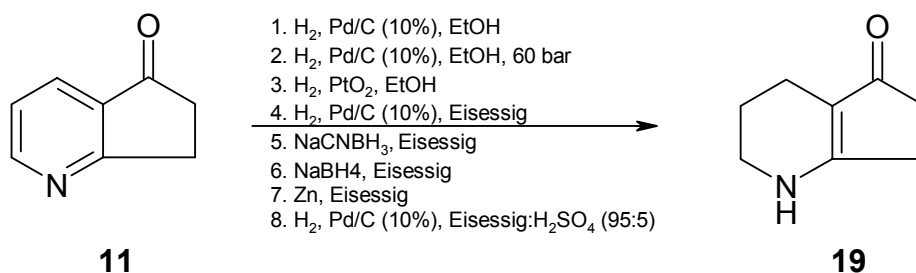
Abb. 52: *N*-Phenylethylierung von Pyrindan

3.1.8 Umsetzung zu 5-substituierten Octahydro-[1]-pyrindinen

Ursprünglich sollte **18** in Folgereaktionen (Oxidation der Position 5 bzw. Hydrierung) weiter umgesetzt werden. Da die *N*-Alkylierung des Pyrindan-Stickstoffs nur in unbefriedigen Ausbeuten gelang, wurde versucht das Pyrindan mittels Hydrierung in Octahydropyridin zu überführen, dessen Stickstoff wesentlich einfacher zu alkylieren wäre.

Dazu wurde das bereits oxidierte Pyridanon **11** in Ethanol gelöst, mit Hydrierkatalysator (Palladium auf Aktivkohle 10 %) versehen und unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Im Gegensatz zu den *Daabs* 5-unsubstituierten Pyrindinen, die sich auf diese Weise problemlos hydrieren ließen, war es hier jedoch nicht möglich, den aromatischen Teil von **11** vollständig zu sättigen. Auch unter Hochdruckbedingungen (60 bar) gelang dies mit denselben Reagentien nicht.

Grund hierfür ist die Ausbildung des äußerst stabilen vinylogenen Säureamids **19**. Auch ein Katalysatorwechsel (Platin-IV-oxid anstatt Palladium) brachte nicht den erwünschten Erfolg.

Abb. 53: Das vinyloge Säureamid **19**

Um das vinyloge System zu stören, wurde anschließend dazu übergegangen, den Stickstoff mittels Eisessig zu protonieren. Dieser Lösungsmittelwechsel brachte jedoch genauso wenig wie die Verwendung von Natriumcyanoborhydrid, Natriumborhydrid bzw. Zinkstaub (jeweils in Eisessig). Selbst unter „verschärften“ Lösungsmittelbedingungen (Eisessig/konzentrierte Schwefelsäure 95:5) wurde wieder nur **19** erhalten (Abb. 53).

Um die Vinylogie-Problematik zu umgehen, sollten als nächstes die 5-aminieren Verbindungen **14** und **16** mittels Hydrierung in die entsprechenden Octahydro-[1]-pyrindine überführt werden, da bei ihnen die Ladungsverteilung aufgrund fehlender Konjugation nicht möglich ist.

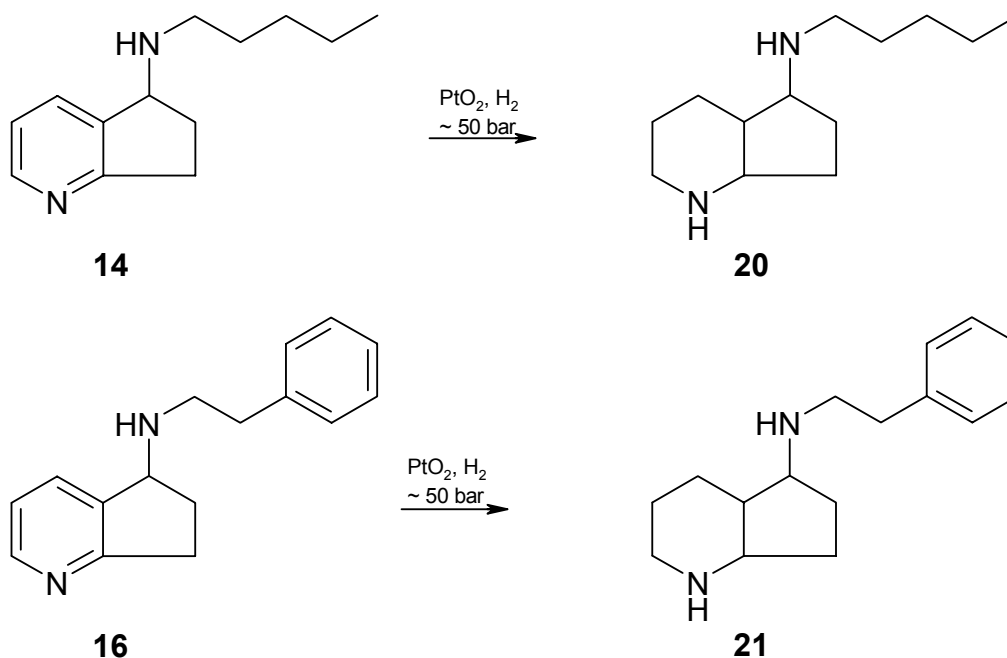


Abb. 54: Darstellung von Octahydro-[1]-pyrindinen

Beide Verbindungen wurden über Nacht bei ~ 50.0 bar mit Platin(IV)oxid als Katalysator hydriert. In beiden Fällen entstand ein komplexes Isomerengemisch. Für **20** und **21** lassen sich daher auch bei der Interpretation der NMR-Spektren

hinsichtlich der Lage der ^1H - bzw. ^{13}C -Signale keine eindeutigen Zuordnungen treffen. Masse und Hochauflösende Masse beweisen jedoch, daß die Verbindungen auch tatsächlich entstanden sind.

Sie unterscheiden sich von den später vorgestellten Verbindungen **37** und **39** (Kapitel 3.3.7) nur durch das Fehlen der angulären Methylgruppe.

3.2 2-Oxo-octahydro-[1]-pyrindine

In Anlehnung an die Verbindungen von *Salman* sollte als nächster zentraler Baustein ein Octahydro-[1]-pyrindin-Grundkörper synthetisiert werden. Dieser enthält anstelle des 7-Rings einen 6-Ring, allerdings (noch) ohne Seitenkette und anguläre Methylgruppe. Auf diese Weise sollte in Erfahrung gebracht werden, ob die in der Literatur oft zitierte Unabdingbarkeit einer Seitenkette für die Wirkung als Ergosterol-Biosynthese-Inhibitor auch wirklich zutrifft. Auf eine stereoselektive Synthese sollte hierbei zunächst verzichtet werden, da die Entstehung von Isomergemischen eher als Vorteil angesehen wurde. Bei einer positiven Wirkung sollte das wirksame Stereoisomer später durch chromatographische Trenntechniken isoliert und identifiziert werden.

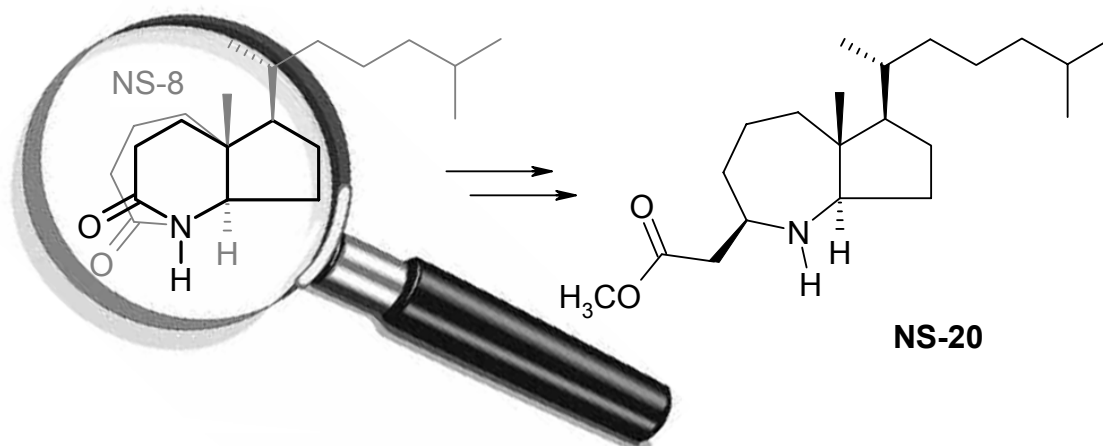


Abb. 55: *Salman's* Azasecosteroidester als Leitstruktur

Mit Hilfe des bereits erwähnten Testsystems konnte **NS-20** als besonders effektiver $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Hemmstoff identifiziert werden. Die in Position 2 mit einem Methoxycarbonylmethyl-Rest substituierte Verbindung wurde für die weitere Syntheseplanung als Leitstruktur herangezogen.

Da auch *Salman's* Synthese von einem Lactam ausgeht, wurde als

Ausgangsverbindung für die anvisierten Octahydro-[1]-pyrindine ebenfalls eine 2-Oxo-Verbindung angestrebt (Abb. 55).

3.2.1 Darstellung des Lactams

Bei der folgenden Synthese wurde Pyrrolidino-1-cyclopenten analog Literatur⁴⁴ zum ungesättigten Lactam **22** und weiter in das bereits bekannte Lactam **23** überführt (Abb. 56).

Dabei wird in einem ersten Schritt das käufliche Pyrrolidino-1-cyclopenten unter Rückfluß mit Acrylsäureamid umgesetzt. Dabei wird das Enamin in einer *Michael-*

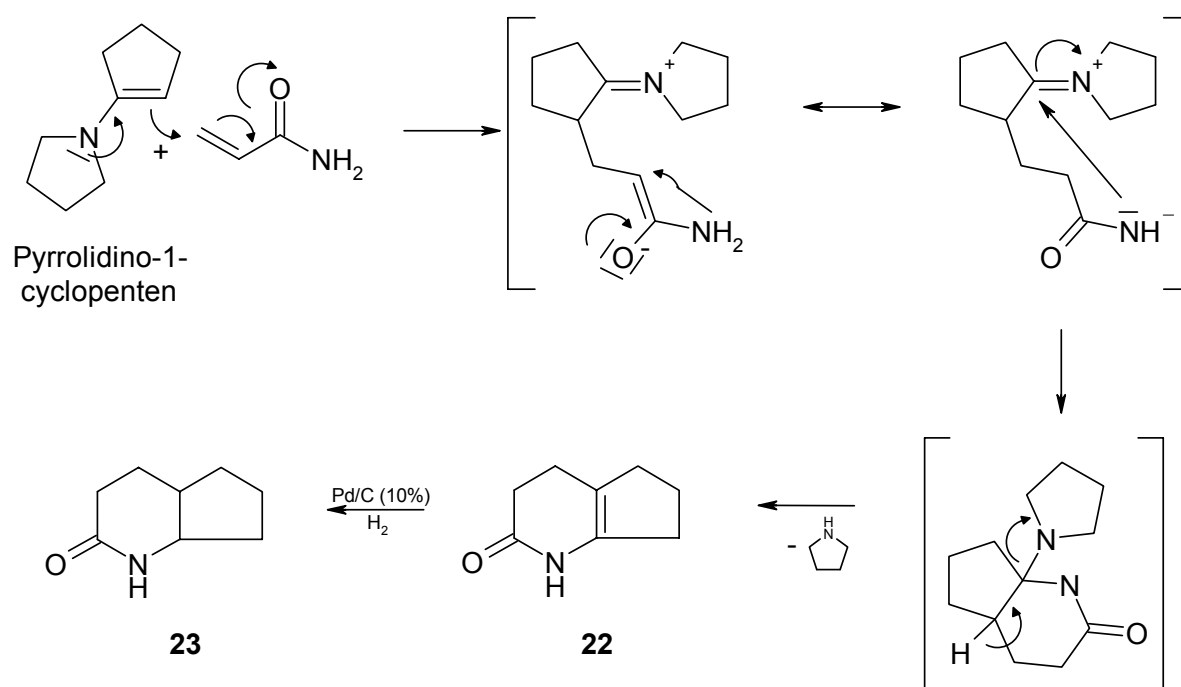


Abb. 56: Darstellung des Lactam-Grundkörpers (theoretischer Reaktionsmechanismus)

Addition alkyliert und cyclisiert spontan unter Abspaltung von Pyrrolidin zum bicyclischen Enamid **22**. Obwohl für diese Reaktion in der Literatur höhere Ausbeuten beschrieben werden, konnte das Produkt nur in 22 % Ausbeute isoliert werden. Offensichtlich entsteht zusätzlich eine Reihe von polymeren Nebenprodukten, die sich in diesem Fall aufgrund des bewußt groß gewählten Ansatzes nur schwer abtrennen ließen. Umkristallisationen aus Dichlormethan Heptan und Diethylether ergaben einen Teil des sauberen Produktes, während über die säulenchromatographische Reinigung ein weiterer Teil isoliert werden konnte.

Das ungesättigte Lactam **22** konnte im nächsten Schritt mit Hilfe von Palladium (10 %) auf Aktivkohle als Katalysator nahezu quantitativ zum gesättigten Lactam **23** hydriert werden.

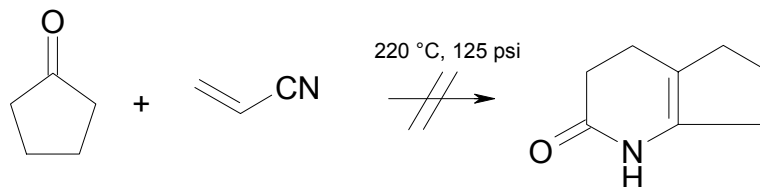


Abb. 57: Alternative Methode zur Darstellung von **22**

Eine alternative Methode zur Darstellung von **22** wurde von *Vill et al.* beschrieben.⁴⁵ Hier werden Cyclopentanon und Acrylnitril zusammen mit Ammoniumacetat und Ammoniak in einem Hochdruckgefäß auf 220 °C erhitzt. Leider konnte beim Nachkochen nach Aufarbeitung des Ansatzes keine Umsetzung festgestellt werden. Obwohl bei dieser Methode die Edukte wesentlich preiswerter waren als Pyrrolidino-1-cyclopenten wurden weitere Versuche, **22** auf diese Weise zu synthetisieren, nicht zuletzt auch aufgrund der komplexeren Reaktionsbedingungen, nicht mehr durchführt.

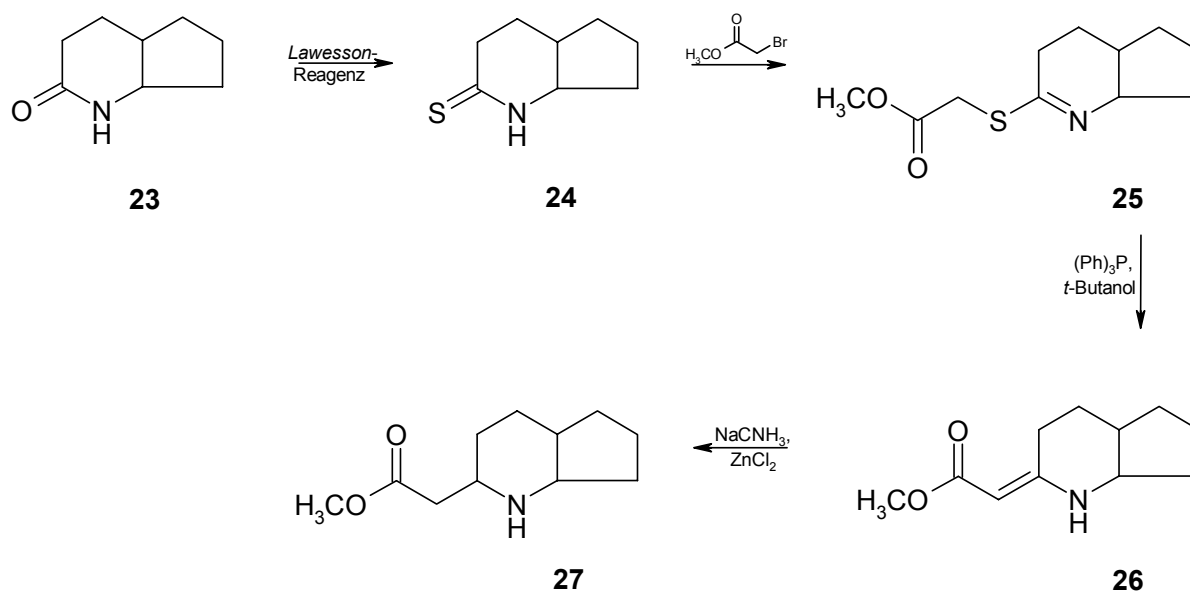
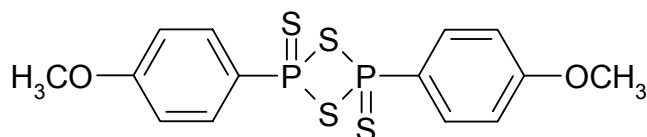


Abb. 58: Synthese des Essigsäuremethylesters

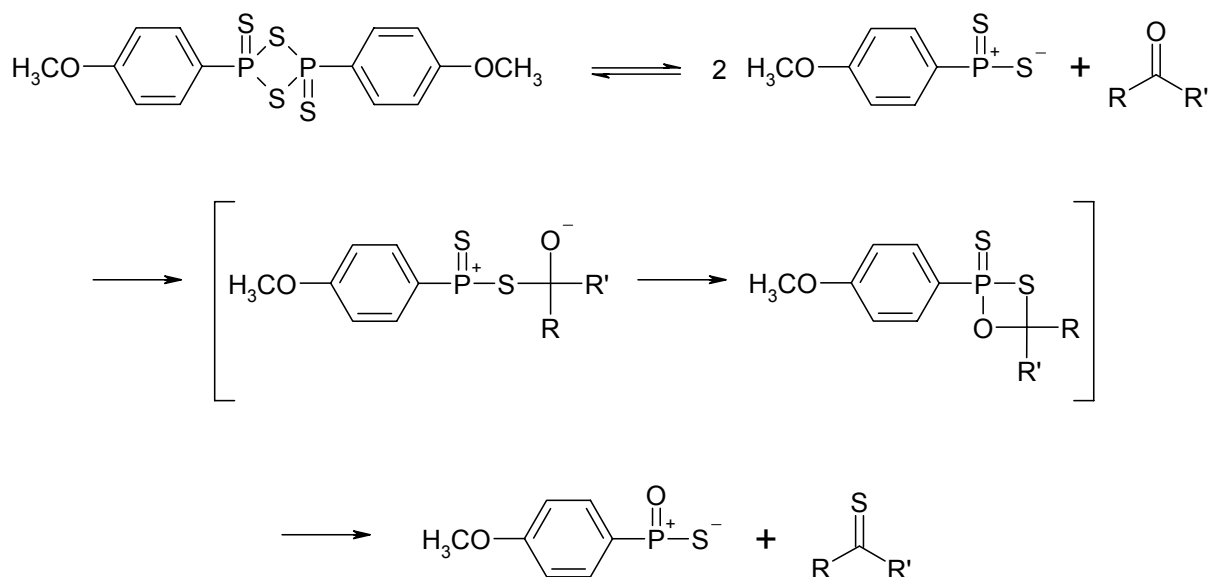
Die anschließende Substitution von **23** mit dem Methoxycarbonylmethyl-Substituenten wurde analog *Salmons* Syntheseweg für **NS-20** durchgeführt (Abb. 58).

3.2.2 Die Thionierung

Die übliche Art den Carbonylsauerstoff eines Lactams gegen Schwefel auszutauschen, ist die Verwendung von Phosphor(V)sulfid (Tetraphosphordecasulfid, P_4S_{10}) oder Borsulfid (B_2S_3). Einfacheres Arbeiten und höhere Ausbeuten ermöglicht jedoch die Verwendung von 2,4-Bis(*p*-methoxyphenyl)-1,3-dithiadiphosphetan-2,4-disulfid (*Lawessons Reagenz*, Abb. 59).^{46, 47} Zwischen diesem und der Carbonylkomponente bildet sich eine gegenüber der P-S- bzw. P=S-Bindung stabilere P-O- bzw. P=O-Bindung aus, die als treibende Kraft der Reaktion fungiert.⁴⁸ Obwohl ein Angriff des Carbonylsauerstoffs am Phosphor wahrscheinlich ist, wird als

Abb. 59: *Lawessons Reagenz*

thionierende Zwischenstufe auch ein hoch reaktives Dithiophosphinylid in Betracht gezogen. ³¹P-Spektroskopie-Experimente von gelöstem *Lawessons Reagenz* deuten darauf hin, daß eine solche Dipolverbindung zumindest in geringen Konzentrationen vorkommt. Ein in der Literatur⁴⁷ beschriebener, möglicher Reaktionsmechanismus ist in Abb. 60 dargestellt.

Abb. 60: Thionierung mit *Lawessons Reagenz*

Das bisher in der Literatur nicht bekannte Thiolactam **24** konnte auf diese Weise in guter Ausbeute (73 %) dargestellt werden.

3.2.3 Die Eschenmoser-Alkenylierung

Bei diesem Verfahren werden α -Bromcarbonyl-Verbindungen (Ketone oder Ester) zusammen mit Thiolactamen und Triphenylphosphin zu den entsprechenden Enaminoketonen bzw. -Esteren umgesetzt.

*Knott*⁴⁹ war der erste, der herausfand, daß eine Verdrängung des Schwefels als effektive Methode genutzt werden kann, eine neue Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung darzustellen. Die Methode, die in dieser Arbeit zur Darstellung des Enaminoesters **26** benutzt wurde, wurde bereits von einigen anderen Arbeitsgruppen erfolgreich angewandt und beschrieben.^{50, 51} Sie beginnt mit der S-Alkylierung des Thiolactams **24** mit Bromessigsäuremethylester. Als Produkt konnte die α -Thioimidin-Verbindung **25** isoliert werden. Im Anschluß wird ein zum Ester α -ständiges acides Proton durch Zugabe von Kalium-*tert.*-butoxid abgespalten. Das hat zur Folge, daß das entsprechende, nun nucleophile Kohlenstoffatom ein intermediäres Episulfid bildet. Aus diesem Zwischenprodukt kann nun mittels Triphenylphosphin und hoher Temperatur der Schwefel eliminiert werden, wobei der Enaminoester **26** entsteht (Abb. 61).

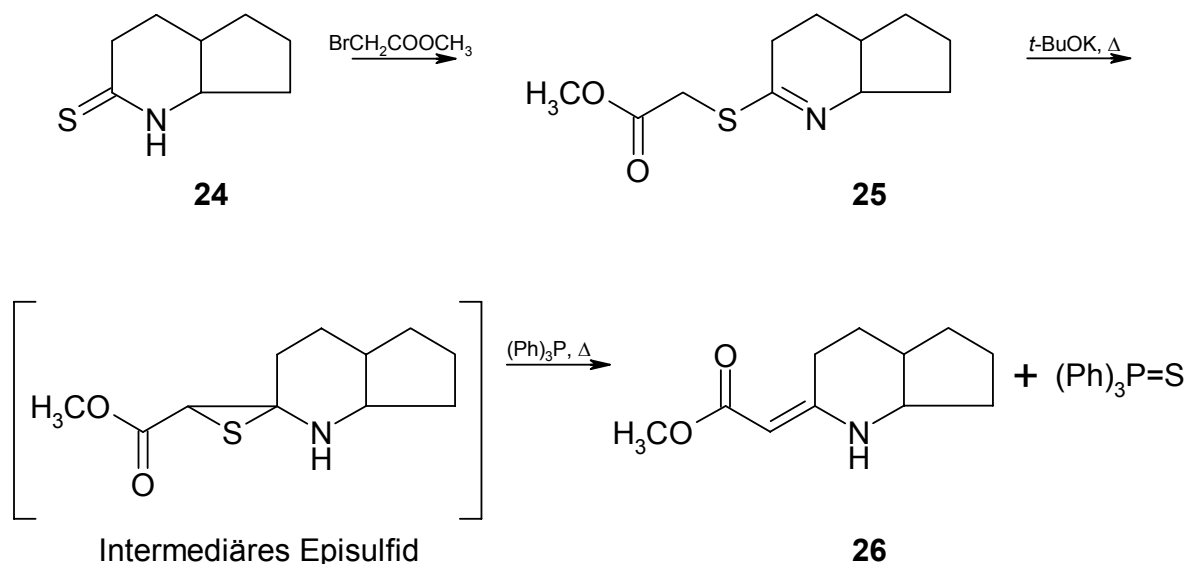


Abb. 61: Mechanismus der Eschenmoser-Alkenylierung

Der letzte Schritt bestand in einer selektiven Reduktion der C-C-Doppelbindung des Enaminoesters durch Natriumcyanoborhydrid unter Zusatz von Zinkchlorid zum Aminoester **27**.

Im Produkt **27** sind drei Stereozentren (*) vorhanden, so daß theoretisch 8 Isomere

entstanden sein können. Diese Tatsache wurde, wie bereits erwähnt, in dieser frühen Phase der Wirkstofffindung nicht unbedingt als Nachteil angesehen. In diesem Fall spricht aufgrund des relativ symmetrischen 4a-H-Signals allerdings vieles dafür, daß nur eines der möglichen Isomere (natürlich als Racemat) entstanden ist (Abb. 62).

Leider zeigte der Aminoester **27** in einem anschließenden Agar-Diffusionstest keinerlei Wirkung gegenüber den Testkeimen. Als Schlußfolgerung kann man daher feststellen, daß das Vorhandensein der Sterolseitenkette am Ring D und/oder die Stereochemie der Ringe C und D und/oder die anguläre Methylgruppe essentiell für die Wirkung entsprechender SBIs sind.

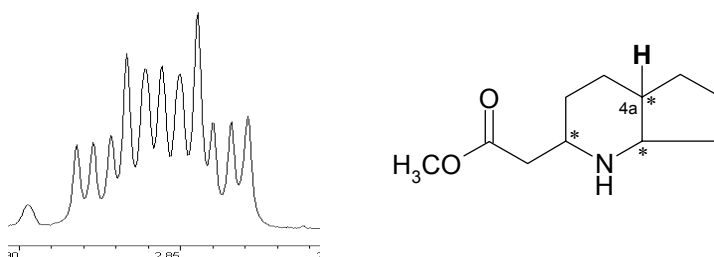


Abb. 62: Ausschnitt aus $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **27** (Signal für 4a-H)

In der Folge wurde deshalb dazu übergegangen, den Grundkörper entsprechend weiter zu modifizieren. Die Möglichkeit zum Anbau einer Seitenkette sollte ebenso berücksichtigt werden, wie das Vorhandensein einer angulären Methylgruppe an C-4a.

3.3 4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindine

Im Gegensatz zum 6,7-Dihydro-[1]-pyrindin-5-on und 2-Oxo-octahydro-[1]-pyrindin ist dieser neue Grundkörper bisher noch nicht dargestellt worden. Die Syntheseplanung orientierte sich daher an strukturell ähnlichen Ringsystemen, die die im vorherigen Kapitel genannten Voraussetzungen mitbringen.

3.3.1 Darstellung des bicyclischen Grundkörpers

Hasserodt und *Janda* beschreiben eine Zwei-Stufen-Synthese für die Darstellung von 4a-Methyl-decahydro-chinolin-5-on.⁵² Ausgangsverbindung war in diesem Fall 2-Methyl-cyclohexan-1,3-dion. *Brown* et. al zeigten, daß es möglich ist, 2-Methyl-cyclopentan-1,3-dion auf ähnliche Weise zu „cyanoethylieren“ (Abb. 63).⁵³

Analog der zuletzt genannten Vorschrift konnte das Nitril **28** in hinreichender

Ausbeute (49 %) synthetisiert werden.

Anschließend wurde versucht den Ringschluß durch Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle (10 %) in Eisessig herbeizuführen. Als Rohprodukt konnten braune Nadeln isoliert werden, die sich jedoch bei säulenchromatographischer Reinigung zersetzten. Auch beim Versuch, die Base durch die Neutralisation des kompletten Ansatzes mittels Natriumcarbonatzugabe freizusetzen konnte nach der Aufarbeitung kein Produkt isoliert werden.

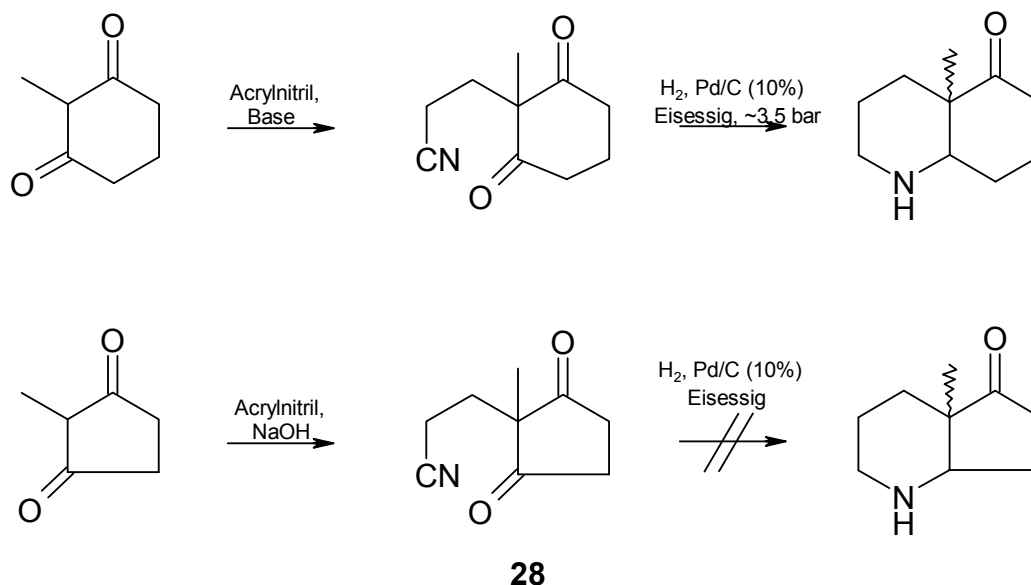


Abb. 63: Synthesestrategie analog *Hasserodt* und *Janda*⁵² bzw. *Brown*⁵³

Eine andere Methode um mit einem Cyanoketon einen Ringschluß durchzuführen, wurde von *Lochte* und *Pittman* beschrieben.⁵⁴ Sie hydrierten 2-(2-Cyanoethyl)-cyclopentanon mit Raney-Nickel in Ethanol bei ~ 34.5 bar und 120 °C und erhielten Octahydro-1,5-pyridin als Produkt mit 76 % Ausbeute.

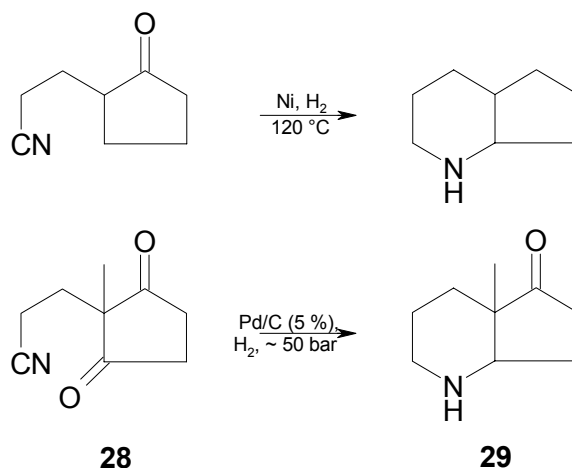


Abb. 64: Synthese von **29** nach der Methode von *Lochte* und *Pittman*⁵⁴

Im Folgenden wurde diese Vorschrift in Grundzügen auf das Nitril **28** angewandt. Obwohl Raney-Nickel als Katalysator ebenfalls in Frage kam, wurde aus Gründen der einfacheren Handhabung in unserem Fall Palladium auf Aktivkohle (10%) eingesetzt.

Etwaige Ausbeuteeinbußen wurden dabei in Kauf genommen. Außerdem wurde versucht, die in der Literatur angegebene Temperatur von 120 °C durch erhöhten Druck zu kompensieren, so daß der Versuch bei Raumtemperatur stattfinden konnte.

Nach der Hydrierung bei ~ 50.0 bar über Nacht in Ethylacetat konnten nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung tatsächlich 44 % der gewünschten Verbindung **29** isoliert werden (Abb. 64).

Obwohl man bei der Reaktion die Entstehung eines Isomerengemisches erwarten könnte, läuft sie stereoselektiv ab. Während *Hasserodt* und *Janda*⁵² bei der Synthese von 4a-Methyl-decahydro-5-chinolin (Abb. 63) von der Entstehung eines *cis-trans*-Isomerengemisches (10% : 90%) berichten, konnte in unserem Fall mittels Dünnschichtchromatographie und GC-MS-Experiment (Abb. 65) eindeutig festgestellt werden, daß nur eines der beiden möglichen Isomere entstanden ist.

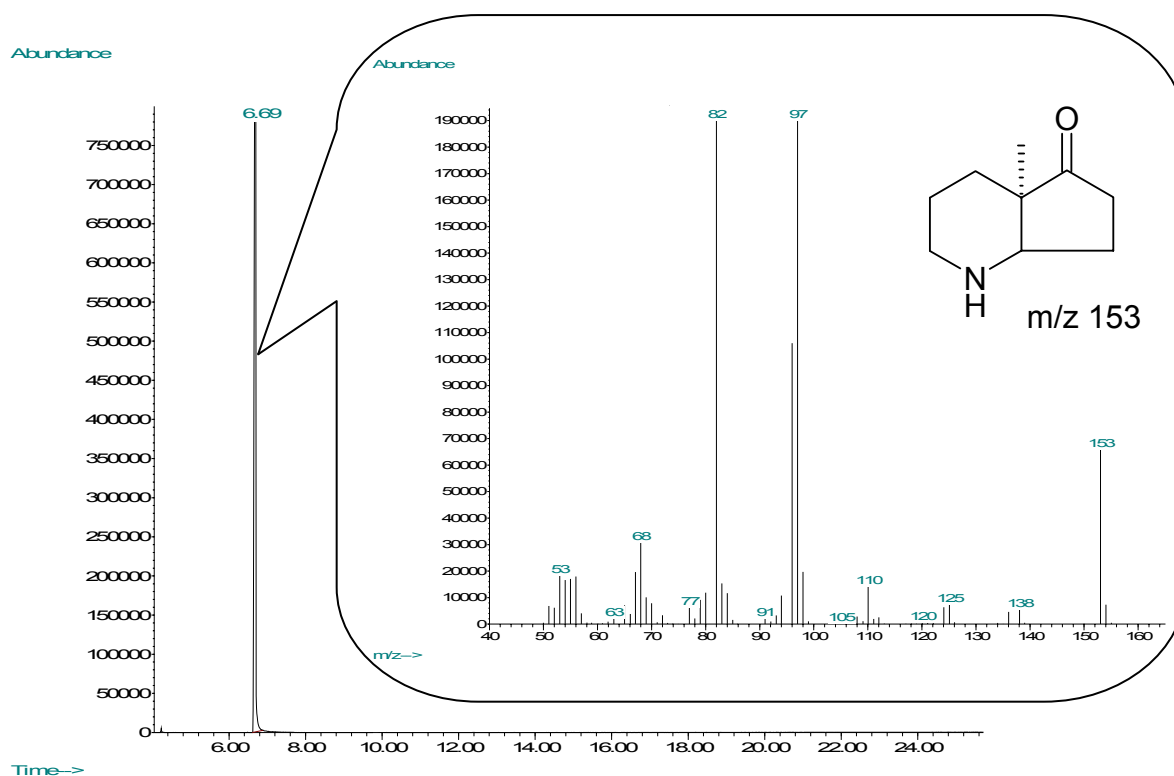


Abb. 65: GC/MS-Untersuchung von **29**

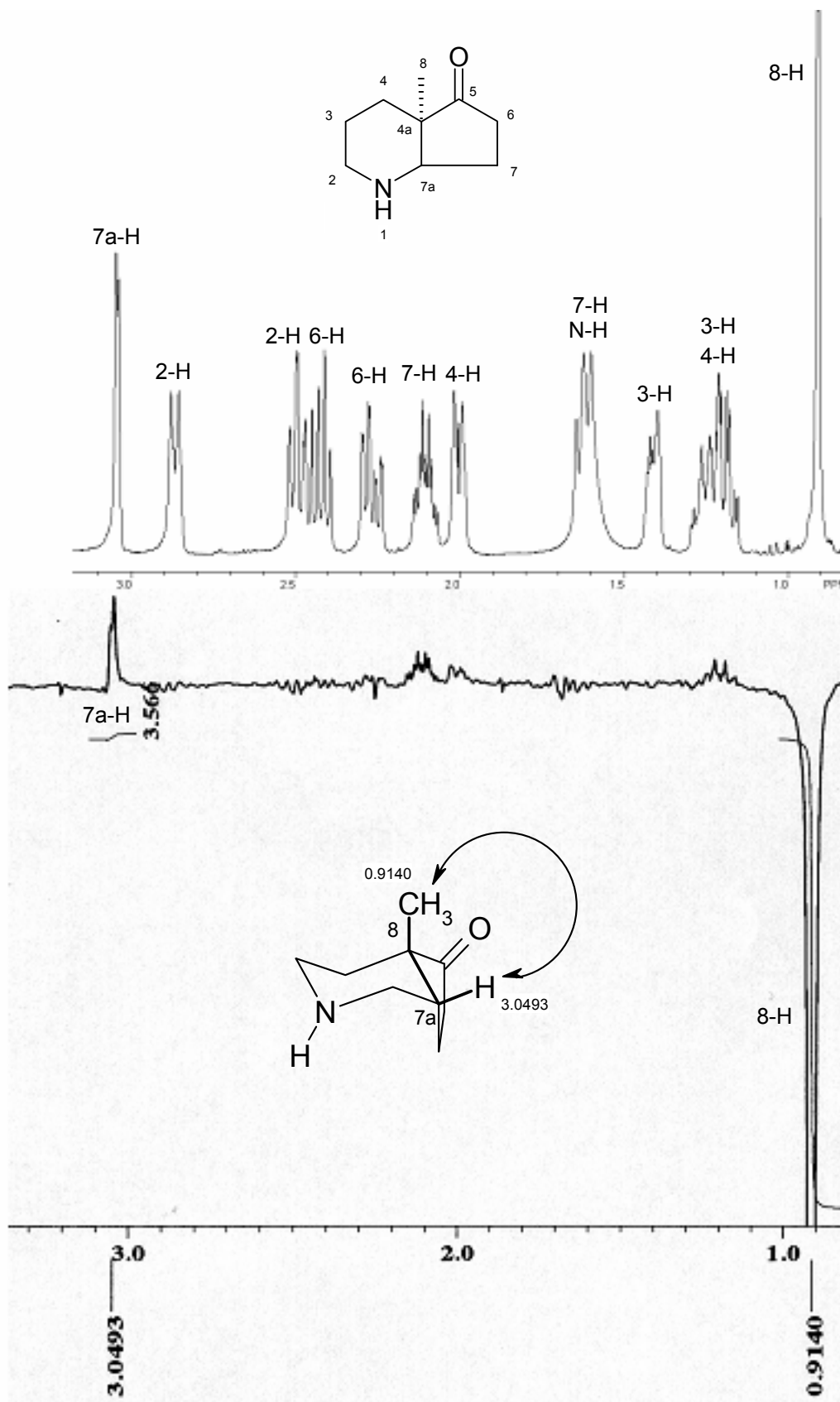


Abb. 66: $^1\text{H-NMR}$ - und NOE-Differenz-Spektrum von 29

Die Struktur der Verbindung wurde anhand von 1D-/2D-NMR-Experimenten exakt

aufgeklärt. Darüber hinaus konnte mittels NOE-Experiment (Nuclear Overhauser Enhancement) die Stereochemie der Ringverknüpfung zweifelsfrei bestimmt werden. Dabei wurde beim Signal der Methylgruppe bei 0.9133 ppm eingestrahlt. Nur die Wasserstoffatome, die nicht mehr als 5 Å voneinander entfernt sind, zeigen im Differenz-Spektrum einen NOE-Effekt. In unserem Fall ist dies das Signal des 7a-Protons. Die *cis*-Verknüpfung von **29**, wie in Abb. 66 gezeigt, konnte hiermit eindeutig belegt werden.

Während also 2-Methyl-cyclohexan-1,3-dion sowohl die Entstehung des *trans*- wie aber auch die des *cis*-Isomers ermöglicht, entsteht bei der Verwendung von 2-Methyl-cyclopentan-1,3-dion stereoselektiv nur das *cis*-Isomer.

Obwohl in der Ergosterol-Biosynthese bei allen Zwischenprodukten ab dem Lanosterol, auch beim Ergosterol selbst, die Ringe C und D *trans* verknüpft sind, wurde **29** als Grundkörper für weitere Versuche verwendet. Bis auf die Stereochemie konnten nämlich die Syntheseeziele „sechsgliedriger C-Ring plus fünfgliedriger D-Ring“, „anguläre Methylgruppe“ und „Möglichkeit zur Einführung einer Seitenkette“ erreicht werden.

3.3.2 Schutzgruppen für die Aminfunktion

Im Vergleich zu **11** mit einem Pyridinring hat man bei **29** mit dem Piperidin (sekundäres Amin) eine neue funktionelle Gruppe mit beachtenswerter Reaktivität. Bei Versuchen, über die Ketogruppe geeignete Seitenketten ins Molekül einzufügen, kann es daher nötig werden, das Amin vorher entsprechend zu schützen.

Bei der Suche nach einer geeigneten Schutzgruppe wurde darauf Wert gelegt, sie auf möglichst unkomplizierte Art und Weise einführen zu können. Darüber hinaus sollte sie eine hohe Stabilität gegenüber nucleophilen Reagenzien aufweisen, da diese, wie die vorherigen Kapitel gezeigt haben, bei der Seitenkettensynthese eingesetzt werden sollten.

Die *tert.*-Butoxycarbonyl-Gruppe (abgekürzt *Boc*) ist eine in der präparativen Chemie häufig eingesetzte Schutzgruppe für Amine, da sie selbst bei katalytischer Hydrogenolyse oder der Verwendung starker Nucleophile, wie z.B. metallorganischen Reagenzien, die notwendige Stabilität aufweist. Darüber hinaus gelingt ihre Abspaltung in der Regel schon mit einfachen Mineralsäuren bei kurzen Reaktionszeiten.⁵⁵

In der Literatur werden zahlreiche Wege beschreiben, entsprechende Carbaminsäureester zu synthetisieren. Die Synthesepaltung orientierte sich an den Vorschriften mit cyclischen Aminen als Substraten. Eine der gängigen Methoden ist Di-*tert.*-butyl-dicarbonat (Boc_2O) in THF vorzulegen, abzukühlen und mit dem Piperidin-Derivat zu versetzen.

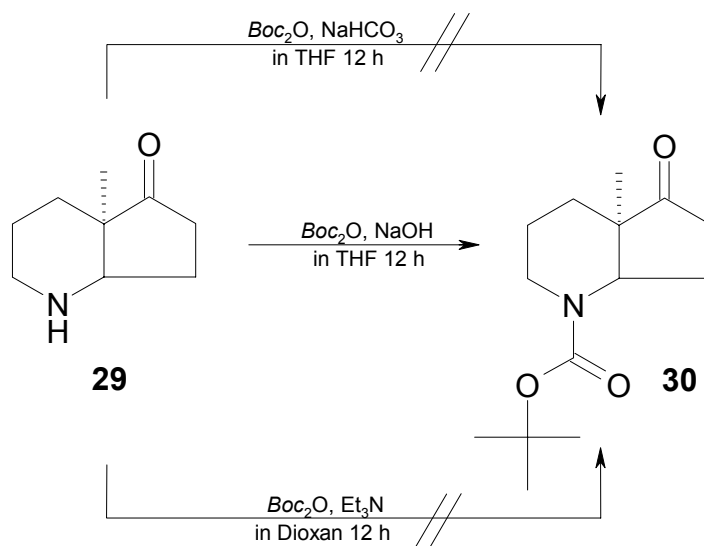


Abb. 67: Einführung einer *Boc*-Schutzgruppe in **29**

Nach Aufarbeitung mit 10%iger Natriumbicarbonatlösung wird mit Ether extrahiert und entsprechend aufgearbeitet.⁵⁶ Auf **29** angewandt, brachte diese Methode jedoch nicht den gewünschten Erfolg. Andere Vorschriften^{57, 58} benutzten Di-*tert.*-butyl-dicarbonat zusammen mit Triethylamin, um Piperidinderivate zu schützen. In wasserfreiem Dioxan durchgeführt, konnte durch diese Methode die entsprechende Schutzgruppe jedoch nicht in unser Amin eingeführt werden. Erfolg brachte erst die von *Kozlowski* et al. beschriebene Methode mit Natriumhydroxid in Eiswasser⁵⁹. Zusammen mit **29** wurde dieses Gemisch tropfenweise mit Di-*tert.*-butyl-dicarbonat in THF versetzt, um sich über Nacht nahezu quantitativ (98%) zum Carbaminsäureester **30** umzusetzen (Abb. 67).

3.3.3 Dynamische NMR-Spektroskopie: Bindungsrotamere der *Boc*-Schutzgruppe

Neben der reinen Strukturaufklärung kann die *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (NMR) auch Informationen über die Bewegung von Molekülen in Lösung geben. Dazu gehören neben Valenz- bzw. Deformationsschwingungen und Konformationsänderungen auch Rotationen um Einfachbindungen. Hierbei gibt es

verschiedene Möglichkeiten, inwieweit solche Molekülbewegungen die NMR-Relaxationszeiten bzw. das Erscheinungsbild der entsprechenden Resonanzpeaks beeinflussen.

Das Phänomen „Rotamere“ tritt häufig bei tertiären Amiden auf. Auch im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum des Carbaminsäureesters **30** und seinen später beschriebenen Derivaten kann beobachtet werden, daß einige Signale doppelt und mit unterschiedlicher Intensität auftreten. Zu erklären läßt sich das wie folgt:

Die C-N-Bindung zwischen der Carbonyl- und der Amidgruppe hat einen hohen Doppelbindungscharakter (Abb. 68).

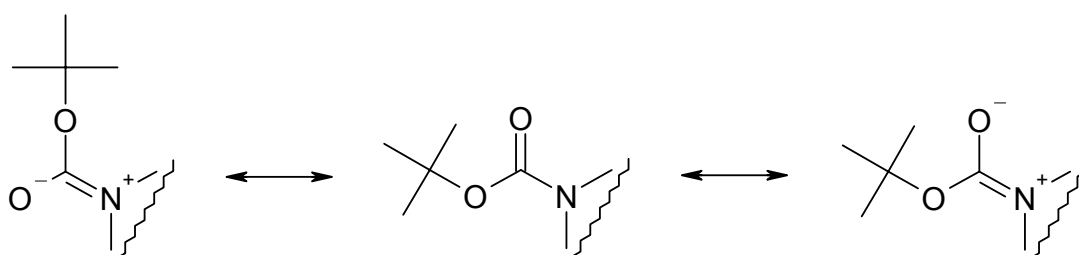


Abb. 68: Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung

In den energieärmeren, planaren Konformationen befinden sich die betroffenen Protonen bzw. Kohlenstoffatome in verschiedener chemischer Umgebung. Sie besitzen somit zwei unterschiedliche Resonanzfrequenzen. Zwar besteht eine Rotation um die N-CO-Bindung, so daß der Austausch **[A]** \leftrightarrow **[B]** möglich ist. Die Austauschfrequenz ist jedoch bei Raumtemperatur wegen der hohen Energiebarriere von ca. $90 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ niedrig. Die Aufenthaltsdauer der entsprechenden Protonen bzw. Kohlenstoffatome (Abb. 69) in den Positionen verschiedener Lamorfrequenz ist daher relativ groß, so daß anstatt von einem jeweils zwei Signale (**[A]** und **[B]**) gemessen werden (Abb. 70).

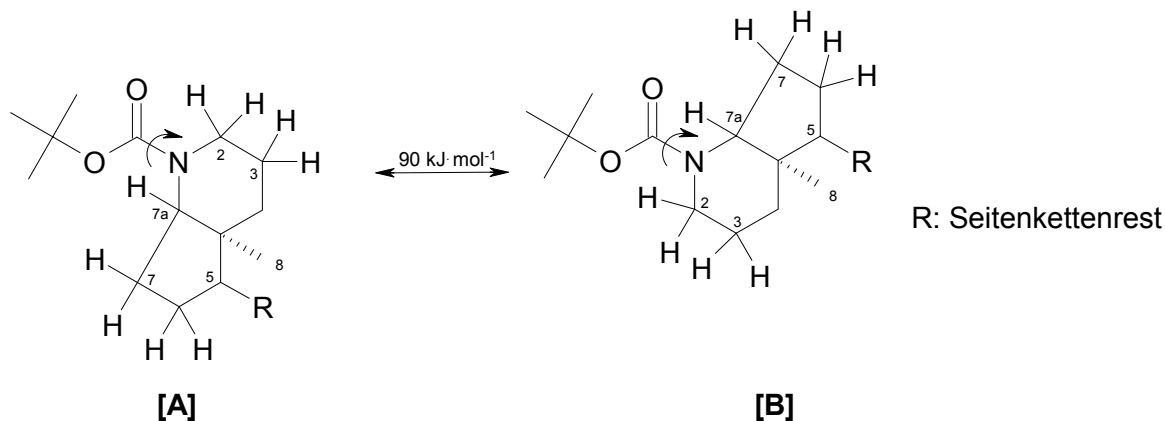


Abb. 69: Rotation *N*-Boc-geschützter Pyridine

Bei dem unten abgebildeten CH-COSY-Spektrum wurde das DEPT-Spektrum über das ^1H -Spektrum aufgetragen. Die Kreuzpeaks zeigen die jeweiligen $^1J_{\text{CH}}$ -Kupplungen an. Die vom Rotamerenphänomen der Amidbindung betroffenen Kerne treten dabei mit mehr oder weniger gut differenzierbaren, doppelten Signalen auf ([A] und [B]).

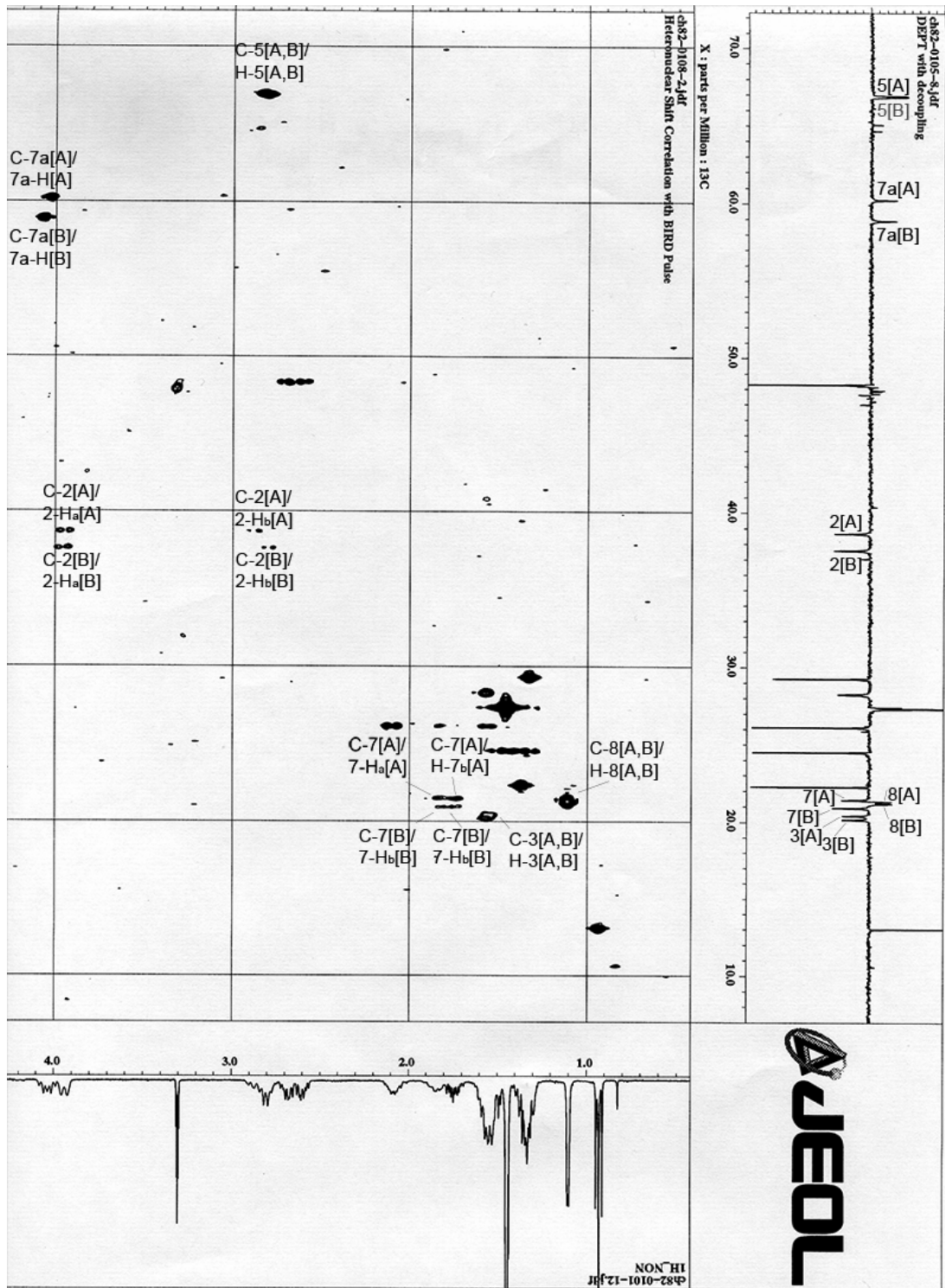


Abb. 70: Rotamerenpeaks im CH-COSY-Spektrum von 40

3.3.4 Anbau von Seitenketten: Die Strategie

Ähnlich wie bei den bereits beschriebenen 6,7-Dihydro-5-oxo-5*H*-[1]-pyrindin-Derivaten sollten auch bei **29** sterolähnliche Seitenkettenanaloga eingefügt werden. Diese sollten ihrem „natürlichen“ Vorbild im Fecosterol (Abb. 39) in Lipophilie und räumlichen Volumen wieder möglichst nahe kommen.

Die Strategie orientierte sich dabei an der, die bereits bei den Dihydropyridinen in Kapitel 3.1.2 beschrieben wurde. Vorrangig war die Darstellung eines „reinen“ Alkylsubstituenten. Die beim teilweise ungesättigten Ringsystem erfolglos verlaufenden C-C-Verknüpfungsreaktionen sollten beim gesättigten Ringsystem erneut erprobt werden. Als Alternative sollten *N*- bzw. *O*-Alkyl-Derivate synthetisiert werden.

3.3.5 Die Wittig-Reaktion

Bei der Durchführung dieser Reaktion sollte erneut versucht werden, in einem Reaktionsschritt ein Seitenkettenanalogon an das Grundgerüst anzubauen.

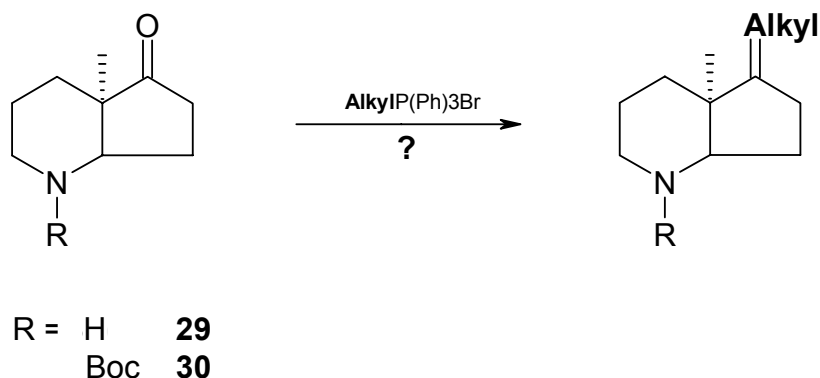


Abb. 71: Strategie zur Substitution von **29** bzw. **30** nach Wittig

Obwohl die sekundäre Aminogruppe die Reaktion theoretisch stören könnte, wurde als erstes versucht das ungeschützte **29** umzusetzen. Für die Herstellung des entsprechenden Ylids wurde Natriumhydrid als 60%ige Suspension in Paraffinöl vorgelegt. Anschließend wurde getrocknetes DMSO zugetropft und auf 80 °C erhitzt bis die Wasserstoffentwicklung aufhörte. Unter Eisbadkühlung wurde Hexyltriphenylphosphoniumbromid, in DMSO gelöst, zugetropft. Zu der so frisch dargestellten Ylidlösung wurde anschließend eine äquimolare Menge **29** in DMSO zugegeben, 2.5 Stunden bei Raumtemperatur und weitere 30 Minuten bei 50 °C gerührt. Nach Aufarbeitung konnte mittels GC/MS neben dem Edukt **29** nur

Triphenylphosphinoxid gefunden werden.

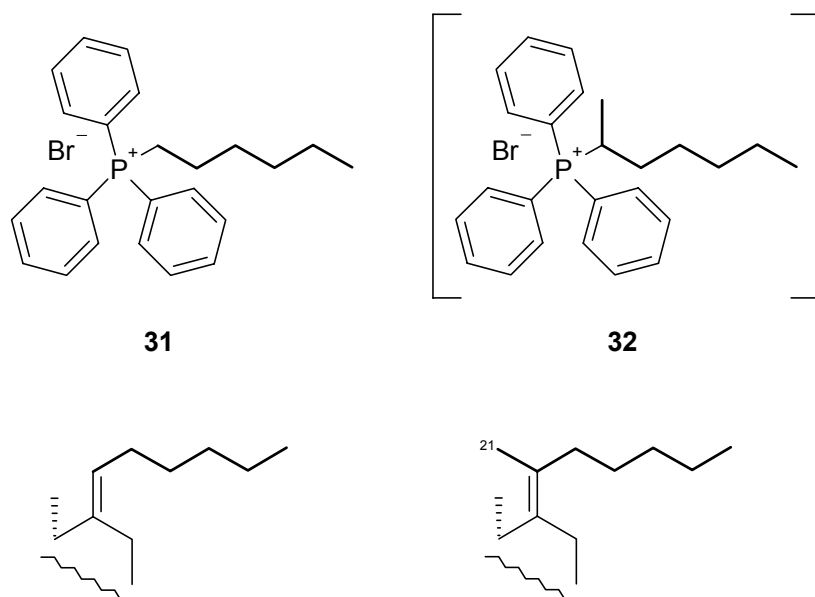


Abb. 72: Verschiedene Phosphoniumsalze als mögliche Seitenkettenvorstufen

Alternativ wurde der Versuch mit selbst hergestelltem Phosphoniumsalz wiederholt. Zur Herstellung wurde in Toluol Triphenylphosphin mit einer äquimolaren Menge 1-Bromhexan versetzt und 24 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das entstandene Produkt konnte anschließend als weißer Feststoff **31** abfiltriert werden. **32** wäre unter dem Aspekt interessant gewesen, daß hier die Methylverzweigung an Position 21 berücksichtigt wurde (Abb. 72). Die Darstellung dieses Phosphoniumsalzes unter Verwendung von 2-Methylhexylbromid gelang jedoch nicht.

Auch die Eigensynthese von **31** brachte leider keinen Erfolg im Hinblick auf eine erfolgreiche Seitenketteneinführung. Die Verbindung ließ sich mit **29** ebenso wenig umsetzen. Daher wurde anschließend dazu übergegangen, die Reaktion mit dem *Boc*-geschützten Amin **30** durchzuführen.

Nachdem auch bei diesem Ansatz die gewünschte Umsetzung ausblieb, wurde wie bei der gelungenen Synthese von **12** anstelle von Natriumhydrid Kalium-*tert.*-butoxid als Base zusammen mit **31** eingesetzt - leider ebenfalls ohne Erfolg.

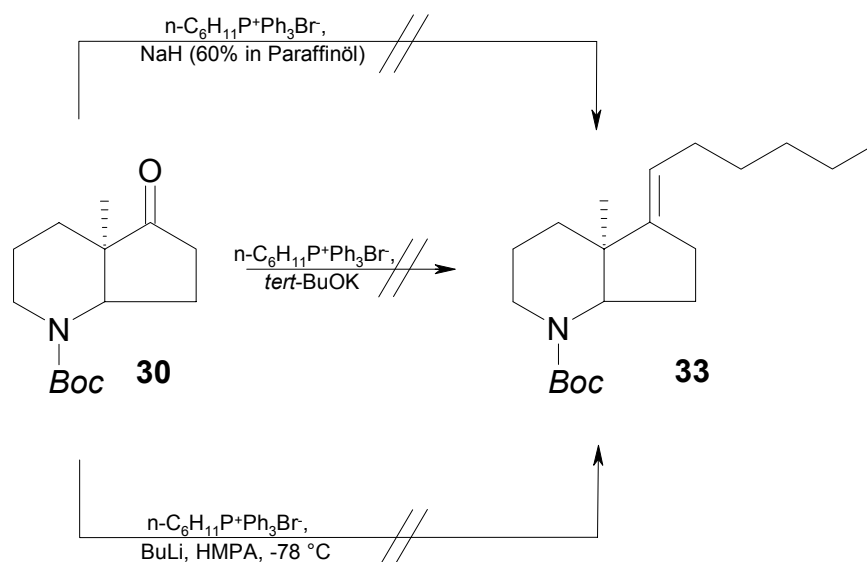


Abb. 73: Erfolgreiche Versuche zur Darstellung des Olefins **33**

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Kuhn et al.*⁶⁰ wurde ein letzter Versuch, mittels Wittig-Reaktion den Grundkörper zu substituieren, unternommen. Bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ sollte aus **31** in THF durch Zugabe von Butyllithium und anschließendes Rühren bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (15 Stunden) und Raumtemperatur (6 Stunden) das Ylid entstehen. Zu dieser tiefroten Lösung wurde anschließend bei $0\text{ }^\circ\text{C}$, versetzt mit etwas HMPA, **30** gegeben. Doch auch mit dieser Methode konnte das gewünschte Olefin **33** nicht dargestellt werden.

Im Folgenden wurden daher andere Methoden gesucht, die Seitenkette über eine C-C-Verknüpfung an den Grundkörper anzubauen.

3.3.6 Die *Grignard*-Reaktion

Wie bei 6,7-Dihydropyridin sollte auch beim geschützten Grundkörper **30** mittels organometallischer Reagenzien die Seitenkettensynthese versucht werden (vgl. Kapitel 3.1.5).

Auch hier kam als Erstes die klassische *Organikum*-Methode zum Einsatz.⁶¹ Hierbei wurden zu einer Hexylmagnesiumbromidlösung (2.0 M in Diethylether / *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*) langsam 0.5 Äquivalente **30** hinzugegossen und unter Stickstoffatmosphäre 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die anschließende Hydrolyse erfolgte mit zerstoßendem Eis. Der entstandene Niederschlag wurde durch vorsichtige Zugabe einer wässrigen Ammoniumchloridlösung gelöst. Nach weiterer Aufarbeitung wurde das Rohprodukt mittels GC/MS auf die gewünschte Umsetzung hin untersucht.

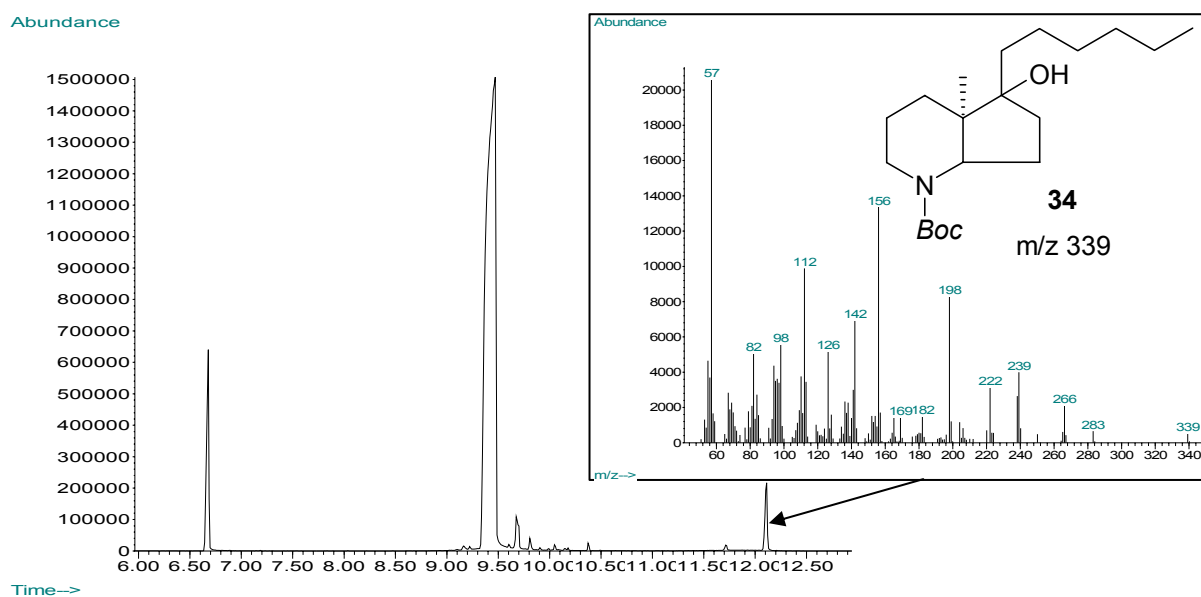


Abb. 74: GC/MS-Kontrolle der *Grignard*-Reaktion

Abb. 74 zeigt, daß die nach 12.0 Minuten eluierende Substanz, die eine dem gewünschten Produkt **34** entsprechende Masse aufweist, gemessen am Hauptpeak nur zu 3.39 % im Rohprodukt vorhanden war. Der Hauptpeak und der Peak bei 6.6 Minuten konnten anhand ihrer Fragmentierungen als Edukt **30** bzw. Edukt ohne *Boc*-Schutzgruppe **29** identifiziert werden. Wegen der im GC/MS zu erkennenden, äußerst geringen Umsatzrate konnte das Produkt durch die weitere Aufarbeitung nicht in einer für die Analytik ausreichenden Menge isoliert werden.

Der zweite Versuch verfolgte das Ziel, die mäßige Umsetzung zu steigern. Gelingen sollte dies durch die Eigensynthese der *Grignard*-Verbindung. Hierbei wurden Magnesiumspäne in Diethylether bis zur kompletten Auflösung mit 1-Bromhexan versetzt. Um die Reaktion zu initiieren wurde zusätzlich 1 Tropfen Dibromethan hinzugegeben. Gemessen am Keton **30** wurde hier die zehnfache Menge *Grignard*-Reagenz angesetzt. Anschließend wurden über eine Spritze etwa 15 Volumenprozent der Lösung in ein zweites Reaktionsgefäß umgefüllt. Mit diesem wurde analog zum ersten Versuch weiter- und aufgearbeitet. Doch auch bei diesem Versuch konnte die Produktausbeute nicht gesteigert werden.

Ein dritter Versuch unterschied sich von den ersten beiden durch die Verwendung eines Benzol-Diethylether-Gemisches (1:1) als Lösungsmittel. Leider brachte auch diese Modifikation nicht den gewünschten Erfolg, die Synthese von **34**. Trotzdem fiel bei der GC/MS-Kontrolle des Ansatzes ein bis dahin in den entsprechenden Chromatogrammen nicht vorgekommener Peak auf. Dieser wies eine m/z von 255

auf und glich in seiner Fragmentierung dem Edukt **30**. Nach Isolierung und weiterer Analytik konnte die unbekannte Substanz als Alkohol **35** identifiziert werden.

Eine Erklärung für diese ungeplante Reduktion des Ketons findet sich in der Literatur.⁶²

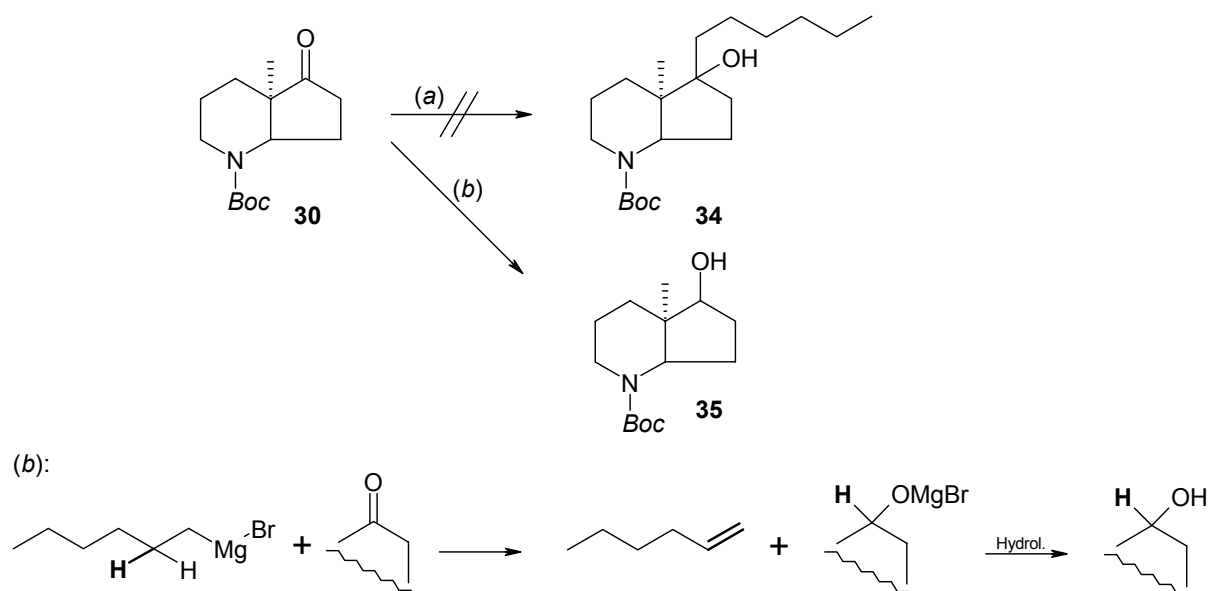


Abb. 75: Geplanter (a) und ungeplanter (b) Verlauf der *Grignard*-Reaktion

Betroffen von dieser „*Grignard*-Reduktion“ sind häufig sterisch gehinderte Ketone, die mit voluminösen *Grignard*-Verbindungen zur Reaktion gebracht werden. Grundvoraussetzung ist das Vorhandensein eines β -ständigen Wasserstoffatoms bei der *Grignard*-Verbindung. Jetzt kann die Carbonyl-Komponente vom *Grignard*-Reagenz, welches unter Eliminierung selbst zum Olefin reagiert, zum Alkohol reduziert werden.

3.3.7 5-N-Alkyl-4a-methyloctahydro-[1]-pyridine

Nachdem die Darstellung einer reinen Kohlenstoffseitenkette ohne Erfolg blieb, wurde ähnlich wie bei den 6,7-Dihydropyridinen dazu übergegangen über Heteroatome die Bindung aufzubauen.

Als erstes sollte die erfolgreiche Methode der reduktiven Aminierung angewandt werden. Diese Reaktion beginnt mit der Kondensation von Aminen mit Carbonylverbindungen zu Iminen. Die Reduktion des Imins zu einem Amin erfolgt durch Hydrid-Reagenzien. Grundsätzlich ist es auch möglich, als neue Verbindung das Imin aus dem Ansatz zu isolieren (Abb. 76).

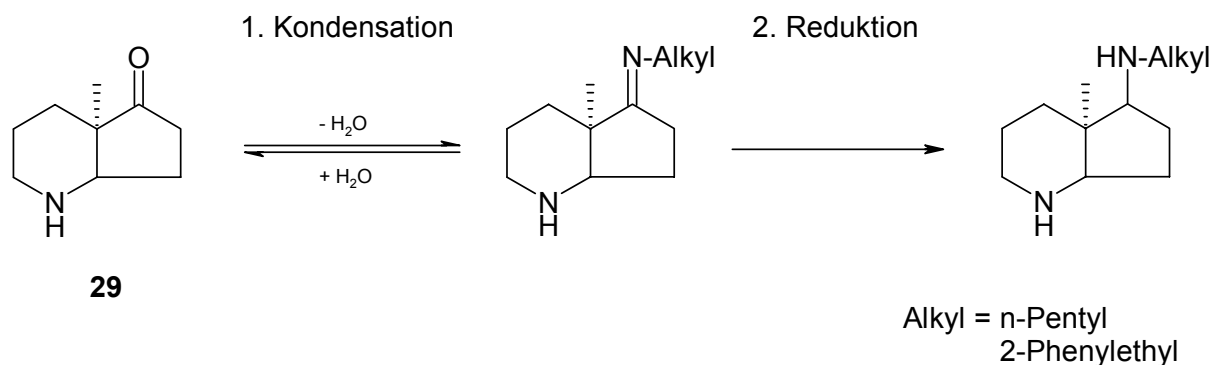


Abb. 76: Reduktive Aminierung des Ketons **29**

Als Baustein für die Einführung des Seitenkettenrests sollten zwei *N*-Alkylbausteine verwendet werden. Zum einen das unverzweigte *N*-Pentylamin, zum anderen Phenylethylamin. Letzteres sollte mit seinem Phenylring die Verzweigung an Position 24(28) der Originalkette besser imitieren (vgl. Abb. 39).

Als Hydrierungsreagenz wurde Natriumcyanoborhydrid eingesetzt. Zusätzlich diente Zinkchlorid als Katalysator. Umsatzkontrollen per GC-MS zeigten jedoch, daß selbst nach 120 Stunden noch keine befriedigende Umsetzung stattgefunden hatte.

Dennoch konnten auf diese Weise neben den Iminen **36** und **37** auch die Amine **37** und **39** dargestellt werden.

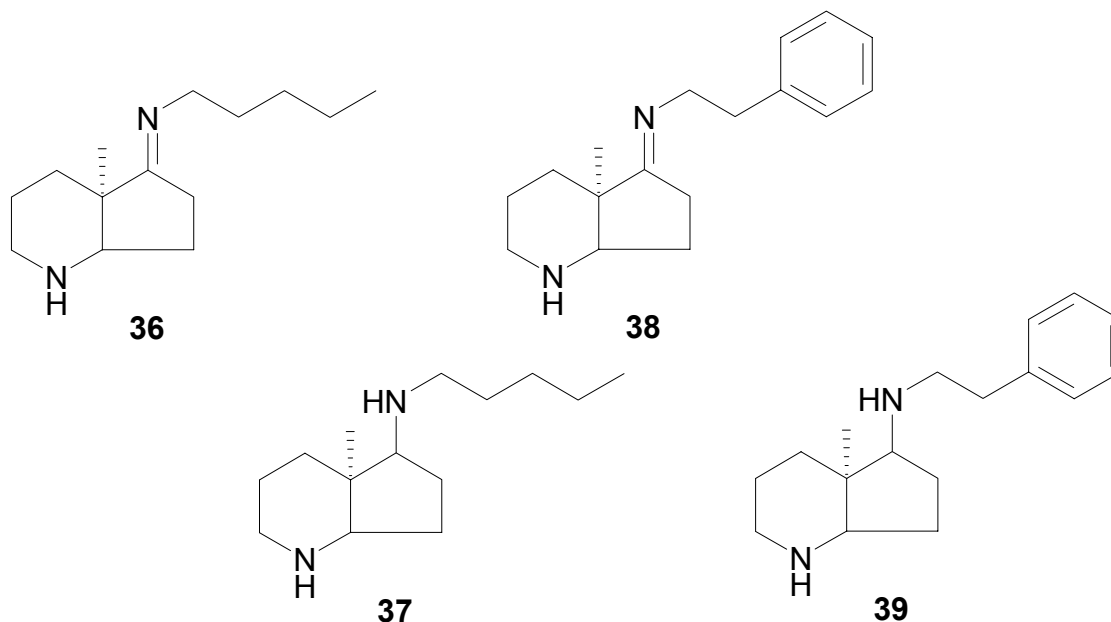


Abb. 77: 5-*N*-Alkyl-4a-methyl-octahydro-[1]pyridine und die entsprechenden Imine

Bei den in Abb. 77 gezeigten Aminen hat man zwei Bereiche, die in protonierter Form theoretisch carbokationische Zwischenstufen (HEI) imitieren können (vgl. 3.1.6).

Zum einen erhöht sich dadurch zwar die Wahrscheinlichkeit antimykotischer Aktivität. Zum anderen interessierte jedoch auch, ob eine Struktur mit einem einzigen protonierbaren Amin in Position 20 in der Lage ist, die Ergosterol-Biosynthese zu inhibieren.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich auch der Carbaminsäureester **30**, bei dem der Stickstoff in Position 8 nicht protonierbar ist, reaktiv aminiert.

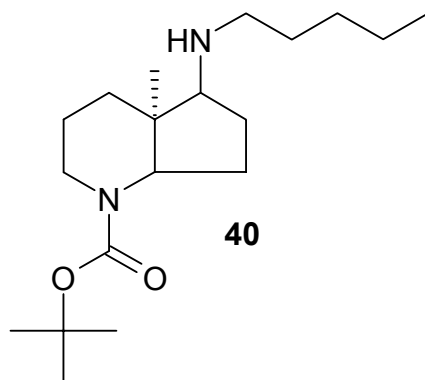


Abb. 78: Der *N*-alkylierte Carbaminsäureester **40**

3.3.8 5-O-Alkyl-4a-methyloctahydro-[1]-pyridine

Der Carbonylsauerstoff von **29** kann aber auch als erstes Seitenkettenglied im Molekül verbleiben. Nach der Reduktion zum sekundären Alkohol sollte es nämlich möglich sein, über Ether- bzw. Esterbindungen Seitenkettenanaloge zu synthetisieren.

3.3.8.1 Darstellung der Alkohole

Ein erster Schritt war somit eine Reduktion der Ketone **29** bzw. **30** zu den Alkoholen **41** und **35**. Zuletzt genannter ist bereits in Kapitel 3.3.6 erwähnt worden. Die dort aufgeführte Darstellungsmethode wurde jedoch durch die im Folgenden beschriebene ersetzt.

Dabei wurden die Ketone jeweils zu einer Lösung von Natriumborhydrid in Isopropylalkohol gegeben, über Nacht stehengelassen und nach Zerstörung des überschüssigen Borhydrids mit verd. Salzsäure entsprechend aufgearbeitet. Die beiden Alkohole konnten auf diese Weise in guten Ausbeuten synthetisiert werden (Abb. 79).

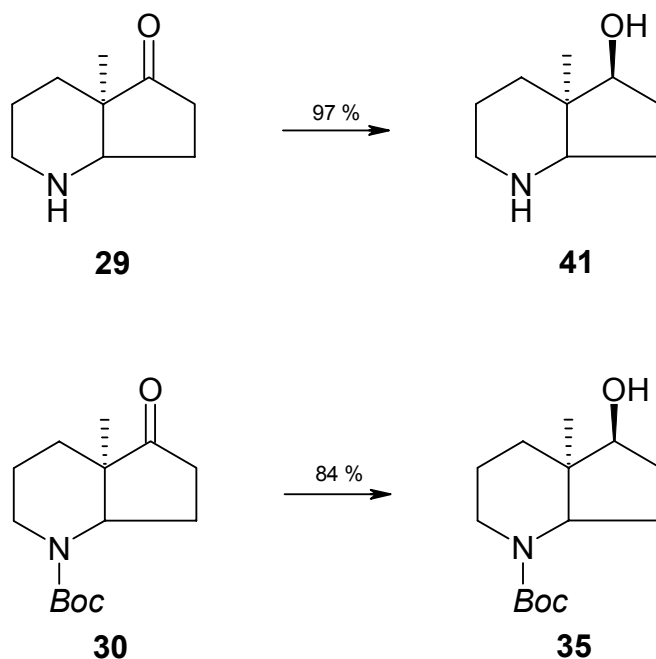


Abb. 79: Die Alkohole 41 und 35

3.3.8.2 Ethersynthese

Mit der Hydroxygruppe ließen sich die Verbindungen nun weiter umsetzen. Dabei sollte ein Pentylether dargestellt werden, der theoretisch wieder die Originalseitenkette imitieren kann.

Die gebräuchliche Ethersynthese verläuft über die entsprechenden Alkoxide, die hierbei als ausgezeichnete Nucleophile fungieren. Um Probleme mit dem Piperidin-Stickstoff zu umgehen, wurde daher das geschützte Amin 35 eingesetzt. Dieses wurde in THF gelöst und mit Natriumhydrid deprotoniert. Anschließend wurde Pentylbromid im Überschuß hinzugegeben. Eine Spatelspitze Kaliumiodid fungierte als Katalysator. Iodid verdrängt das Brom im Pentylbromid nucleophil. Das so entstandene Pentyliodid reagiert mit seiner „verbesserten“ Abgangsgruppe Iodid nun leichter mit dem entsprechenden Nucleophil (hier dem Alkoxid). Das Reaktionsgemisch wurde 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt und weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung konnte der gewünschte Ether 42 isoliert werden (Abb. 80).

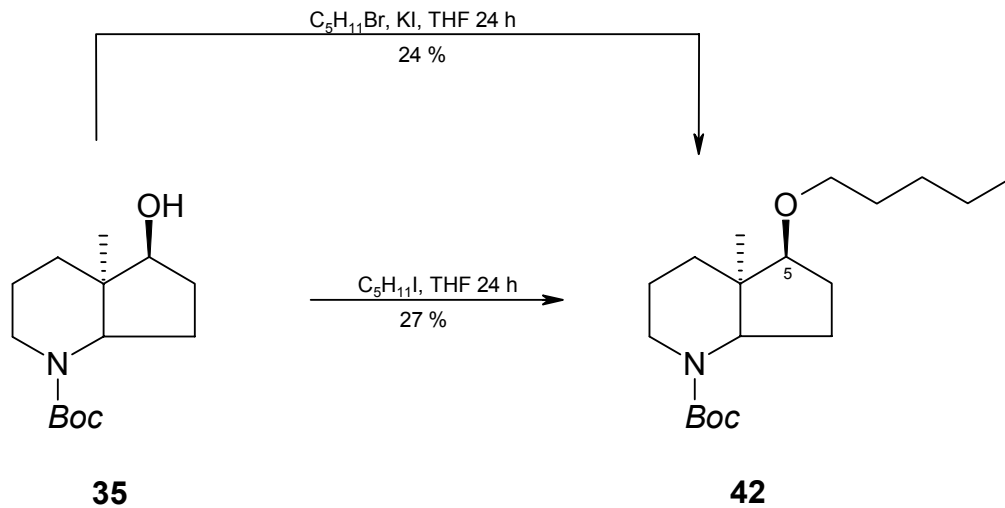


Abb. 80: Ethersynthese

Eine weitere Möglichkeit ist der direkte Einsatz von Pentyliodid. Hier bei konnten jedoch eine leichte Verbesserung der Ausbeute (27% gegenüber 24%) erreicht werden.

Das für den Ether **42** gemessene NOE-Differenz-Spektrum zeigt eine Kopplung zwischen den 8-H-Protonen (Einstrahlungsfrequenz) und den Protonen an C-2, C-5 und C-7a. Dieses Ergebnis rechtfertigt die Darstellung des Stereozentrums an Position 5 gemäß Abb. 81.

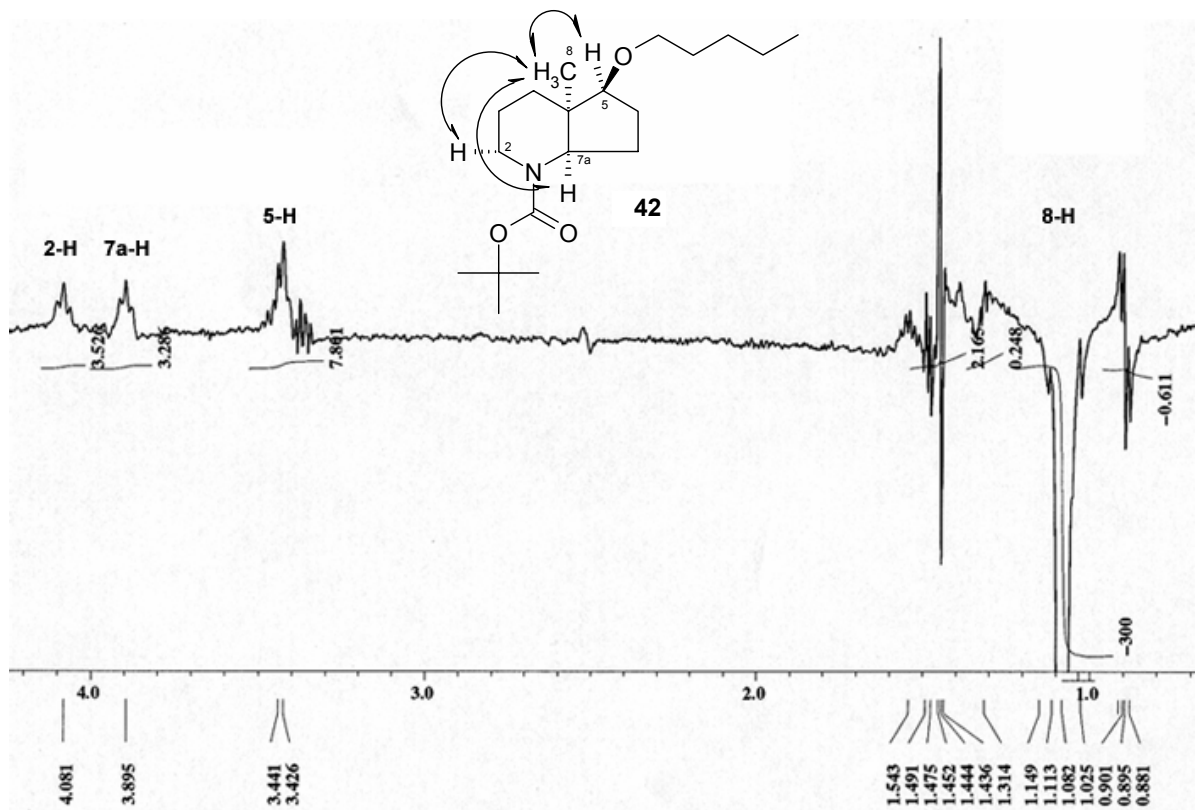


Abb. 81: NOE-Differenz-Spektrum von **42**

Bezüglich der Stereochemie von **42** läßt sich also folgendes festhalten:

- die beiden Ringe sind cis-verknüpft (Beweis durch Kopplung von 8-H mit 7a-H)
- die Methylgruppe an C-8 und der Pentyloxysubstituent sind trans-ständig (Beweis durch Kopplung von 8-H mit 5-H)

Zur Abspaltung der *Boc*-Schutzgruppe wurden drei unterschiedliche Versuche durchgeführt. Dabei wurde **42** einmal in Naphthalin über Nacht in einem Hochdruckgefäß erhitzt. Diese Methode blieb jedoch genauso ohne Erfolg, wie das Versetzen des Carbaminsäureesters mit 3 M Salzsäure in Ethylacetat. Erst die Verwendung von Trifluoressigsäure in Dichlormethan brachte in fast quantitativer Ausbeute die gewünschte Umsetzung zum entsprechenden Amin **43** (Abb. 82).

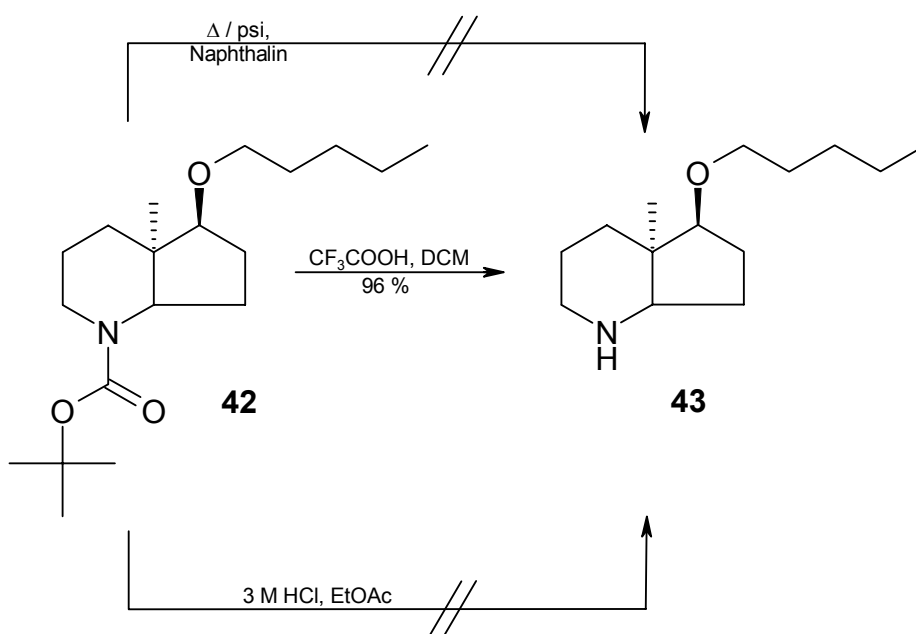


Abb. 82: Entfernung der Schutzgruppe

3.3.8.3 Estersynthese

Auch über einen Ester sollte ein entsprechender Alkylrest in das Molekül eingefügt werden. Der Alkohol **35** diente hier als Ausgangsverbindung für die Synthese dieses weiteren Seitenkettenanalogons.

Dabei wurde der Alkohol ähnlich wie bei der Ethersynthese mit Natriumhydrid in das Alkoxid überführt und anschließend mit Valeriansäurechlorid umgesetzt. Kaliumiodid katalysierte diese Reaktion.

Anschließend konnte von dem so dargestellten Ester **44** die Schutzgruppe mittels

Trifluoressigsäure in wasserfreiem Dichlormethan abgespalten werden. Auf diese Weise erhielt man das gewünschte Produkt **45**.

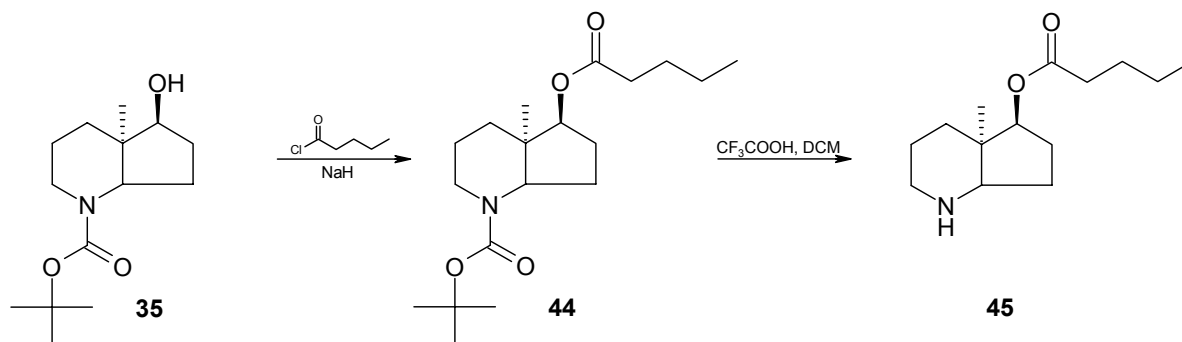


Abb. 83: Darstellung des Esters **45**

3.3.9 Ring-A-Analoga / Azasecosteroide

Als Grundkörper mit der Möglichkeit zum Einfügen lipophiler Seitenketten lässt sich der Baustein **29** prinzipiell auch am Piperidin-Stickstoff substituieren. Auf diese Weise wäre es möglich, entsprechende Substituenten einzufügen, die die Ringe A und/oder B imitieren können.

Hierzu wurden zwei Reaktionen durchgeführt. Einmal sollte die Basizität des Piperidinstickstoffs erhalten bleiben, während ein anderes Mal durch Überführung desamins in ein Amid selbige herabgesetzt wird.

Als Ring A/B-Baustein wurde für den ersten Fall 2-Phenylethylbromid verwendet, welches in der Theorie den Ring A komplett und den Ring B teilweise abdecken kann. Hierzu wurde **29** in Dichlormethan gelöst und mit Kaliumcarbonat versetzt. Anschließend wurde 2-Phenylethylbromid zugefügt und 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Auf diese Weise konnte das gewünschte Produkt **46** in mäßiger Ausbeute (23 %) dargestellt werden.

Um dem Piperidin-Stickstoff die Möglichkeit zu nehmen, unter physiologischen Bedingungen protoniert zu werden und so ein HEI zu imitieren, wurde **29** in das Amid **47** überführt. Nach Einführung stickstoffhaltiger Seitenketten an C-5 sollte sich auf diese Weise selektiv die Bedeutung einer Aminogruppe am „Ring D“ überprüfen lassen. Die Umsetzung gelang mit *m*-Methoxyphenyllessigsäurechlorid und Natriumhydroxidlösung in Toluol.

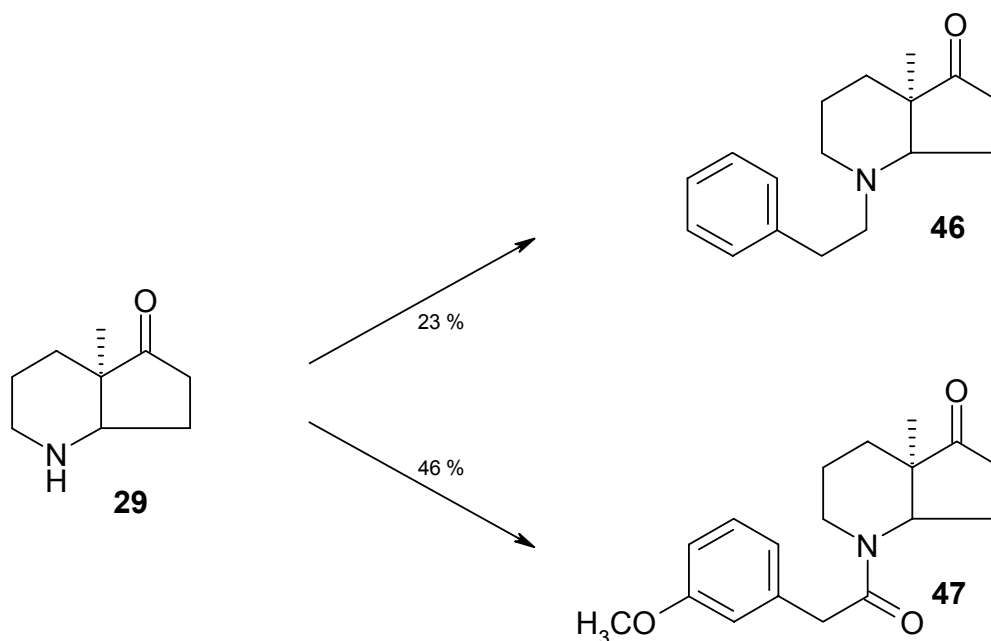


Abb. 84: Einführung von Ring-A-Analoga

Von diesen beiden Verbindungen wurde im Folgenden nur **46** weiter umgesetzt. Grund hierfür ist die Tatsache, daß erst nach einer erkennbaren antimykotischen Aktivität der Diamine untersucht werden sollte, welcher Stickstoff im Molekül für die Wirkung verantwortlich ist.

Die Verbindungen **46** und **47** kann man nomenklatorisch als *Azasecosteroide* bezeichnen, da sie die Ringe A, B, C und D des Sterolgrundgerüsts abdecken. *Seco* steht in diesem Fall für die Tatsache, daß eine bzw. mehrere Bindung(en) der Ringe fehlen, in diesem Fall die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zwischen Ring A und C.

Das tertiäre Amin **46** sollte mittels bereits erfolgreich durchgeführter Methoden zur Seitenkettensynthese zu den entsprechenden Derivaten umgesetzt werden. Dabei konnte in allen Fällen das gewünschte Produkt synthetisiert werden (Abb. 85). Die einzelnen Reaktionen wurden dabei auf die gleiche Weise durchgeführt, wie die für das sekundäre Amin **29** in den Kapiteln 3.3.7 und 3.3.8 beschriebenen.

Die so synthetisierten Azasecosteroide **48**, **49**, **50**, **51** und **52** wurden anschließend mittels Agar-Diffusionstest auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Obwohl diese Strukturen theoretisch bereits nah an die natürlichen Sterolstrukturen herankommen, blieb eine Wirkung auf die getesteten Mikroorganismen komplett aus.

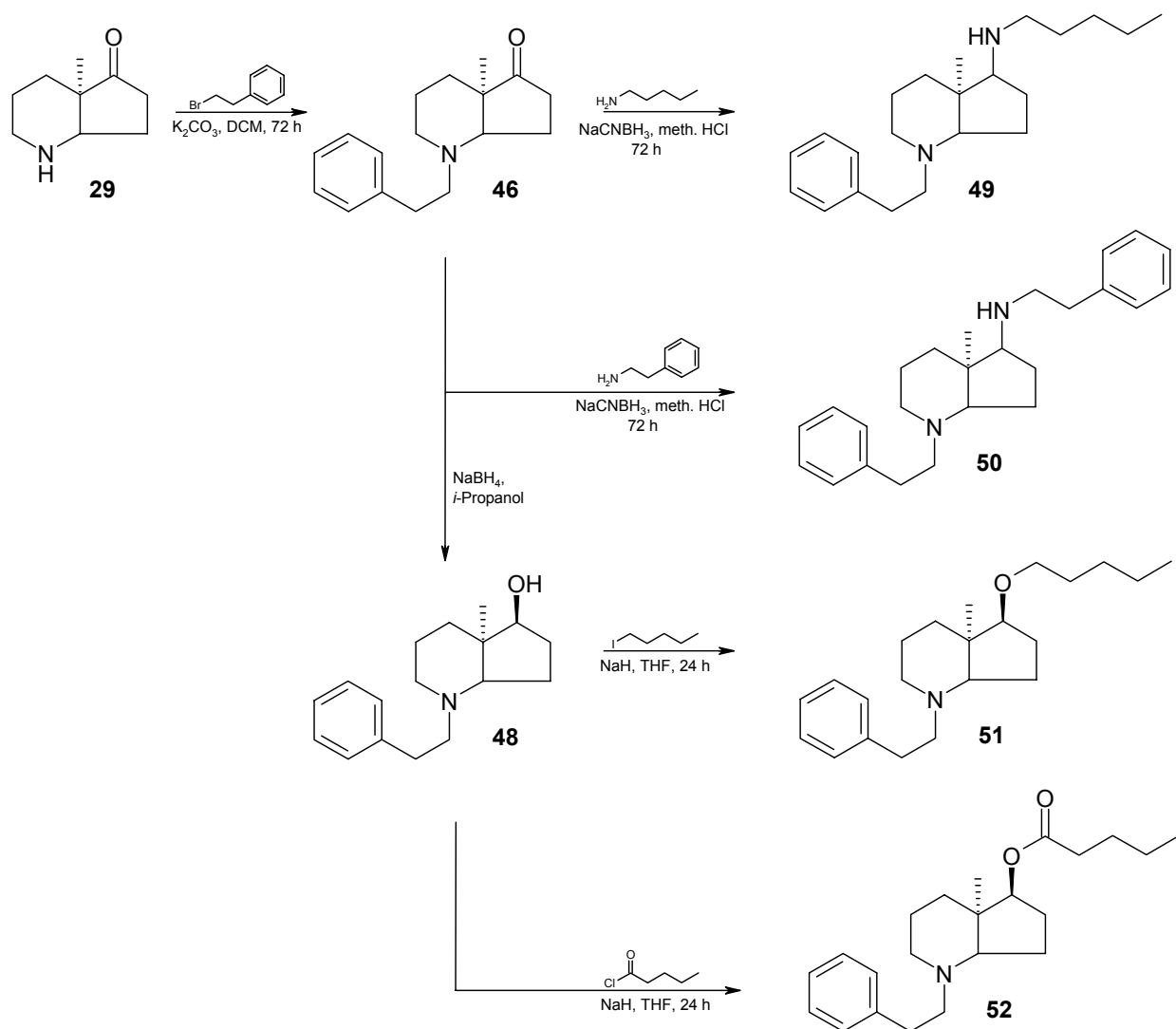


Abb. 85: Synthetisierte Azasecosteroide

3.4 4a-Methyl-2,5-dioxo-octahydro-[1]-pyridine

Wie in der Themenstellung (Kapitel 2) erwähnt, sollte sich der präparativ-chemische Teil dieser Arbeit eng an den biologisch aktiven Strukturen von *Burbie*³⁴ und *Salman*³⁵ orientieren. Diese haben ihren synthetischen Ursprung im Lactam **NS-8** (Abb. 55). Es lag also nahe, weitere vereinfachte Lactame zu synthetisieren. Auf diese Weise könnte man die erfolgreich durchgeführten Synthesewege der beiden Arbeiten nutzen und die so dargestellten Verbindungen direkt mit den dort beschriebenen Substanzen vergleichen.

Bereits in Kapitel 3.2 wurde diese Strategie angewandt. Die Aminoester **27** und **NS-20**, beide in Position 2 identisch substituiert, konnten so miteinander verglichen werden. Während **NS-20** mit Seitenkette, angulärer Methylgruppe und sterolgleicher

Stereochemie antimykotisch wirksam war, konnte für **27** bei gleicher Wirkstoffkonzentration keinerlei antimikrobielle Aktivität festgestellt werden (Abb. 86).

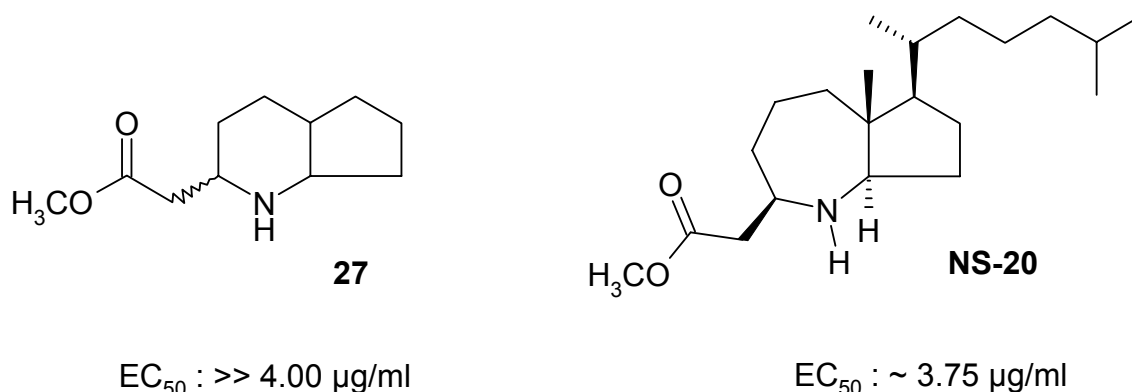


Abb. 86: Aminoester – Vergleich der biologischen Aktivität

Dies läßt den Schluß zu, daß die oben beschriebenen Unterschiede einen erheblichen Einfluß auf die Wirksamkeit haben. Die Vorstufe **23** sollte daher dahingehend „verbessert“ werden, daß zum einen das 4a-Proton gegen eine anguläre Methylgruppe ausgetauscht wird, zum anderen eine Carbonylgruppe in Position 5 die Einführung von Seitenketten möglich machen sollte (Abb. 87).

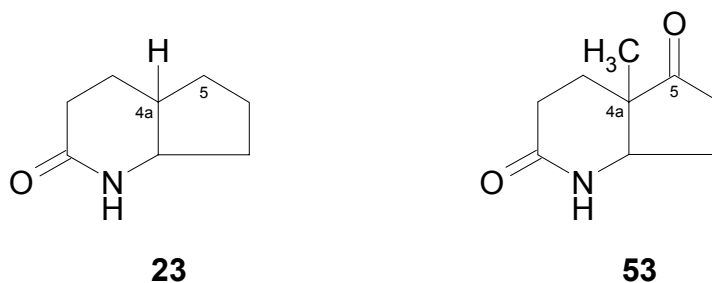


Abb. 87: „Verbesserung“ der Lactamvorstufe

3.4.1 Darstellung des Lactams **53**

Ähnlich wie bei der Synthese des Amins **29** wurde auch bei der Synthese des Lactams **53** von 2-Methyl-cyclopentan-1,3-dion als Ring-D-Baustein ausgegangen. Eine Strategie bestand in der Hydratisierung des bereits beschriebenen Nitrils **28** zum entsprechenden Amid **54**, welches anschließend unter Kondensation zum Enamid cyclisieren sollte. Über einen zweiten Weg sollte der Fünfring durch Umsetzung des 1,3-Diketons mit Acrylamid direkt in das Amid **54** überführt werden (Abb. 88).

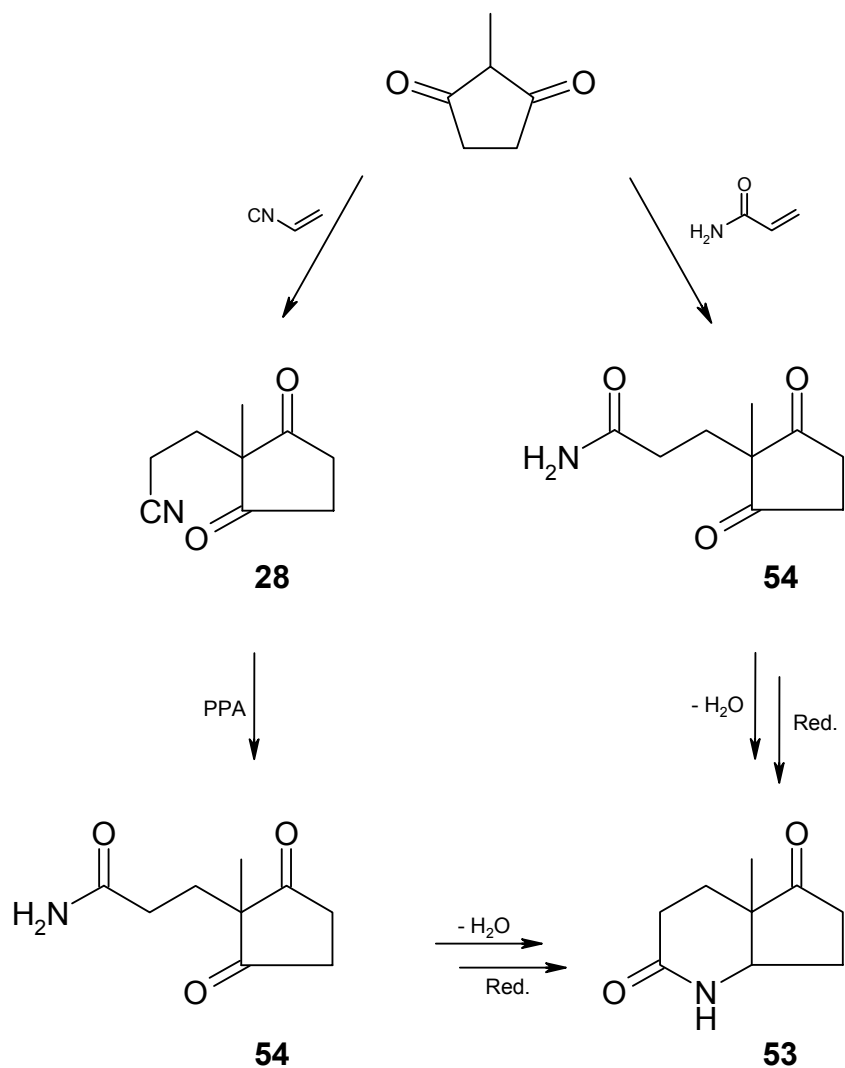


Abb. 88: Synthesestrategien für das Oxolactam **53**

In der Literatur finden sich verschiedene Methoden, um Nitrile zu den entsprechenden Amiden umzusetzen. So wird einmal Wasserstoffperoxid in alkalischem Medium benutzt.⁶³ Bei diesem Verfahren ist das Amid jedoch oft nur eine nicht zu isolierende Zwischenstufe, die meist zur korrespondierenden Carbonsäure weiterreagiert. Wird konzentrierte Schwefelsäure⁶⁴ oder Mangandioxid⁶⁵ benutzt, ist das Amid das Endprodukt.

Die Reaktion von **28** mit Mangandioxid nach Literaturvorschrift brachte leider nicht das gewünschte Ergebnis. Auf die Verwendung von konz. H₂SO₄ wurde im Hinblick auf die im Edukt noch vorhandenen Ketogruppen verzichtet.

Erfolg brachte schließlich die Verwendung von Polyphosphorsäure (PPA).⁶⁶ Hierbei wurden **28** mit PPA bei 100 °C für die Dauer von 30 Minuten erhitzt. Die anschließende Aufarbeitung ergab einen Feststoff. Im NMR mußte man feststellen,

daß nicht etwa das Amid **54** entstanden war. Vielmehr konnte das bereits cyclisierte Produkt **55** erkannt werden, das eine olefinische Bindung im Fünfring aufweist (Abb. 89). Ungewöhnlich ist die Lage dieser Doppelbindung. Während eigentlich die Entstehung eines Enamids (mit 1 olefinischem H im ^1H -NMR) zu erwarten gewesen wäre, sind im ^1H -NMR 2 olefinische Protonen zu erkennen. **55** ist als α,β -ungesättigtes Keton offensichtlich thermodynamisch stabiler als das Enamid. Diese Doppelbindungsisomerisierung ist offenbar auf die stark sauren Bedingungen zurückzuführen (vgl. 3.4.6). Zur Sättigung dieser olefinischen Bindung war es daher noch notwendig, diese Verbindung im Hochdruckautoklaven mittels Palladium (10 %) auf Aktivkohle zum vollgesättigten Lactam **53** zu hydrieren.

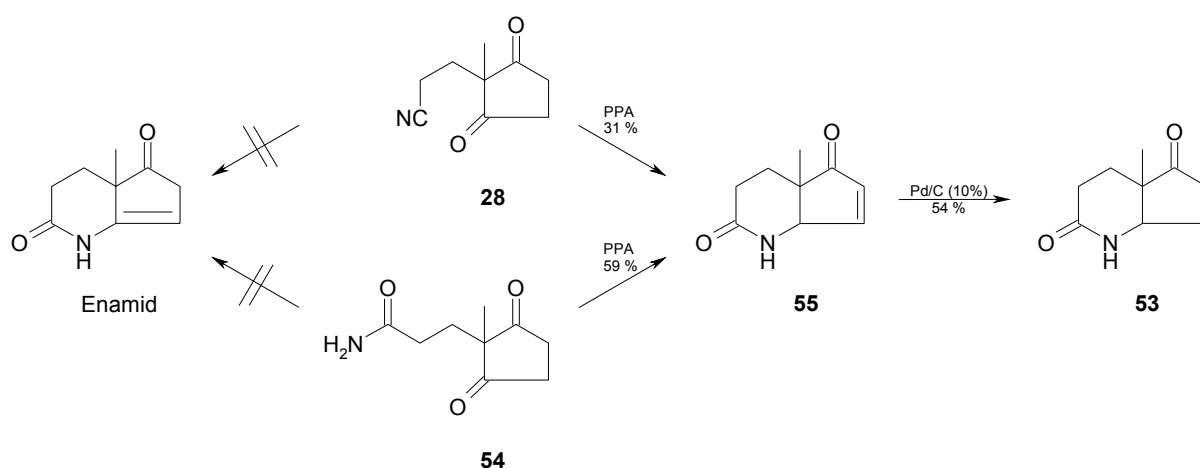


Abb. 89: Synthese des Lactams **53**

Eine Steigerung der Ausbeute von **55** konnte durch Verwendung des Amids **54** als Edukt erreicht werden, daß auf identische Weise mit Polyphosphorsäure behandelt wurde, wie oben bei **28** als Edukt beschrieben.

3.4.2 Darstellung von Seitenketten: Die Strategie

Auch der neue Lactam-Baustein **53** sollte mittels verschiedener Methoden mit Seitenkettenanaloga versehen werden. Hierbei wurde erneut die Substitution mit reinen Alkylresten versucht. Parallel dazu sollten die bei den Verbindungen **11** bzw. **29** erfolgreich eingesetzten *N*- und *O*-Alkylierungen durchgeführt werden.

3.4.3 Versuche einer C-C-Verknüpfung

Die Einführung einer reinen Kohlenstoffseitenkette hatte auch beim Lactam **53** oberste Priorität.

Dabei wurde erneut die Wittig-Reaktion, diesmal mit n-Butyllithium als Base, durchgeführt. Hierbei wurde **31** in THF vorgelegt und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Anschließend wurde eine äquimolare Menge Butyllithium in THF hinzugegeben. Das so hergestellte, tief rote Hexyltriphenylphosphoran wurde auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebracht und mit 0.2 Äquivalenten Lactam **53** versetzt. Das Reaktionsgemisch rührte nun bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 Stunden und weitere 6 Stunden bei Raumtemperatur. Wie in Kapitel 3.1.3 bzw. 3.3.5 zeigte die Aufarbeitung keine Umsetzung.

Auch die direkte Umsetzung von **53** in THF mit n-Butyllithium-Lösung in THF bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ misslang. Diese Reaktion hätte zwar nur eine C_4 -Alkylseitenkette geliefert, bei positivem Verlauf jedoch eine viel versprechende Verknüpfungsmethode aufgezeigt.

Ein letzter Versuch zur Darstellung der reinen Alkylseitenkette wurde mittels Alkinylierung der Carbonylgruppe unternommen. In der Literatur finden sich u.a. zwei Methoden, die Grundlage für die durchgeführten Versuche waren. Zum einen die von *Ishikawa* et al. beschriebene „katalytische Alkinylierung“ mittels Benzyltrimethylammoniumhydroxid (Triton B[®]).⁶⁷ Zum anderen die mit Hilfe von Zinkchlorid und Triethylamin begünstigte Addition terminaler Alkine an Carbonylverbindungen.⁶⁸

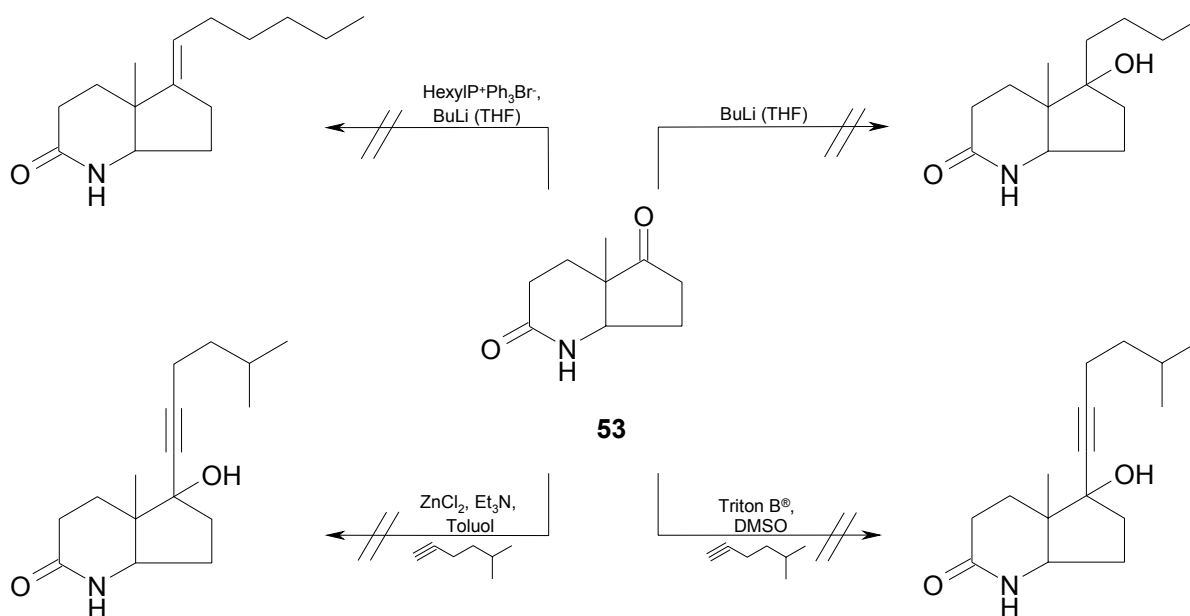


Abb. 90: Erfolgreiche Versuche einer Alkyl-Seitenketten-Darstellung

Dabei wurde im ersten Fall **53** und 5-Methyl-1-hexin in DMSO mit einer 40%igen Benzyltrimethylammoniumhydroxid-Lösung in Methanol versetzt. Dieses Alkin bringt die beim Fecosterol vorhandene Seitenkettenverzweigung in Position 25(27) mit. Dieser Ansatz blieb leider erfolglos.

Bei der zweiten Methode wurde das Alkin in Toluol wasserfreiem Zinkchlorid und Triethylamin bei 35 °C eine Stunde gerührt. Nach Zugabe von **53** in fester Form ließ man den Ansatz über Nacht weiterrühren, ebenfalls jedoch ohne Erfolg.

Da die NH-acide Lactamfunktion alle Reaktionen potentiell stören kann, wurde noch versucht diese mit einem Tritylrest zu schützen.⁶⁹ Jedoch entstand auch in diesem Fall das gewünschte Produkt nicht (Abb. 91).

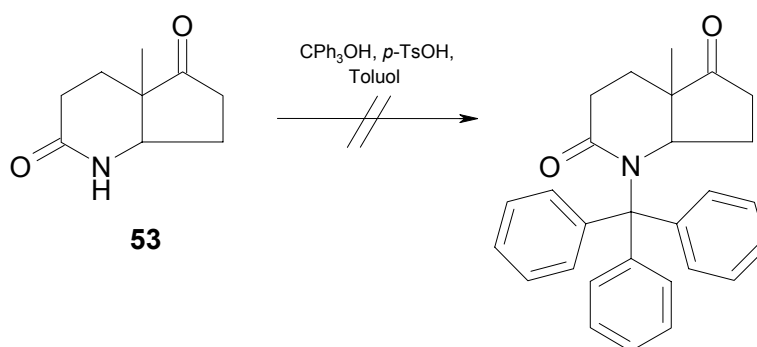


Abb. 91: Versuch zur Darstellung eines geschützten Lactams

Daher wurde anschließend wieder dazu übergegangen die Carbonylfunktion über die bei den Grundkörpern **11** bzw. **29** bewährten *N*- bzw. *O*-Alkylierungsmethoden zu substituieren.

3.4.4 5-*N*-Alkyl-4a-methyl-2-oxo-octahydro-[1]-pyridine

Mit Pentylamin sollte das Oxolactam **53**, wie im Kapitel 3.3.7 bei den *N*-Alkylierungen von **29** bereits ausführlich beschrieben, mit Hilfe von Natriumcyanoborhydrid und Zinkchlorid reaktiv aminiert werden.

Nach 24 Stunden zeigte die Umsatzkontrolle per GC jedoch, daß fast ausschließlich das Imin **56** entstanden war (Abb. 92). Die anschließende Reinigung per FSC gestaltete sich äußerst schwierig, da, wie das *Total Ion Count* (TIC) Chromatogramm zeigt, Amin und Imin fast gleichzeitig eluieren. Dieses Verhalten trat sowohl bei der lipophilen GC-Phase als auch bei der für die Reinigung des Ansatzes benutzten Kieselgelsäule auf.

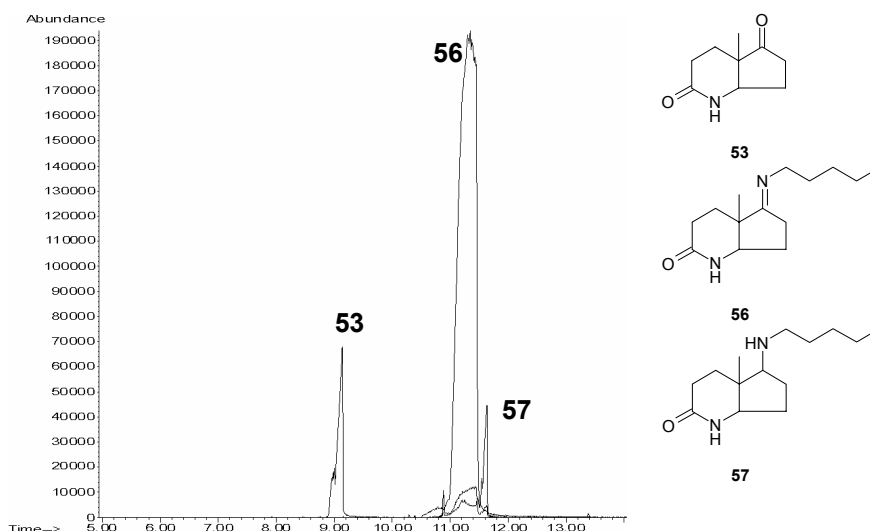


Abb. 92: GC-Umsatzkontrolle der reduktiven Aminierung von **53**

Trotzdem wurde nach dreimaliger Reinigung der entsprechenden Fraktionen eine für die Analytik ausreichende Menge des Amins **57** erhalten (Abb. 93).

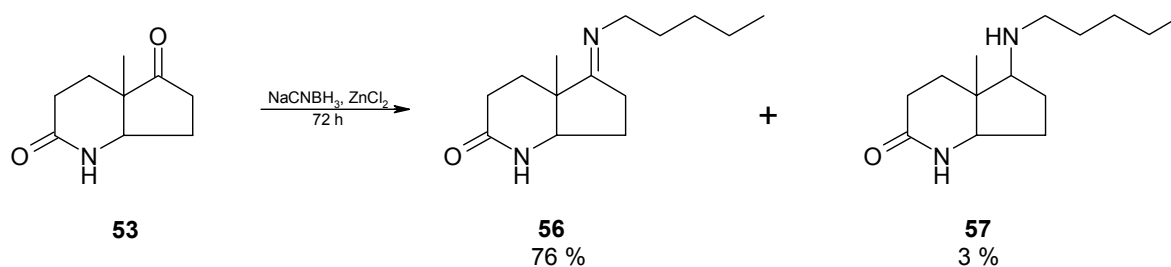
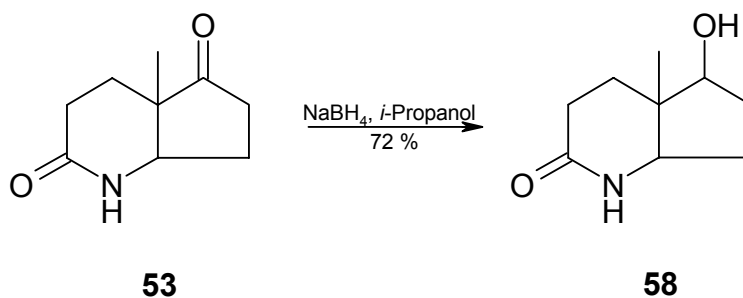


Abb. 93: N-Alkylierte 4a-Methyl-2-oxo-octahydro-[1]-pyrindine

Die Ansätze dieses Kapitels wurden erst in der Endphase dieser Arbeit durchgeführt. Die Möglichkeit, Phenylethylamin als Seitenkettenanalogon an den Grundkörper anzufügen (vgl. Kapitel 3.1.6 und 3.3.7), wurde daher nicht ausprobiert, sollte aber theoretisch möglich sein.

3.4.5 5-O-Alkylierte-4a-methyl-2-oxo-octahydro-[1]-pyrindine

Ähnlich wie im letzten Absatz beschrieben, sind O-alkylierte Derivate des Lactams **53** im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr synthetisiert worden. Lediglich der dafür notwendige Alkohol **58** wurde durch Reduktion der 5-Ketogruppe mittels Natriumborhydrid in Isopropanol noch dargestellt und soll hier erwähnt werden (Abb. 94).

Abb. 94: Synthese des Alkohols **58**

Betrachtet man die einfach durchzuführenden O-Alkylierungen der vorherigen Kapitel, müßten jedoch auch in diesem Fall entsprechend substituierte Derivate des Alkohols **58** leicht darstellen lassen.

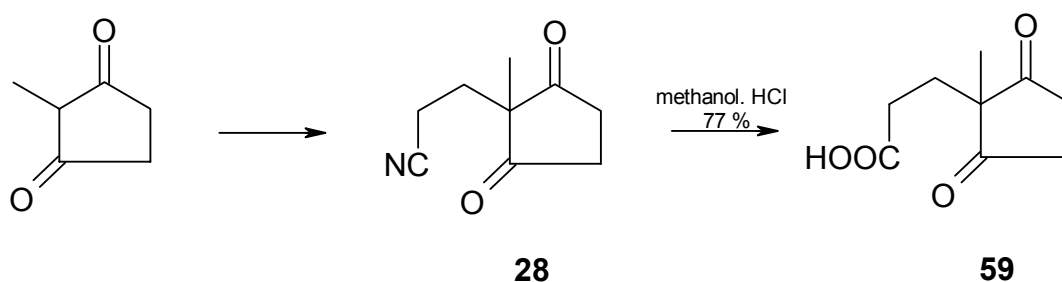
3.4.6 Ring-A-Analoga / Azasecosteroide

Neben dem Vorhandensein einer Seitenkette hat auch die Anwesenheit von Ring A/B-imitierenden Substituenten einen für eine antimykotische Wirksamkeit nicht zu unterschätzenden Einfluß. Daher lag es nahe, für die Lactam-Gruppe ebenfalls entsprechende Substituenten zu finden.

Dabei wäre einmal natürlich die in Kapitel 3.2.3 durchgeführte *Eschenmoser*-Alkenylierung über das Thiolactam ein theoretischer Ansatz. Dieser wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchgeführt.

Eine Substitution über den Lactamstickstoff wäre theoretisch auch möglich, jedoch nicht so einfach durchzuführen wie für das Amin **29**.

Ein eleganterer Weg wurde bereits 1963 von einer Arbeitsgruppe um *Brown* publiziert.⁵³ Bei der Synthese von 8-Azaestrogen und 8-Aza-19-norandrogenen wurde in ersten Schritten das bereits beschriebene Nitril **28** synthetisiert (vgl. Kapitel 3.3.1). Dieses wurde mit HCl-gesättigtem Methanol in den entsprechenden Ester überführt und ohne weitere Aufreinigung zur Carbonsäure **59** hydrolysiert (Abb. 95).

Abb. 95: Synthese der Carbonsäure **59** nach *Brown* et al.⁵³

In Xylol und unter Zuhilfenahme einer Dean-Stark-Apparatur kondensierte diese nun in einem weiteren Schritt azeotrop mit *m*-Methoxyphenylethylamin zum Enamid **60** (Abb. 96). Auf diese Weise wurde nicht nur der Ring C aufgebaut, sondern zusätzlich ein Ring-A/B-Analogon eingefügt.

Es wurde versucht, diese Substanzen nach Vorschrift darzustellen. In einem weiteren Ansatz sollte die Carbonylgruppe des Enamids **60** mit Kaliumborhydrid in situ zum korrespondierenden Alkohol **61** reduziert werden. Laut Literatur sollte es sich dabei um einen hellgelben Feststoff handeln. Es wurde jedoch nur ein rotbraunes Öl erhalten, das sich weder durch Umkristallisation noch durch säulenchromatographische Trennung reinigen ließ. Vermutlich verhinderten polymere Nebenprodukte die Kristallisation (vgl. Entstehung **64**). Mittels NMR und MS konnte die Verbindung dennoch als das beschriebene Produkt identifiziert werden.

Bei den Enamiden **60** und **61** ist zusätzlich noch hervorzuheben, daß die Doppelbindung nicht, wie man bei Verbindung **55** beobachten konnte, isomerisiert hat (vgl. 3.4.1). Grund dafür ist, daß bei diesen Reaktionen, anders als bei der Synthese von **55**, nicht in stark saurem Milieu, das eine Doppelbindungsisomerisierung begünstigt, gearbeitet wird.

Eine anschließende katalytische Hydrierung sollte laut Literatur stereospezifisch zum gesättigten *trans*-Lactam führen. Im Gegensatz zum *cis*-verknüpften Amin **29**, dessen Derivate sich allesamt als biologisch inaktiv erwiesen hatten, hätte man damit die dem Fecosterol entsprechende, natürliche Stereochemie dargestellt.

Das Enamid **61** wurde hierzu in einer Hochdruckapparatur mit Palladium auf Aktivkohle (30 %) bei 136 atm für die Dauer von 48 Stunden hydriert. Trotz mehrerer Versuche erfolgte keinerlei Umsetzung, nur das Edukt ließ sich zurückgewinnen. Der Grund für den Fehlschlag könnte in der nicht ausreichenden Reinheit des Eduktes liegen. Auch ein Wechsel des Reduktionmittels (Natriumcyanoborhydrid / pH 3), wie von *Borch et al.*⁷⁰ beschrieben, brachte nicht den gewünschten Erfolg. Die Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid führte zur Zersetzung des Edukts (Abb. 96). Mit der Absicht die Reduktion der Enamide in späteren Ansätzen doch noch erfolgreich durchzuführen, wurden über die Kondensationsmethode verschiedene Amine zum Aufbau entsprechender Lactam- bzw. Azasecosteroidstrukturen aus der Carbonsäure **59** eingesetzt.

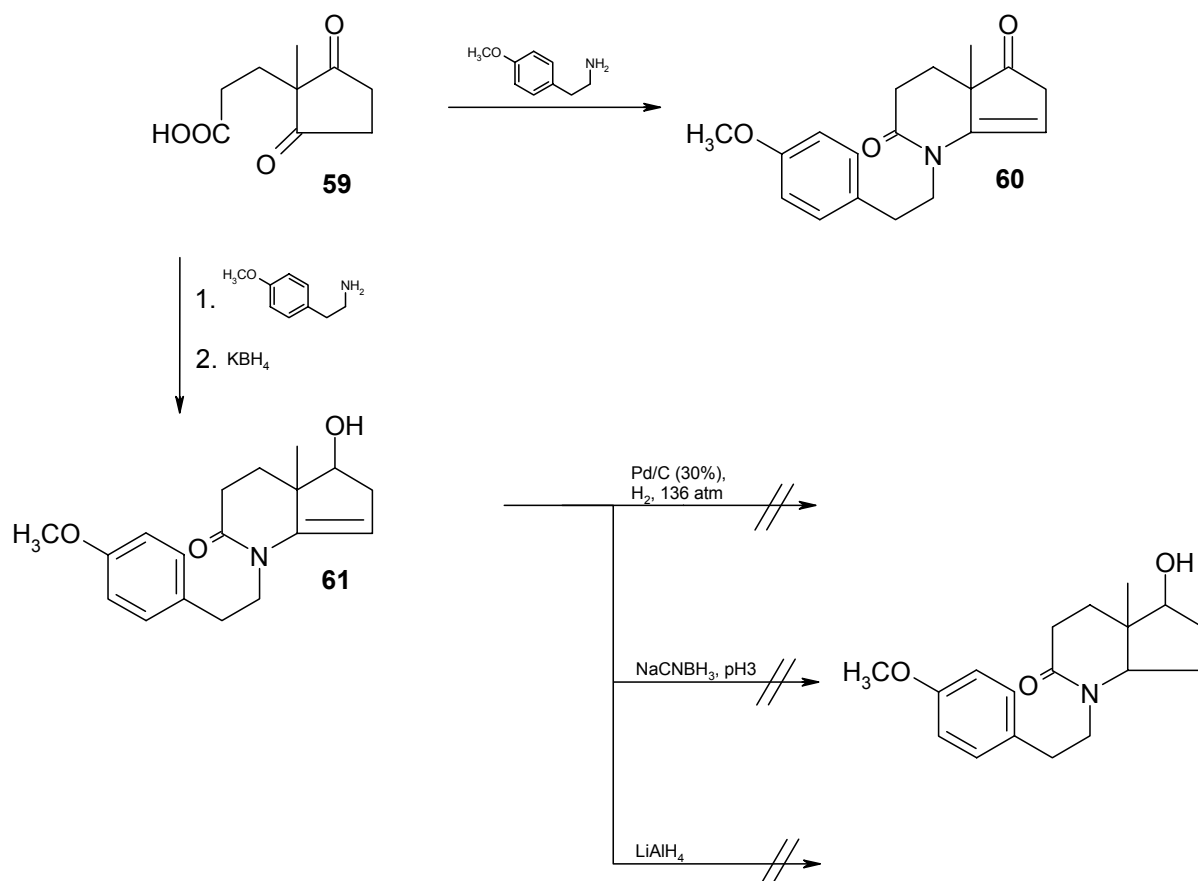


Abb. 96: Darstellung von **60** und **61** und erfolglose Versuche zur Reduktion des Enamids

Als erstes wurde **59** in einer wässrigen Ammoniak-Lösung in einem Hochdruckgefäß bei $200\text{ }^\circ\text{C}$ für die Dauer von 6 Stunden erhitzt. Die Darstellung des Enamids **62** als ungesättigtes Analogon zu **53** mißlang jedoch (Abb. 97).

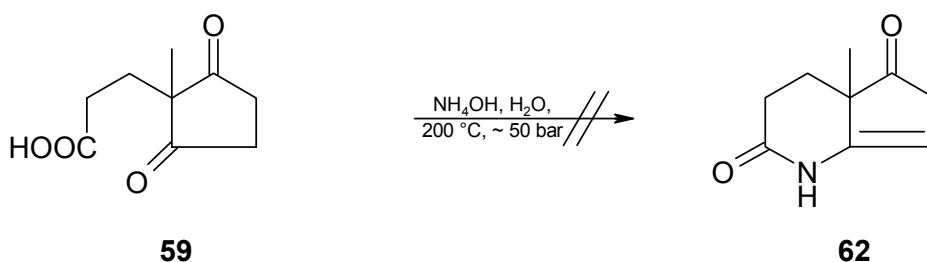


Abb. 97: Erfolgreicher Versuch zur Synthese des Enamids **62**

Die Kondensation mit Benzylamin sollte das Benzyl-geschützte Lactam **63** ergeben. Diese Verbindung wäre bei etwaigen metallorganisch katalysierten C-C-Seitenkettenverknüpfungen, unter dem Aspekt, daß der Tritylrest als Schutzgruppe

nicht einzuführen war (vgl. Kapitel 1.1.1), interessant gewesen. An dieser Reaktion zeigte sich jedoch, daß die bereits geäußerte Vermutung, die Edukte könnten polymerisieren, realistisch ist. Bei der Betrachtung der entsprechenden NMR-Spektren kommt man erst zu dem oberflächlichen Schluß, **63** sei tatsächlich entstanden.

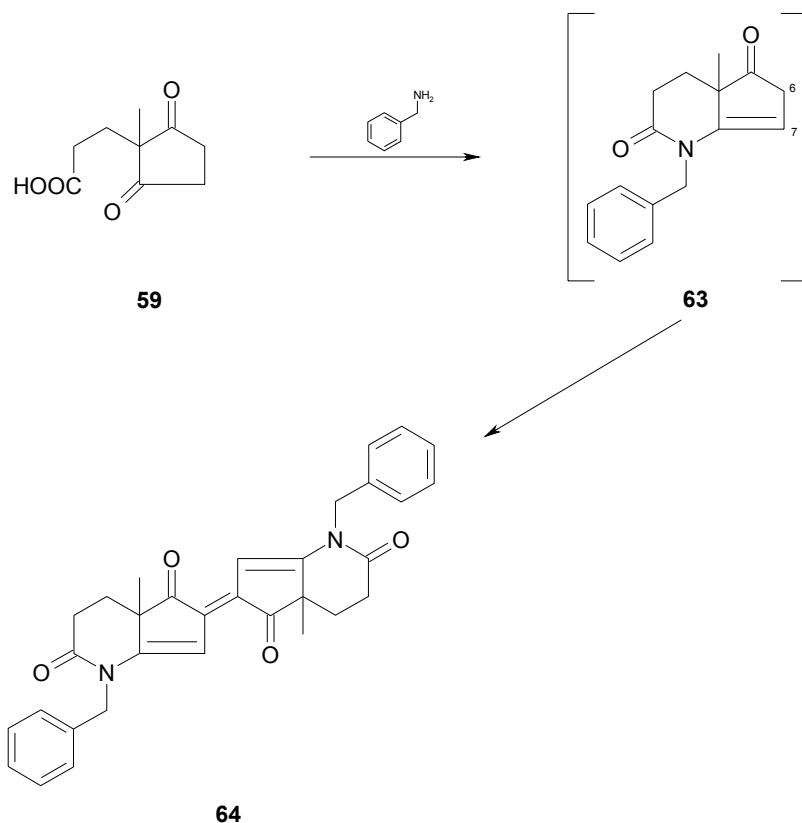


Abb. 98: Entstehung des Dimers **64**

Erst die fehlenden Signale der Wasserstoffatome der Methylengruppe an C-6 im ¹H-NMR-Spektrum beweisen das Vorhandensein des tief orangenen Dimers **64**, auch wenn dieses nur in verschwindend geringer Menge isoliert werden konnte (Abb. 98). Das Singulett des 7-H und ein quasi doppeltes Molekulargewicht (506 = 2x 255 – 4) im Massenspektrum sind als weiterer Beweis für diese These anzuführen.

4 Analytischer Teil

4.1 Das Testsystem

Der im Folgenden beschriebene Testablauf wird aufgeteilt in einen mikrobiologischen und einen analytischen Teil. Dabei werden die einzelnen Arbeitsschritte von der Aufzucht der Hefe bis zur chromatographischen Untersuchung des Sterolextraktes erläutert. Die zugehörigen Durchführungsbestimmungen zu den einzelnen Schritten sind in *Standard Operating Procedures* (SOP) im Experimentellen Teil dieser Arbeit niedergelegt. Schließlich wird auf die eigentliche Testphase und die gestesteten Substanzen eingegangen.

Kernstück des Testsystems ist die von Müller³⁷ entwickelte Methode zur Isolierung der Sterolfraction aus Hefe. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, beruht diese auf dem Prinzip der Festphasenextraktion (SPE). Dabei wird im Anschluß an eine alkalische Hydrolyse der Hefe das zentrifugierte Hydrolysat auf eine Polymerphase gegeben, wobei die Parameter so gewählt sind, daß nur die Sterolfraction an die Phase adsorbiert. Ein einmaliger Elutionsschritt mit einem kleinen Volumen an Ethylacetat desorbiert die Sterolfraction vollständig von der Phase und bewirkt eine starke Aufkonzentrierung. Gleichzeitig bewirkt die SPE eine Filtration der Probe.

Gegenüber anderen bekannten Verfahren zur Sterolisolierung konnten insbesondere durch den Einsatz der Festphasenextraktion und der LC-MS/MS sowohl die Qualität der Probenaufarbeitung als auch die Verlässlichkeit der Identifizierung neuer Sterole mit dieser neuen Methode deutlich verbessert werden.

4.2 Mikrobiologischer Teil

4.2.1 Der Testkeim

Mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* wurde ein nicht-pathogener Testkeim, der sich durch schnelles Wachstum und gute Aufarbeitbarkeit auszeichnet, gewählt. In weiten Teilen stimmt das Verhalten dieser Hefe mit dem von phyto- und humanpathogenen Pilzen gezeigten Verhalten überein, so daß die gefundenen Ergebnisse zumindest qualitativ übertragbar sein sollten.

In flüssiger Kultur wird eine auf der Oberfläche schwimmende Haut gebildet. Dieser zusammenhängende Zellverbund erlaubt ein vollständiges Abtrennen der Kultur vom Nährmedium durch Membranfiltration. Zudem ist bei Standkultur ohne Inhibition und

den gewählten Bedingungen eine ausreichende Bildung von Biomasse von ca. 80 – 120 mg innerhalb 72 Stunden gegeben. Damit ist auch gewährleistet, daß eine Untersuchung der Sterolfraction nach Inkubation mit einem Inhibitor – und damit einhergehender reduzierter Biomasse – bis zu einem Inhibitionsgrad von > 80 % (entsprechend 20 – 24 mg) möglich ist, um damit noch im Nachweisbereich der entwickelten Methode zu liegen.

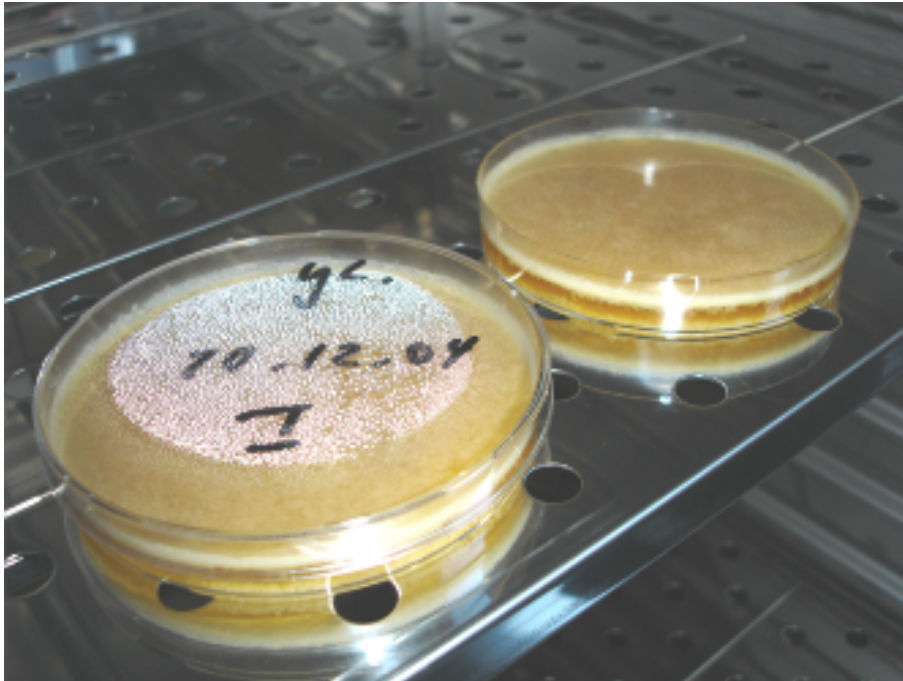


Abb. 99: Stammkulturen von *Yarrowia lipolytica* im Brutschrank

Yarrowia lipolytica wird in Flüssigkultur in einem Nährmedium nach Empfehlung der Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) kultiviert. Der eingesetzte Stamm „*Yarrowia lipolytica* DSMZ Nr. 1345“ wurde ebenfalls dort bezogen.

Zur Aufrechterhaltung der Vitalität wird der Stamm wöchentlich in frisches Medium überimpft. Dabei werden 100 µl Impflösung zu 30 ml Medium in eine Petrischale gegeben und in einem Brutschrank bei 28 °C bebrütet (Abb. 99). Auf diese Weise wird sichergestellt, daß sich die Hefe permanent in der log-Phase befindet und eine gleich bleibende Qualität des Testkeims gewährleistet ist.

4.2.2 Die Inkubation

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 und eine 1:100

Verdünnung in Ethanol. Die Zugabe der Stamm- bzw. Verdünnungslösungen erfolgt in 40 ml Nährmedium in Kulturflaschen mit *Capsenbergkappen*-Verschluß. Gemäß dem im Experimentellen Teil aufgeführten Pipettierschema kann ein Bereich von 0.02 – 4.00 µg/ml Wirkstoff im Medium abgedeckt werden. Durch die Wirkstoff- und die 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. In diesem Bereich zeigten einige der getesteten Substanzen keine Wirkung, so daß der untersuchte Konzentrationsbereich in diesen Fällen nach oben ausgedehnt wurde. So konnte auch bei Substanzen, die im abgedeckten Bereich keine Wirkung zeigten, eine mögliche Hemmwirkung auf die Ergosterol-Biosynthese der Hefe bestimmt werden.

Schließlich wird ein Inokulum von 100 µl Hefe-Stammkultur zugegeben, danach geschüttelt und inkubiert. Gleichzeitig zu der Testreihe werden zwei Kontrollen, welche nur mit 80 µl Ethanol versetzt sind, vorbereitet. Sie werden später einerseits zur Bestimmung des EC₅₀ herangezogen und dienen außerdem nach der Aufarbeitung als Sterolmuster-Blindprobe.

Nach erfolgter, ca. 72stündiger Inkubation erfolgt die Aufarbeitung der gebildeten Biomasse aller Proben. Dabei werden die Hefekuchen durch Vakuumfiltration an gewogenen Membranfiltern vom Medium abgetrennt und mit Wasser gewaschen. Hefekuchen und Filter werden gemeinsam 2 Stunden im Trockenschrank bei 90 °C getrocknet und anschließend gewogen. Die Netto-Auswaagen der Trockenbiomasse der Ansätze und der Kontrollen werden in einem Diagramm gegen die eingesetzte Wirkstoffkonzentration aufgetragen. Graphisch kann so ermittelt werden, ob die Testsubstanz im untersuchten Konzentrationsbereich eine antimykotische Aktivität aufweist. Die graphische Bestimmung der Konzentration, welche eine Halbierung der Biomasse gegenüber der Kontrolle verursacht, führt zum EC₅₀-Wert („*Effective Concentration*“). Er kann als Maß für die Wirkstärke herangezogen werden, im Vergleich mit anderen Testsubstanzen, welche auch unter denselben Bedingungen getestet wurden.

4.3 Analytischer Teil

4.3.1 Probenvorbereitung

Der getrocknete Hefekuchen samt Filter wird für das alkalische Aufschlussverfahren vorbereitet. Dazu wird er zunächst unter Zugabe von verdünnter HCl und Zugabe des internen Standards Cholesterol 30 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Aus praktischen Gründen hat es sich als sehr geeignet erwiesen diesen und den nachfolgenden Hydrolyse-Schritt im Rundkolben auf dem Sandbad mit aufgesetztem Steigrohr durchzuführen. Das Sandbad erfüllt neben der Heizfunktion und der Möglichkeit, viele Proben gleichzeitig aufzunehmen, die wichtige Funktion des Lichtschutzes der teilweise lichtempfindlichen Sterole.

Exkurs: Photolyseempfindliche Sterole

Unter UV-Licht-Einfluß kommt es bei Ergosterol und anderen Sterolen, die ein Cyclohexadien-Strukturelement aufweisen, zur Ringöffnung, wobei im Fall von Ergosterol Provitamin-D gebildet wird. Diese Reaktion ist reversibel. Bei weiterer Bestrahlung kann aus Provitamin D jedoch auch Lumisterol₂ bzw. Tachysterin entstehen (Abb. 100).

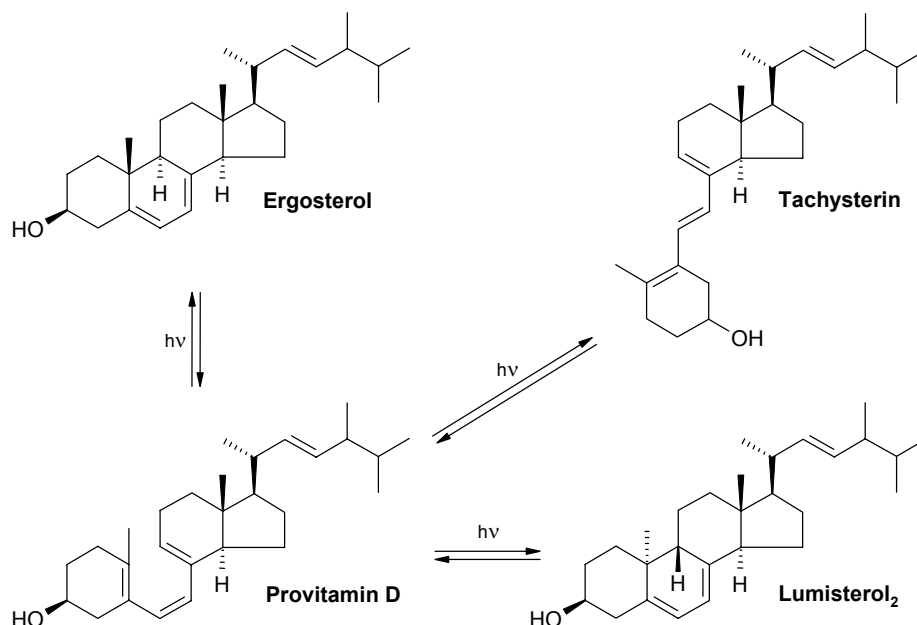


Abb. 100: Photolyse von Ergosterol

In Folge dieses ersten Einwirkens durch die verdünnte Säure löst sich der gequollene Hefekuchen vom Membranfilter ab. Daher kann dieser 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. Zellbestandteile am Ultra-Turrax werden mit dem restlichen Hydrolysereagenz in den Kolben zurückgewaschen. Anschließend wird erneut auf dem Sandbad unter Rückfluß erhitzt.

Diese alkalische Hydrolyse ist notwendig, da Sterole zwar u.a. in ihrer freien Form (als Alkohole), aber auch in gebundener Form, d.h. als Sterol-Fettsäureester oder Sterolglycoside, vorliegen können. Sterol-Fettsäureester sind jedoch sauer oder alkalisch hydrolysierbar, Sterolglycoside lassen sich durch saure Hydrolyse in die freien Sterole überführen. Diese freien Sterole sind als lipophile Neutralstoffe Bestandteil des so genannten „Unverseifbaren Anteils“ der Fettfraktion. Man ist somit in der Lage im Anschluß an den Verseifungsschritt mit alkoholischer Alkalihydroxidlösung die freien Sterole von den „verseifbaren“ Acyllipiden (Triacylglyceride, Phospholipide und Glycolipide) abzutrennen.

So werden nach beendeter Hydrolyse die Hydrolysate in Zentrifugengläser überführt und sofort zentrifugiert. An die Entnahme der noch warmen Zentrifugengläser schließt sich sofort die Sterolextraktion aus dem Zentrifugat mittels SPE an. Die SPE-Phase wird erst durch Aufgabe von Methanol und dann durch Zugabe eines Wasser-Ethanol-Gemisches vorkonditioniert. Es folgt die Probenaufgabe. Vor dem Trockenlaufenlassen der SPE-Kartusche werden unerwünschte Probenreste von der Säule gewaschen. Das bis dahin angefallene Eluat wird verworfen und anschließend die Sterole von der SPE-Phase mit Ethylacetat eluiert. Durch den Filtrationsschritt bei der SPE steht der gewonnene schwebstofffreie Sterolextrakt direkt für die Untersuchungen mittels GC-MS zur Verfügung.

4.3.2 Gaschromatographische Analytik des Sterolextraktes

Obwohl in unserer Arbeitsgruppe auch Untersuchungsverfahren wie HPLC-DAD und LC-MS/MS möglich sind, war für die in dieser Arbeit getesteten Substanzen das Routineverfahren GC-MS ausreichend, da bei keiner Probe neuartige Sterole gefunden wurden.

Die Analytik von Sterolen mittels gaschromatographisch gekoppelter Massenspektrometrie bietet neben einer hohen Empfindlichkeit und einer guten chromatographischen Auflösung strukturnaher Sterole zwei wichtige strukturaufklärende Parameter: Retentionszeiten in hoher Reproduzierbarkeit und

Generierung eines „MS-Fingerprints“, der mit der von Müller³⁷ angelegten Spektrendatenbank verglichen werden kann und damit eine rasche Identifizierung von Sterolen im Gemisch und in geringen Mengen zulässt.

Die massenspektrometrische Detektion der Sterole wurde im EI-Modus (*Electron Impact*) durchgeführt, wobei bei einer standardisierten Ionisierungsenergie von 70 eV eine typische Fragmentierung der Analyten stattfindet, aber auch deren Molekulargewicht noch klar bestimmt werden kann. Es ist keine Derivatisierung erforderlich.

Die zur Trennung von Sterolgemischen eingesetzte Methode beruht auf der Trennung an einer unpolaren DB-5 Kapillarsäule mit einem Temperaturgradienten, der bei 55 °C einsetzt und im Verlauf von 25 min. eine Endtemperatur von 300 °C erreicht.

4.4 Testergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 90 Substanzen, bei denen eine antimykotische Wirkung beschrieben bzw. diskutiert wurde, die aber bisher noch nicht auf eine mögliche Hemmung der Ergosterol-Biosynthese untersucht worden waren, getestet. Der Großteil der Testsubstanzen stammt dabei aus unserer Arbeitsgruppe, es wurden aber auch Verbindungen verschiedener anderer Arbeitsgruppen getestet.

4.4.1 Sterolmuster und Wachstum der Blindprobe

Bevor auf die verschiedenen Substanzklassen und deren Testergebnisse eingegangen wird, soll zunächst das Sterolmuster der unbehandelten Kontrolle von *Yarrowia lipolytica* in Ruhekultur vorgestellt werden.

In Ruhekultur erreicht die Hefe eine maximale Trocken-Biomasse von 120 – 130 mg unter den vorgegebenen Bedingungen. Daß nicht mehr Biomasse gebildet wird kann auf eine Sauerstoffverarmung des Mediums und/oder auf die im Kulturkolben limitierte Oberfläche zurückgeführt werden. Abb. 99 zeigt das Pilzmycel der zwei Dauerkulturen, das auf der Oberfläche des Mediums schwimmt.

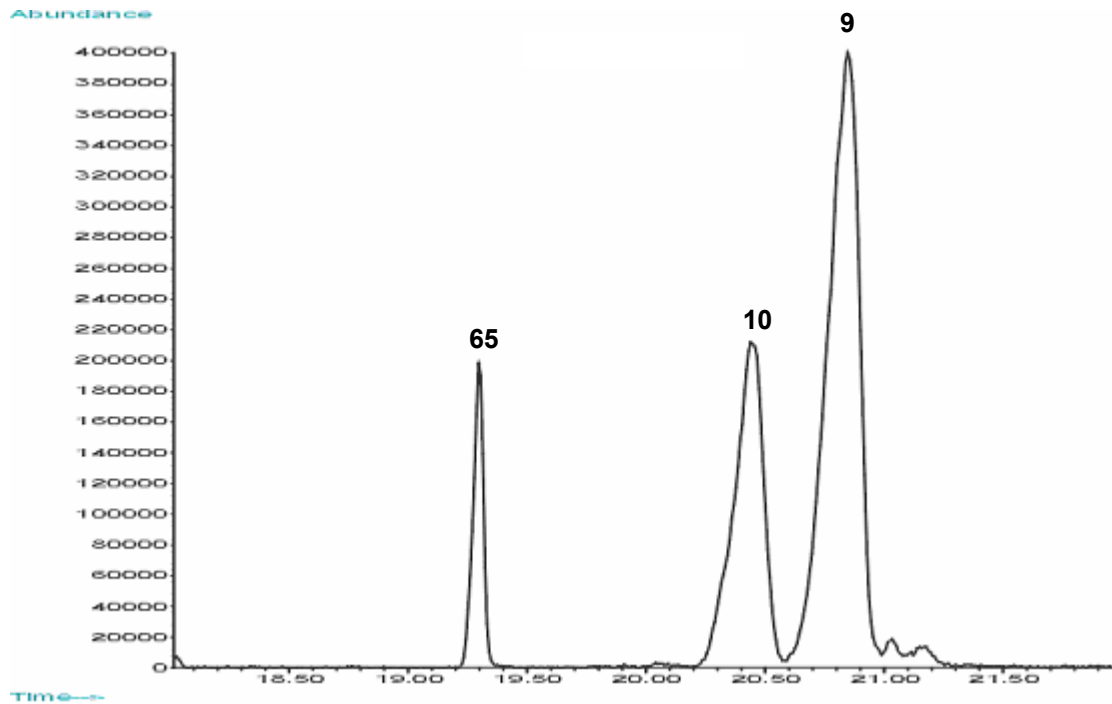


Abb. 101: TIC-Sterolmuster der Blindprobe

Als typische Sterole in der Kontrolle werden Ergosterol (**10**) und 24(28)-Dehydroergosterol (**9**) gefunden, wobei letzteres die direkte Biosynthesevorstufe des Ergosterols darstellt (Abb. 101). Zusätzlich dazu erkennt man den vorher eluierenden Internen Standard Cholesterol (**65**).

4.4.2 Getestete Substanzen aus der Arbeitsgruppe

4.4.2.1 Azasecosteroide

Die aus unserer Arbeitsgruppen stammenden Azasecosteroide entsprechen überwiegend dem in Abb. 102 gezeigten Grundtypus.

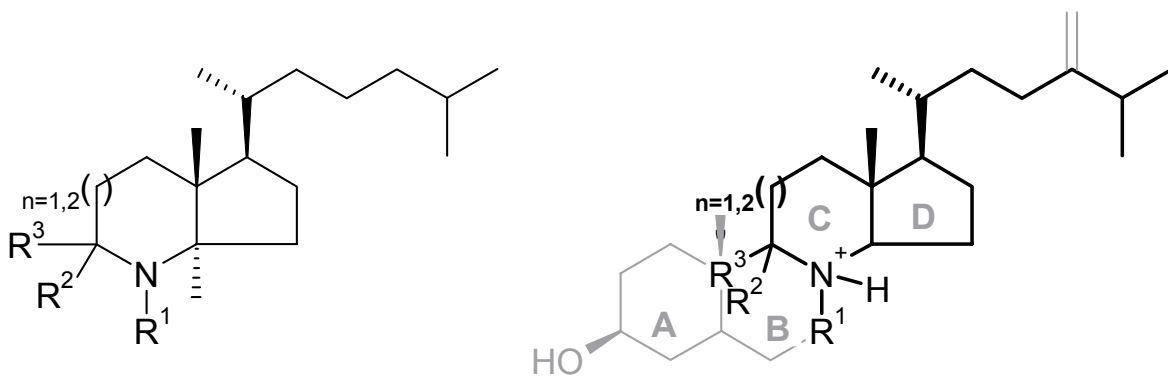


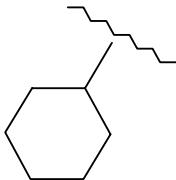
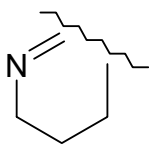
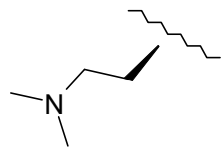
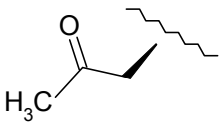
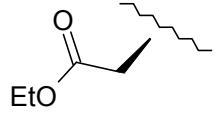
Abb. 102: Grundkörper der getesteten Azasecosteroide

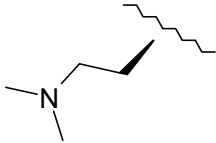
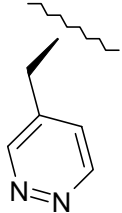
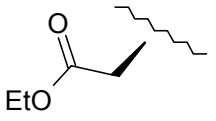
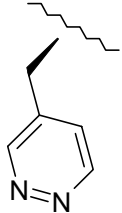
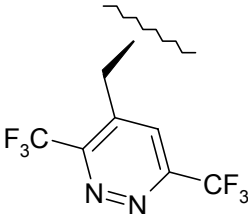
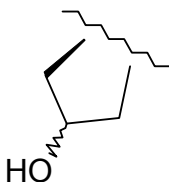
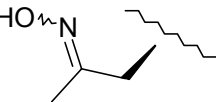

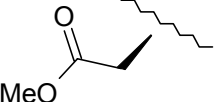
Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind diese Verbindungen bei physiologischen

pH-Wert am Stickstoff protoniert. Sie kommen damit als Mimikry des HEI, das bei der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerisierung auftritt, in Frage. Die Reste am Heterocyclus können dabei eventuell als partielle Imitationen der Ringe A und B fungieren.

Bei wirksamen Vertretern dieser Substanzklasse tritt ausnahmslos ein qualitativ gleiches Sterolmuster auf wie beim dem von Müller³⁷ getesteten Referenz-Wirkstoff Tridemorph. Sie können somit alle als Inhibitoren der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase postuliert werden. Eine aufgrund der Struktur denkbare, zusätzliche Hemmung der Sterol- Δ^{14} -Reduktase war bei den von Müller getesteten Azasecosteroiden nicht zu beobachten, was zusätzlich für eine hohe Spezifität spricht.

Die Wirkstärke der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen variiert mit den Substituenten R^1 und R^2 . Eine Übersicht über EC_{50} und Substituenten ist in Tabelle 3 aufgeführt. Bereits von Müller gestestete Azasecosteroide, die zum Vergleich herangezogen wurden, sind mit der entsprechenden Literaturstelle ³⁷ gekennzeichnet.

	R^1	R^2	R^3	n	EC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	Zielenzym
JCB-35		H	H	1	> 4.00	kein SBI
JCB-37			H	1	> 4.00	kein SBI
NS-51	H		H	2	> 4.00	$\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ - Isomerase
NS-57	CH_3		H	2	> 4.00	kein SBI
NS-61	H		H	2	~ 0.90	$\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ - Isomerase

	R ¹	R ²	R ³	n	EC ₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
NS-68	CH ₃		H	2	> 4.00	Δ ⁸ →Δ ⁷ - Isomerase
NS-69	H		H	2	~ 0.75	Δ ⁸ →Δ ⁷ - Isomerase
NS-70	CH ₃ CH ₂		H	2	> 4.00	kein SBI
NS-72	CH ₃		H	2	~ 0.20	Δ ⁸ →Δ ⁷ - Isomerase
NS-73	H		H	2	> 4.00	kein SBI
NS-76			H	2	~3.30	Δ ⁸ →Δ ⁷ - Isomerase
NS-77	CH ₃		H	2	~ 0.35	Δ ⁸ →Δ ⁷ - Isomerase
NS-79			H	2	> 4.00	kein SBI
NS-80	H	H	H	2	> 4.00	kein SBI
NS-81	CH ₃	H	H	2	~ 2.20	Δ ⁸ →Δ ⁷ - Isomerase

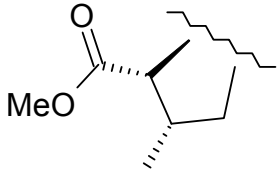
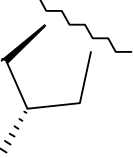
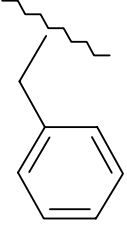
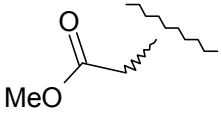
	R ¹	R ²	R ³	n	EC ₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
NS-82			H	2	~ 1.10	Δ ⁸ →Δ ⁷ - Isomerase
NS-87			H	1	> 4.00	kein SBI

Tabelle 3: Azasecosteroide in der Testung

Wie Tabelle 3 zeigt, lassen sich deutliche Unterschiede in der Wirkstärke feststellen. In Abhängigkeit von den Substituenten R¹ und R² kann diese in einem EC₅₀-Bereich von 0.2 µg/ml bis über 4.0 µg/ml liegen.

Obwohl die Anzahl der untersuchten Verbindungen noch keinen umfassenden Rückschluß über Struktur–Wirkungs–Beziehungen zulässt, lassen sich folgende Beobachtungen hervorheben:

- bei den Substanzen, die sich nur aufgrund eines unterschiedlichen Restes R¹ (*N*-Substituent) unterscheiden, weisen die mit Methylsubstituenten die höchste antimykotische Aktivität auf. Dazu gehören **NS-69/72**, **NS-80/81**, **NS-20**³⁷/**36**³⁷/**79/87** (unterstrichen R¹ = Methyl). Diese Erkenntnis wurde bereits von Müller gemacht. Abb. 103 zeigt drei von ihm getestete Azasecosteroide mit den jeweiligen EC₅₀-Werten.
- gegen diese These sprechen die Ergebnisse von **NS-53**³⁷/**57**, bei denen das sekundäre Amin **NS-53**³⁷ aktiver ist als die *N*-Methylverbindung **NS-57**.
- bei **NS-61/70** liegt die Methylverbindung nicht vor. Festzuhalten ist jedoch, daß das sekundäre Amin **NS-61** wesentlich aktiver ist als die strukturgleiche, *N*-ethylierte Verbindung **NS-70**.
- hervorzuheben sind ferner die Verbindungen **NS-69** und **NS-73**. Beide besitzen als R¹ einen Pyridazin-4-yl-methyl-Substituenten, der bei **NS-73** zusätzlich in den Positionen 3 und 6 trifluormethyliert ist. Während der unsubstituierte Pyridazinrest

zu einer hohen Aktivität der Verbindung beiträgt, bewirken die zwei Trifluormethylreste einen kompletten Wirkungsverlust. **NS-72** als *N*-methyliertes Analogon zu **NS-69** war mit einer EC₅₀ von 0.2 µg/ml in vitro das potenteste aller getesteten Azasecosteroide.

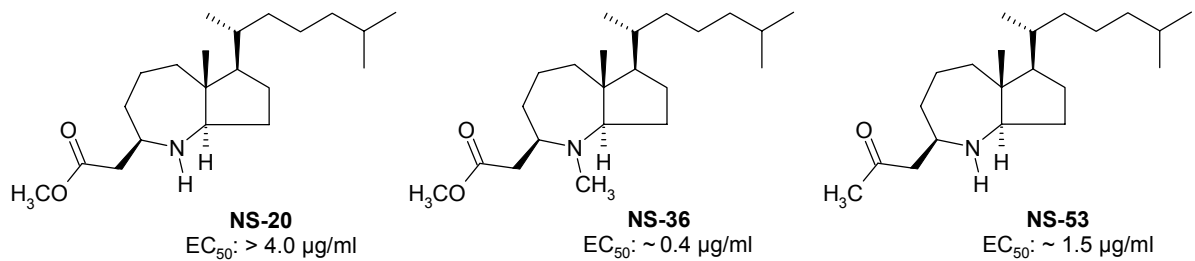


Abb. 103: Strukturen und EC₅₀-Werte der genannten von Müller getesteten Azasecosteroide

Abb. 104 zeigt das *Extracted Ion Chromatogram* (XIC), das nach der Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit **NS-81** erhalten wird. Es ist exemplarisch für alle antimykotisch wirksamen Substanzen dieser Substanzklasse.

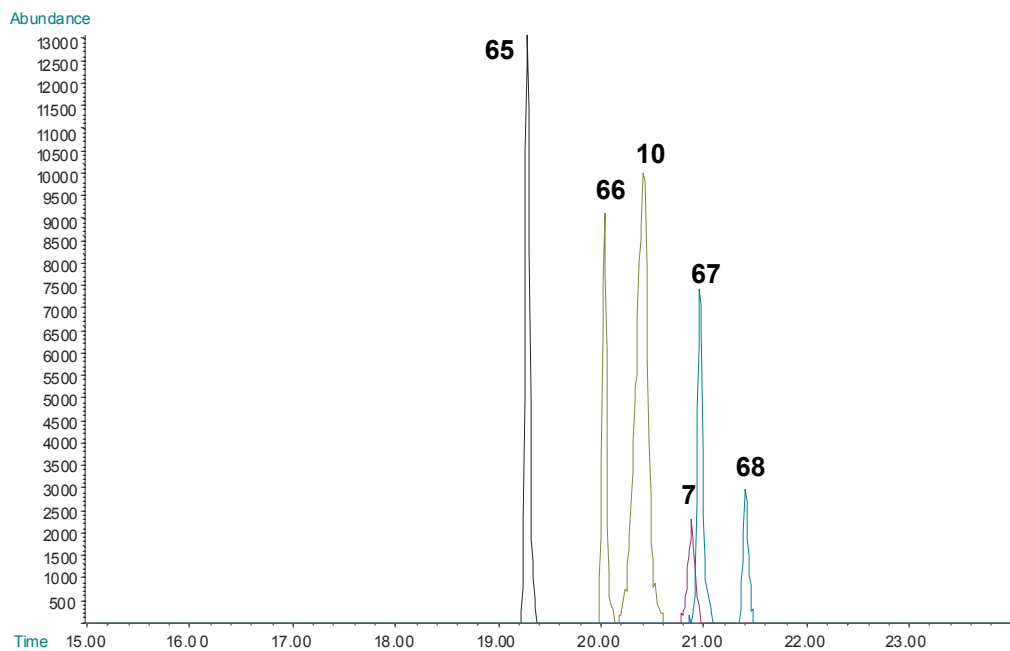


Abb. 104: XIC-Sterolmuster von **NS-81** (1.5 µg/ml)

Alle antimykotisch aktiven Verbindungen dieser Substanzklasse sind zweifelsfrei Inhibitoren der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase. Dies kann dadurch belegt werden, daß die natürlichen Substrate dieses Enzyms akkumulieren und anhand der von Müller angelegten Massenspektren-Datenbank³⁷ identifiziert werden können. Es handelt sich dabei neben Ergosterol (**10**) um ausschließlich Δ^8 -Sterole wie Lichesterol (**66**)

und Fecosterol (7).

Lichesterol (66) ist ein so genanntes anormales Sterol, d.h. es stellt keinen Ergosterol-Precursor dar, sondern wird in Folge einer (durch Ausfall eines oder mehrerer enzymatischen/r Schritte/s) unvollständigen Biosynthese aufgebaut (Abb. 105).

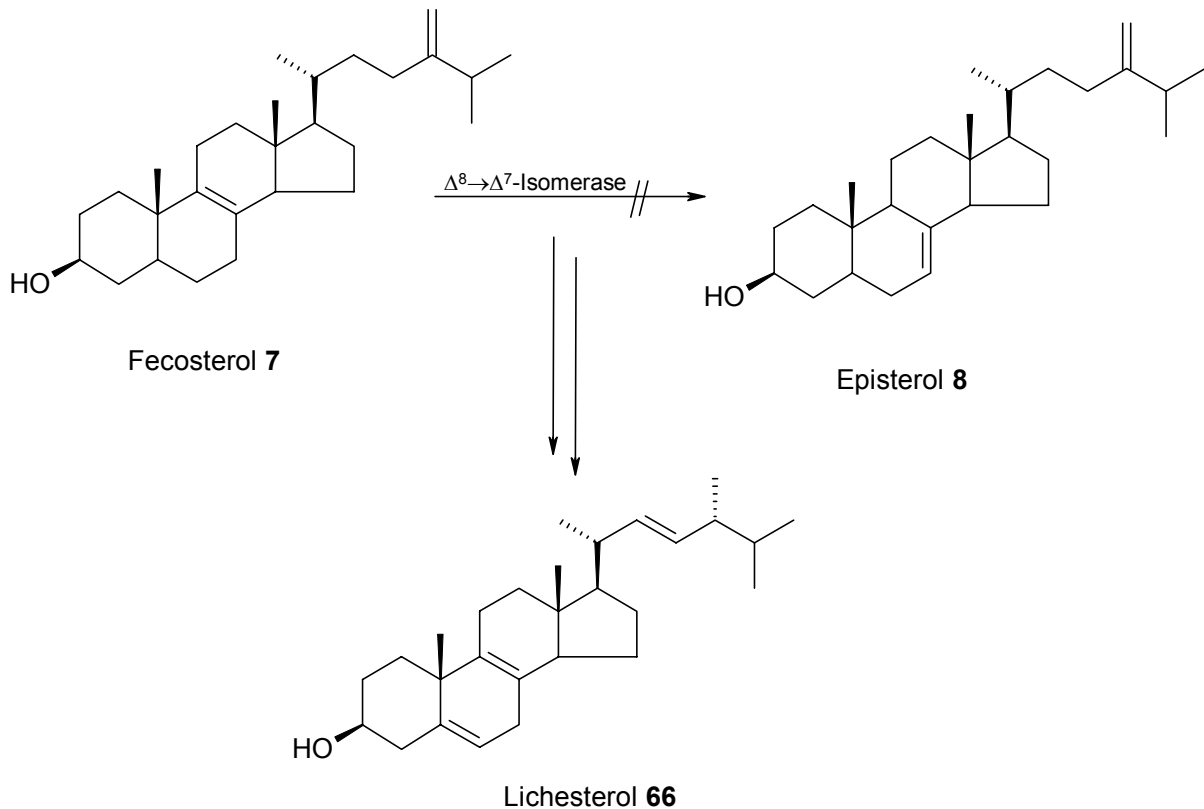
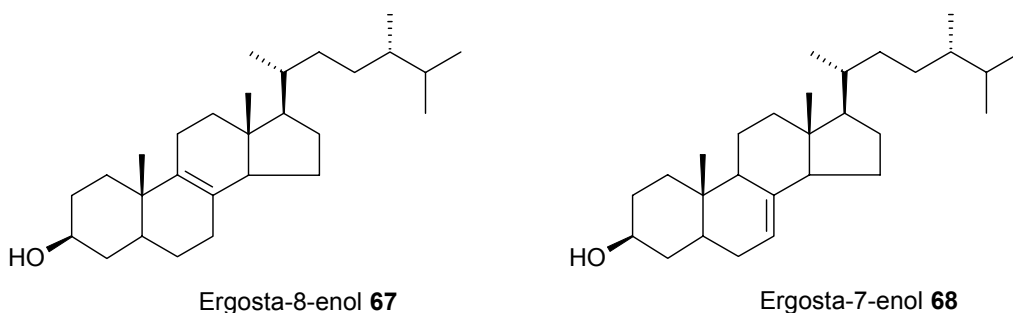


Abb. 105: Bildung von Lichesterol nach $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibition

Ergosta-8-enol (67) ist ebenfalls ein Sterol, das während der ungestörten Ergosterol-Biosynthese nicht auftritt, sondern nur unter Inhibition der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase. Sein Auftreten kann also zusätzlich als Indikator für eine spezifische Hemmung dieses Enzyms angesehen werden.



Wie bereits erwähnt, werden die Konzentrationen der Testsubstanzen im für den Pilz subletalen Bereich gewählt. Dies erklärt das Auftreten des ebenfalls untypischen Sterols Ergosta-7-enol (**68**), das wohl durch Umsetzung von Ergosta-8-enol (**67**) durch nicht inhibierte $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase entstanden ist. Sein Auftreten geht mit höheren Testsubstanzkonzentrationen logischerweise auch zurück.

4.4.2.2 Azasterole

Im Rahmen seiner Dissertation synthetisierte Gans²⁴ aus unserer Arbeitsgruppe das als antimykotisch bekannte⁷¹ marine Alkaloid *Plakinamin B* (**MG-47**) sowie einige Derivate davon.

Die Arbeit an dem in Abb. 106 dargestellten Grundkörper wurde von Renard⁷², von der einige der getesteten Substanzen stammen, fortgesetzt.

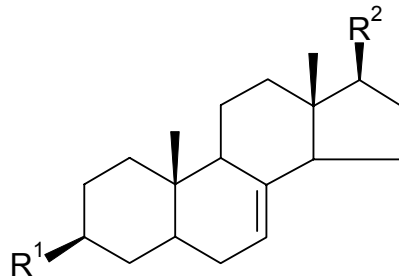
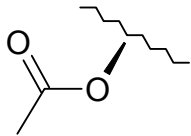
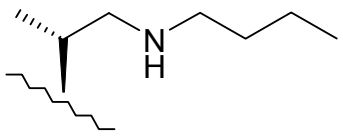
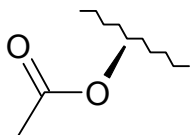
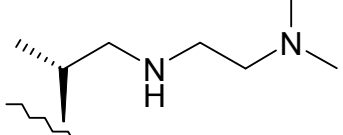
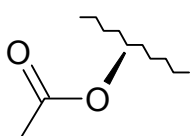
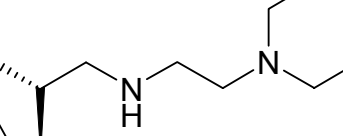
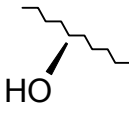
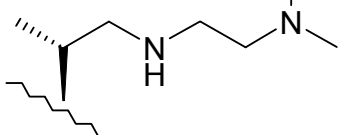
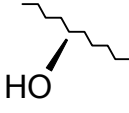
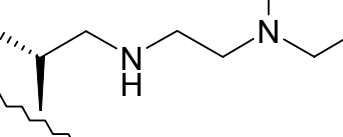
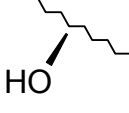
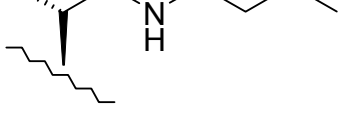
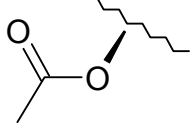
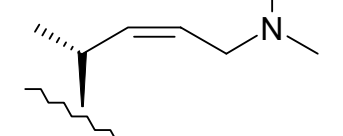


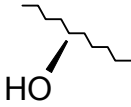
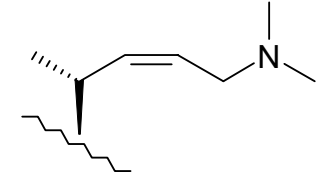
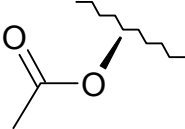
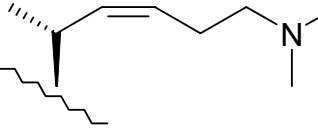
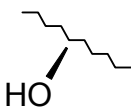
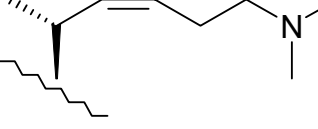
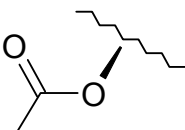
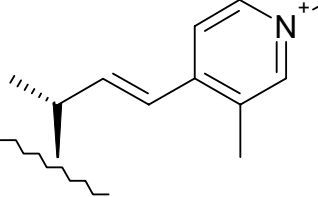
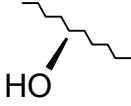
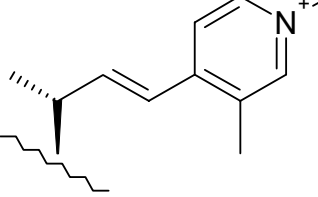
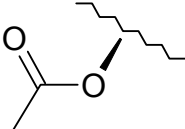
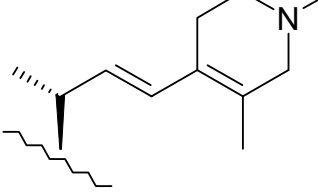
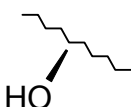
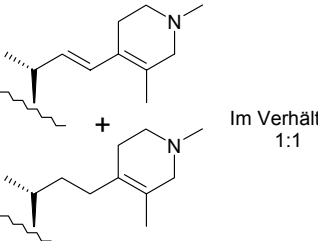
Abb. 106: Grundstruktur der getesteten Azasterole

Für diese Substanzen postulierte Müller eine Inhibierung der C-24-Methyltransferase, welche die Sterolseitenkettenmethylierung katalysiert.³⁷

Die getesteten und in Tabelle 4 aufgeführten Substanzen leiten sich von einem Cholesta-7-enol-Grundgerüst (Abb. 106) ab und unterscheiden sich nur durch unterschiedliche Substitution in den Positionen 3 (**R¹**) und 17 (**R²**).

	R¹	R²	EC₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
DR-97			~ 0.06	C-24-Methyltransferase

	R ¹	R ²	EC ₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
DR-113			~ 3.90	kein SBI
DR-114			> 4.00	kein SBI
DR-116			> 4.00	kein SBI
DR-132			~ 1.80	C-24-Methyl- transferase
DR-133			> 4.00	kein SBI
DR-137			~ 0.10	C-24-Methyl- transferase
MG-18			~ 2.20	C-24-Methyl- transferase

	R ¹	R ²	EC ₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
MG-18H			~ 0.20	C-24-Methyltransferase
MG-22			> 4.00	kein SBI
MG-22H			~ 0.80	C-24-Methyltransferase
MG-34			~ 0.80	Δ ²⁴⁽²⁸⁾ -Reduktase-Inhibitor
MG-34H			~ 0.30	C-24-Methyltransferase
MG-35			> 4.00	kein SBI
MG-35-1		 Im Verhältnis 1:1	~ 1.00	C-24-Methyltransferase

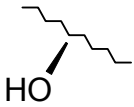
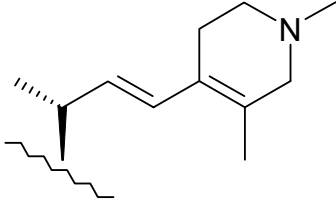
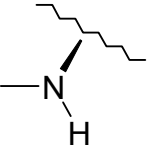
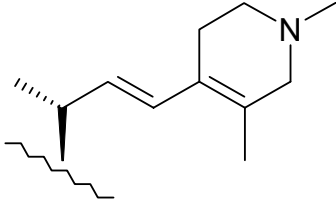
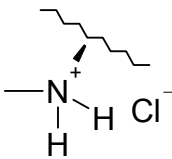
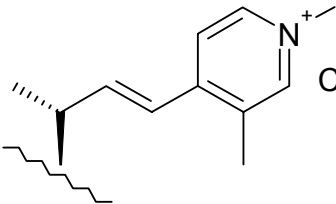
	R ¹	R ²	EC ₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
MG-35H			> 4.00	C-24-Methyltransferase (noch erkennbar)
MG-47			> 4.00	kein SBI
MG-47-2			> 4.00	kein SBI

Tabelle 4: Azasterole in der Testung

Wie bei den getesteten Azasecosteroiden läßt der Umfang der getesteten Azasterole ebenfalls keine abschließenden Aussagen hinsichtlich Struktur–Wirkungs–Beziehungen zu. Dennoch können auch bei dieser Testreihe folgende interessante Beobachtungen gemacht werden:

- von den Substanzpaaren mit strukturgleichem Substituenten R² sind ausnahmslos diejenigen stärker antimykotisch wirksam, die als R¹ eine freie Hydroxy-Gruppe tragen (im Folgenden unterstrichen). Hierzu zählen **MG-18/18H**, **MG-22/22-H**, **DR-113/137** und **DR-114/132**.
- selbst bei **MG-35H** ist die Akkumulation des für den Hemmmechanismus charakteristischen Cholesta-5,7,24-trienols noch zu erkennen. Bei dessen acetylierten Analogon **MG-35** ist dies nicht mehr der Fall. Sättigt man selektiv eine Doppelbindung, wie teilweise bei **MG-35-1** durchgeführt, so erhält man einen deutlich potenteren Inhibitor der C-24-Methyltransferase als beim ungesättigten Analogon **MG-35H**.
- verlängert man die Seitenkette über ihre natürliche Länge hinaus, so scheint dies bei Einführung eines zusätzlichen Kettenglieds die Wirksamkeit nicht zu

beeinträchtigen (**DR-137/132**). Bei einer Verlängerung um zwei Glieder verliert die Substanz hingegen ihre Hemmwirkung (**DR-133**).

- trotz einiger gegenteilig lautender Publikationen konnte für das Hauptalkaloid Plakinamin B weder für die Base (**MG-47**) noch für das Hydrochlorid (**MG-47-2**) eine antimykotische Aktivität festgestellt werden. Es soll jedoch betont werden, daß es sich hierbei um ein testkeimspezifisches Phänomen handeln könnte, da die Substanz am Keim *Yarrowia lipolytica* vorher noch nicht getestet worden war. Darüber hinaus zeigte sich die Hefe in Vortests (Agar-Diffusion) als durchaus empfindlich gegenüber beiden Verbindungen. Dieses Resultat konnte jedoch trotz mehrerer unabhängiger Testläufe mit dem beschriebenen Testsystem nicht bestätigt werden.
- während **MG-34H** ein starker Inhibitor der C-24-Methyltransferase ist, wurde für dessen acetyliertes Analogon **MG-34** die eigentlich nach den vorstehenden Ergebnissen zu erwartende Wirkungsminderung nicht beobachtet. Die nach Inkubation mit **MG-34** detektierten Sterole lassen vielmehr den Schluß zu, daß es sich bei dieser Substanz um den ersten beschriebenen spezifischen $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase-Inhibitor handelt. Betrachtet man nämlich die gemessenen *TIC*-Spektren, so kann man mit Zunahme der Wirkstoffkonzentrationen eine deutliche Abnahme der Ergosterol-Peaks erkennen. Dem gegenüber vergrößern sich die Peakflächen der direkten Biosynthesevorstufe 24(28)-Dehydroergosterol (**9**).

Wie bereits erwähnt, findet man bei der Inhibition der C-24-Methyltransferase im zugehörigen XIC-Spektrum das für die Ergosterol-Biosynthese untypische Sterol Cholesta-5,7,24-trienol (**69**; Abb. 107). Das abgebildete Spektrum stammt von einer Inkubation mit **MG-35-1** bei einer Wirkstoffkonzentration von 1.5 µg/ml.

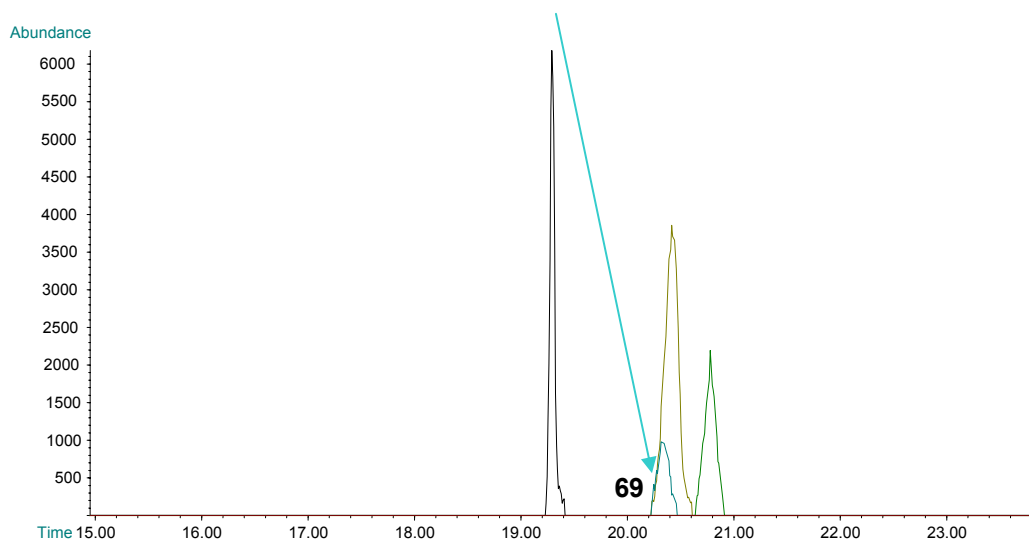
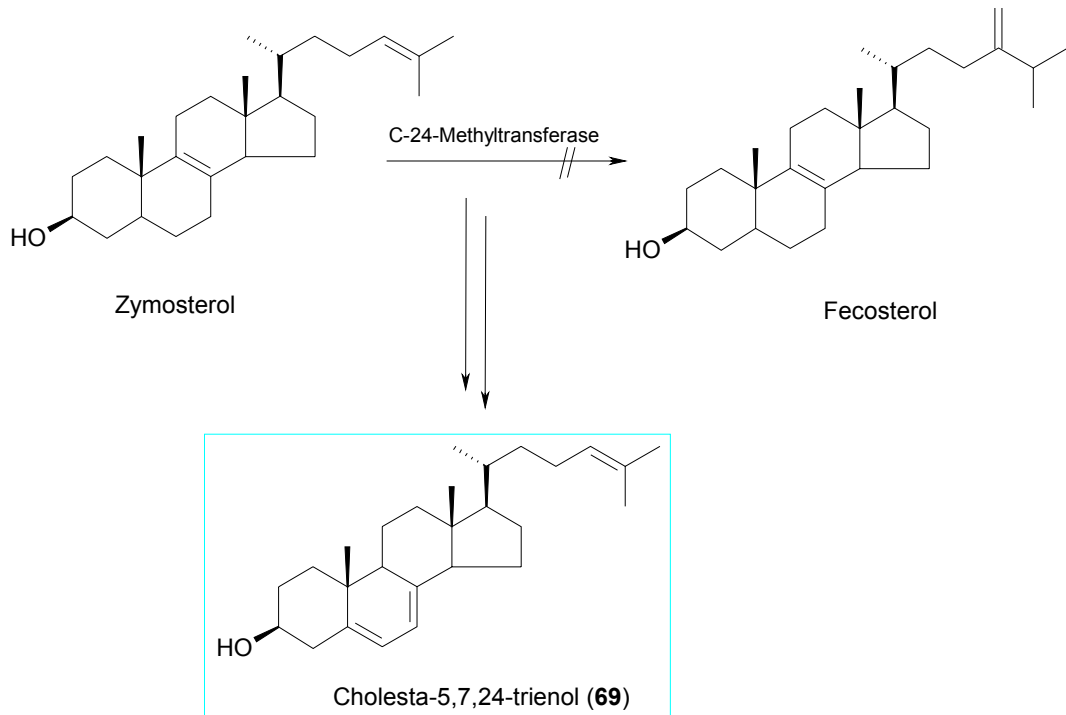


Abb. 107: Hemmung der C-24-Methyltransferase & zugehöriges XIC-Spektrum

Abb. 108: Ergosterolrückgang unter **MG-34** verdeutlicht noch einmal die Behauptung es könne sich bei Substanz **MG-34** um einen $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase-Inhibitor handeln. Gezeigt sind drei *TIC*-Spektren bei unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen. Man sieht deutlich, daß sich die Peakfläche von Ergosterol (**10**) im Verhältnis zu der von Cholesterol (**65**) bzw. der von 24(28)-Dehydroergosterol (**9**) bei ansteigender **MG-34**-Konzentration vermindert. Bei Hemmstoffen anderer Enzymsysteme der Ergosterol-Biosynthese bzw. einem anderen Prinzip der Wachstumshemmung beobachtet man den gleichzeitigen Rückgang beider Sterole, während die Konzentration des Internen Standards konstant bleibt. Trotz dieser Erklärung sollte diese These nur sehr vorsichtig gemacht werden. Müller beschreibt, daß **9** und **10** in Abhängigkeit von den entsprechenden Wachstumsbedingungen in unterschiedlicher Menge gebildet werden.³⁷ So überwiegt in Ruhekultur 24(28)-Dehydroergosterol (**9**), wo es als „bulk“-Sterol fungiert. In Schüttelkultur, also bei ausreichendem Angebot an NADPH, wird es durch die $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase wieder vermehrt zu Ergosterol (**10**) umgesetzt, dessen Peak nun wieder dominiert (vgl. 1.2.2.10). Diese Beobachtungen machen eine endgültige Aussage über den tatsächlichen Hemmechanismus von **MG-34** daher so schwierig.

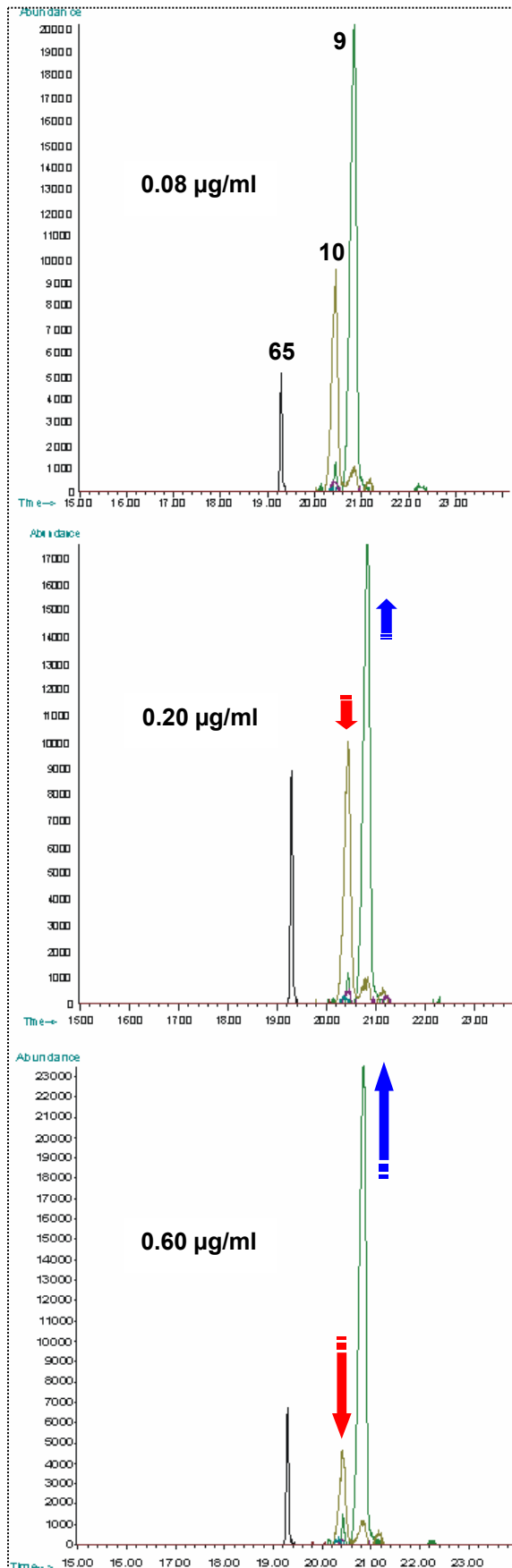


Abb. 108: Ergosterolrückgang unter **MG-34**

4.4.2.3 Azasqualenoide

Wie bereits kurz in Kapitel 1.3.2 beschrieben, stellt die Squalenepoxidcyclase in unserer Arbeitsgruppe ein noch recht neues Target bei der Entwicklung von SBIs dar. Dabei wird versucht, den Stickstoff an den Positionen zu platzieren, an denen bei der Cyclisierung von Squalenepoxid zu Lanosterol carbokationische Zwischenstufen auftreten können (vgl. Abb. 15). Soll der Stickstoff das HEI in Position 4 imitieren, ist es theoretisch möglich, daß die Sterol-C-4-Demethylase ebenfalls/ausschließlich gehemmt wird. Daher ist die gewählte Überschrift für dieses Kapitel so nicht absolut eindeutig.

Bei den Substanzen von *Lange*¹⁵ wurde der Stickstoff in den Positionen 4 und 10 eingefügt. Obwohl die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen im Agar-Diffusionstest eine Wirkung gegenüber *Aspergillus niger*, *Candida glabrata* und *Yarrowia lipolytica* zeigten, konnte diese Hemmwirkung im beschriebenen Testsystem nur teilweise bestätigt werden. Für keine der getesteten Substanzen konnte bisher die Hemmung eines bestimmten Enzymsystems nachgewiesen werden. Die folgenden Ergebnisse werden daher ohne weitere Kommentierung gelassen.

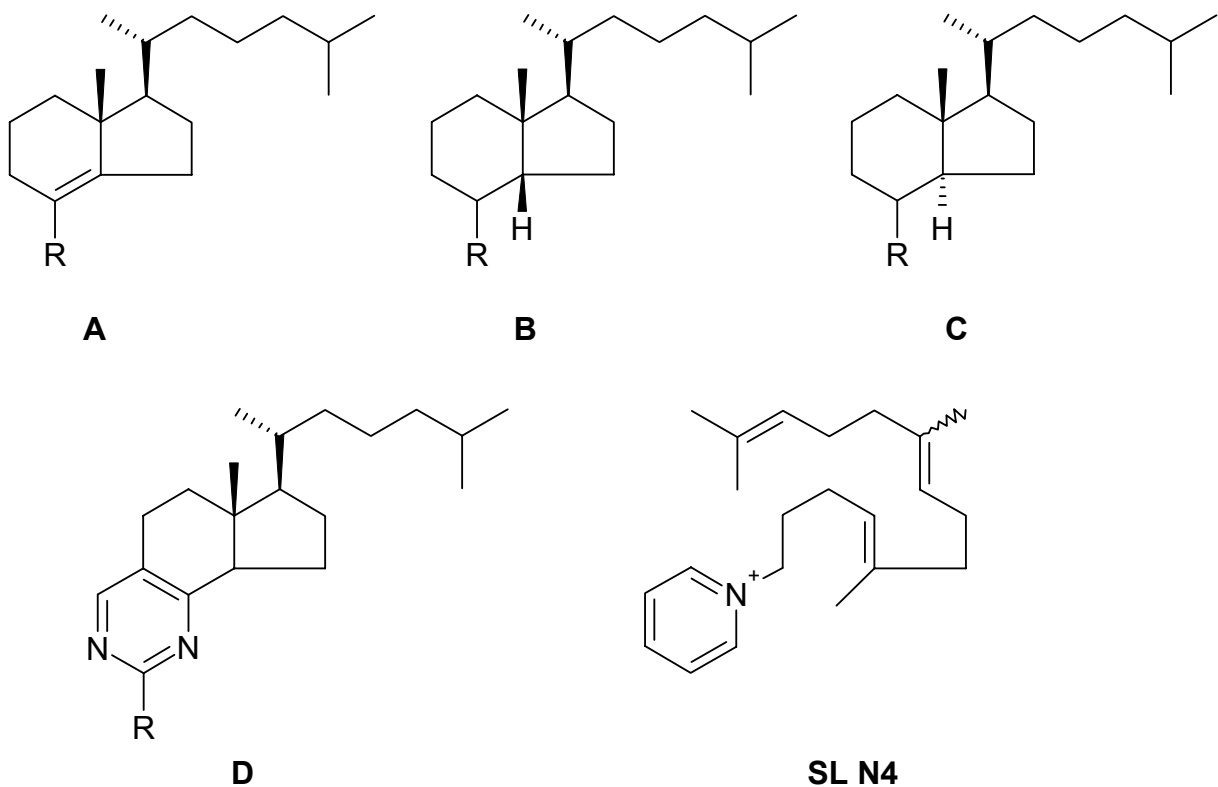
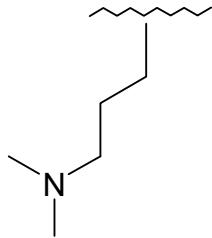
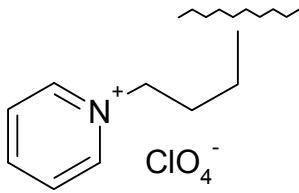
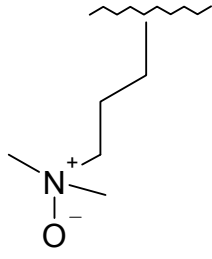
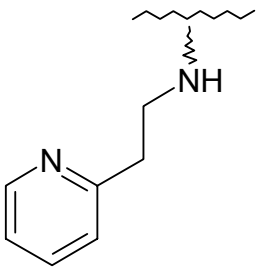
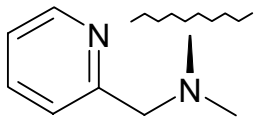
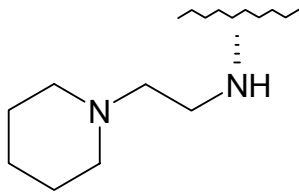


Abb. 109: Getestete Azasqualenoide (Reste sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt)

	Grundkörper	R	EC ₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
SL 1-4	A		> 30.0	kein SBI
SL 1-5	A		~ 3.40	kein SBI
SL 1-8	A		> 4.00	kein SBI
SL 2-1	C		~ 12.0	kein SBI
SL 2-3	B		> 4.00	kein SBI
SL 3-2	C		~ 4.00	kein SBI

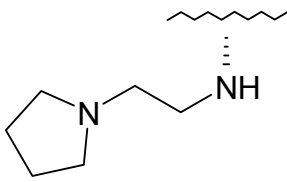
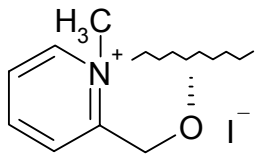
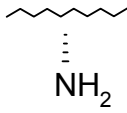
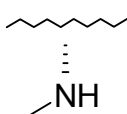
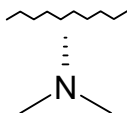
	Grundkörper	R	EC ₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
SL 3-3	C		~ 3.20	kein SBI
SL 4-2	B		~ 3.40	kein SBI
SL 5-1	D		> 4.00	kein SBI
SL 5-2	D		> 4.00	kein SBI
SL 5-3	D		> 4.00	kein SBI
SL N4	(vgl. Abb. 109)		> 4.00	kein SBI

Tabelle 5: Getestete Azasqualenoide

Wie Tabelle 5 zeigt, konnte für keines der getesteten Azasqualenoide eine signifikante Hemmung des Pilzwachstums festgestellt werden. Um zu prüfen, ob eventuell bei höheren Konzentrationen eine Wachstumshemmung auftritt bzw. ein bestimmtes Enzym gehemmt wird, wurde bei 2 Substanzen (**SL 1-4** & **SL 2-1**) der

Konzentrationsbereich bis auf 30 µg Testsubstanz pro ml Medium erweitert.

Dabei wurde festgestellt, daß eine Wachstumshemmung erst bei deutlich höheren Konzentrationen erkennbar ist. Es konnte im Standard-Konzentrationsbereich lediglich bei 4 Verbindungen eine leichte Hemmwirkung erkannt werden. Diese betrifft jedoch nicht die Ergosterol-Biosynthese.

4.4.2.4 β -Carboline und Canthinone

Im Rahmen ihrer Dissertation suchten *Puzik*⁷³ und *Kast*⁷⁴ aus unserer Arbeitsgruppe nach neuartigen Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen. Die dabei synthetisierten Substanzen mit β -Carbolin- bzw. Canthin-4-on-Grundstrukturen wurden auch standardmäßig auf antibiotische und antimykotische Aktivität hin untersucht.

Im Agar-Diffusionstest konnten die in Abb. 110 aufgeführten Verbindungen das Pilzwachstum beeinflussen. Sie wurden daraufhin mit dem in Kapitel 4.1 beschriebenen Testsystem auf eine mögliche Ergosterol-Biosynthesehemmung untersucht.

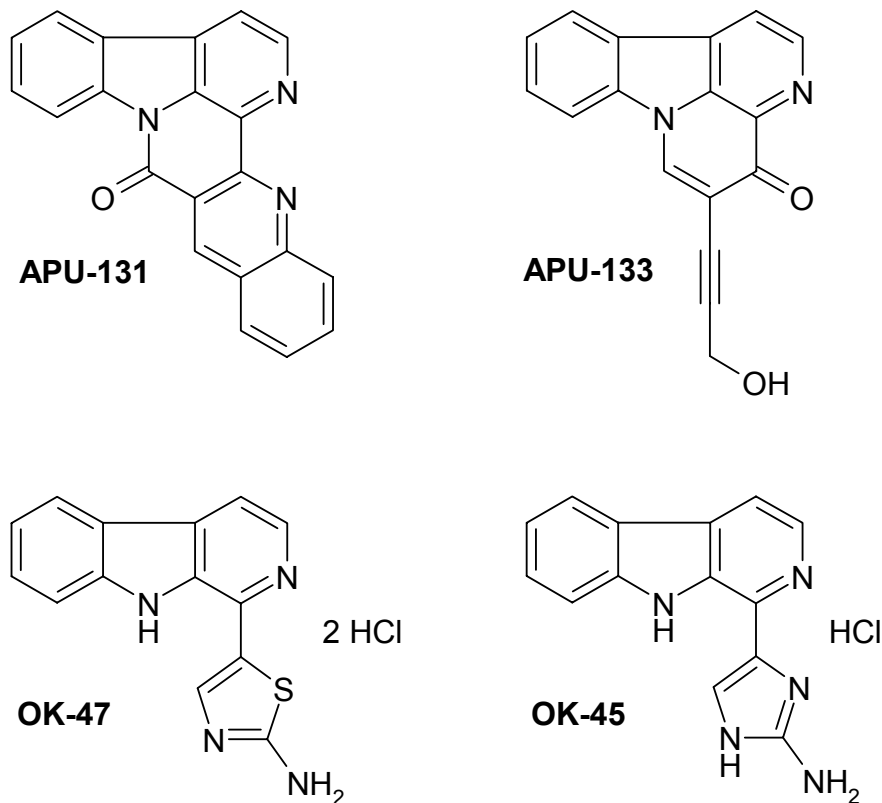


Abb. 110: Gestestete Canthin-4-one und β -Carboline

Bei keiner der 4 Substanzen konnte die im Agar-Diffusionstest aufgetretene Aktivität gegenüber *Yarrowia lipolytica* bestätigt werden.

4.4.2.5 Annonaceen-Alkaloid-Derivate

Die aus verschiedenen Annonaceen-Arten isolierten Alkaloide **Cleistopholin**, **Onychin** und **Sampangin** dienten *Dombeck* aus unserer Arbeitsgruppe als Grundbaustein für die Synthese zahlreicher Derivate.⁷⁵ Für die antimykotische Aktivität der 3 Naturstoffe finden sich in der Literatur einige Beispiele.^{76, 77}

Getestet wurden 10 Substanzen, 6 vom Azaanthracen-Typ des Cleistopholins (**FD-36**, **FD-52**, **FD-68**, **FD-69**, **FD-72** und **FD-74**), deren Synthesestufe **FD-8**, eine vom Azaoxapophin-Typ des Samgangins (**FD-78**) und zwei Onychin-Derivate, davon **FD-103** und ein Eberconazol-Onychin-Hybrid (**FD-109**) (Abb. 111).

Während für das Samgangin-Derivat **FD-78** zumindest eine Abnahme der Pilzbiomasse über den gewählten Konzentrationsbereich zu erkennen ist, konnte bei den anderen Testsubstanzen keine antimykotische Aktivität festgestellt werden.

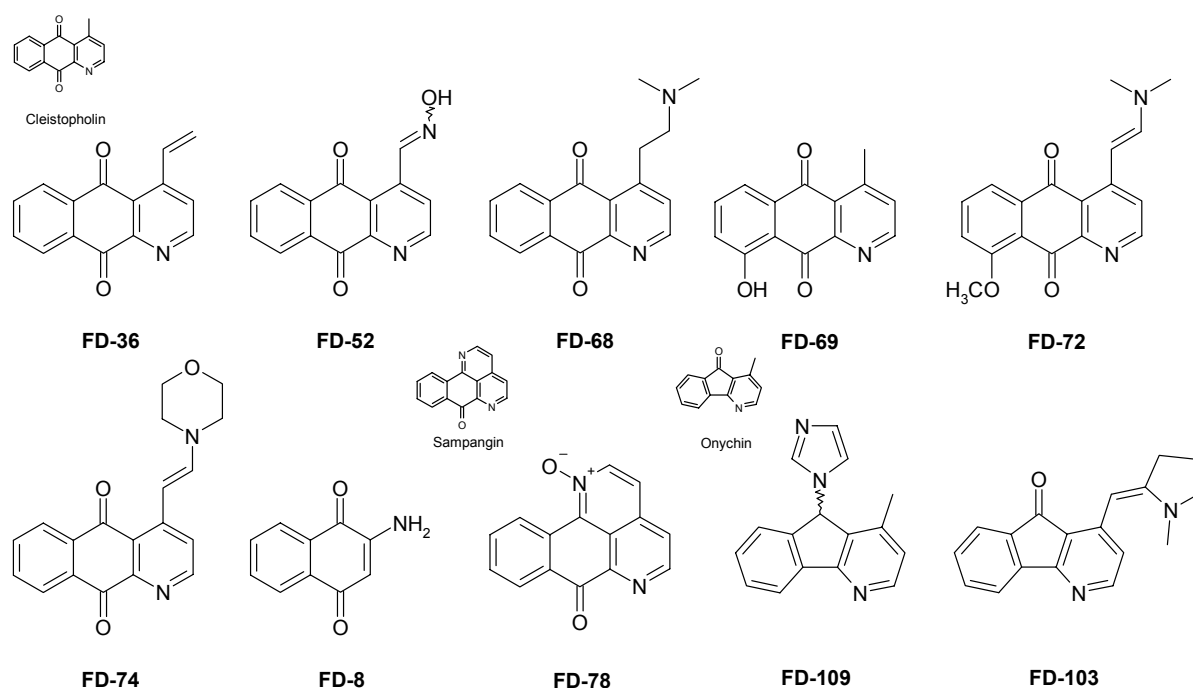


Abb. 111: Getestete Annonaceen-Alkaloid-Derivate

4.4.2.6 2,7-Naphthyridine

Das im vorherigen Kapitel erwähnte Alkaloid **Sampangin** (Abb. 111) diente *Kirchisner* aus unserer Arbeitsgruppe als Vorlage für die Synthese verschiedener Seco-Derivate.⁷⁸ Nach dem Prinzip der Bioisosterie⁷⁹ sollte der auf ein 2,7-Naphthyridin-Grundgerüst (Abb. 112) reduzierte Sampangin-Grundkörper u.a. den Naphthalin-Ring verschiedener Allylamin-Antimykotika (vgl. 1.3.1) ersetzen.

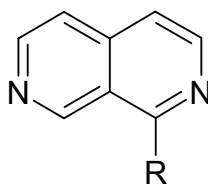


Abb. 112: 1'-substituiertes 2,7-Naphthyridin

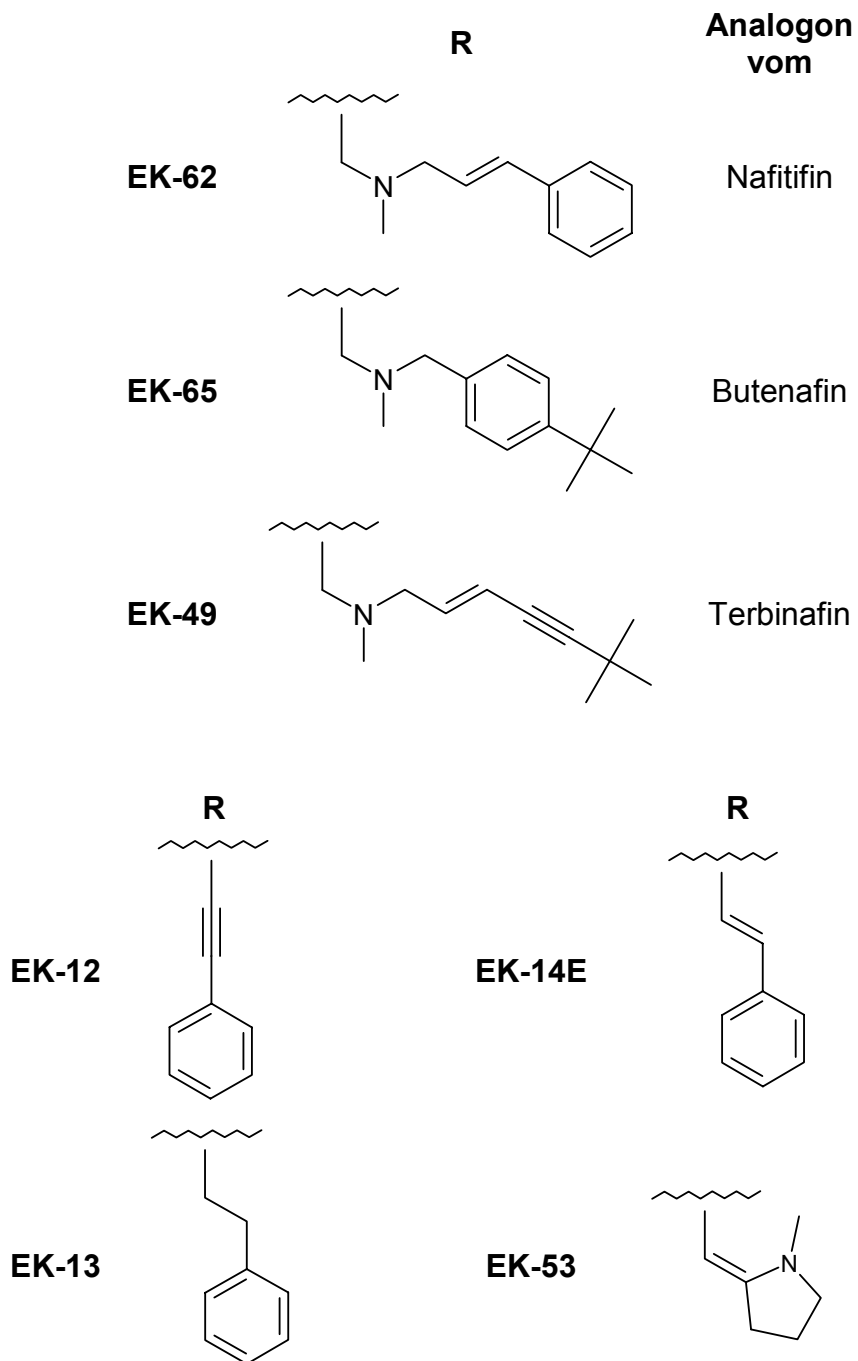


Abb. 113: Getestete 1-substituierte 2,7-Naphthyridine von *Kirchisner*

Neben den nach diesem Schema synthetisierten Derivaten wurden auch 2,7-Naphthiridine mit anderen Seitenketten auf ihre antimykotische Wirksamkeit bzw. einen spezifischen Hemmechanismus hin untersucht (Abb. 113).

Für die 2,7-Naphthridin-Seitenketten, die sich nicht von Allylaminen ableiten, konnte weder eine Wachstumsreduktion noch ein spezifischer Hemmechanismus erkannt werden. Die Verbindung **EK-49** und **EK-62** zeigten ebenfalls keinerlei antimykotische Aktivität.

Demgegenüber konnte in den aufgearbeiteten Ansätzen der Verbindung **EK-65** mit der Allylamin-Seitenkette des Butenafins ab einer Konzentration von 3.0 µg/ml das für die Allylamine als Squalenepoxidase-Inhibitoren zu erwartende Enzymsubstrat Squalen (**1**) nachgewiesen werden (Abb. 114).

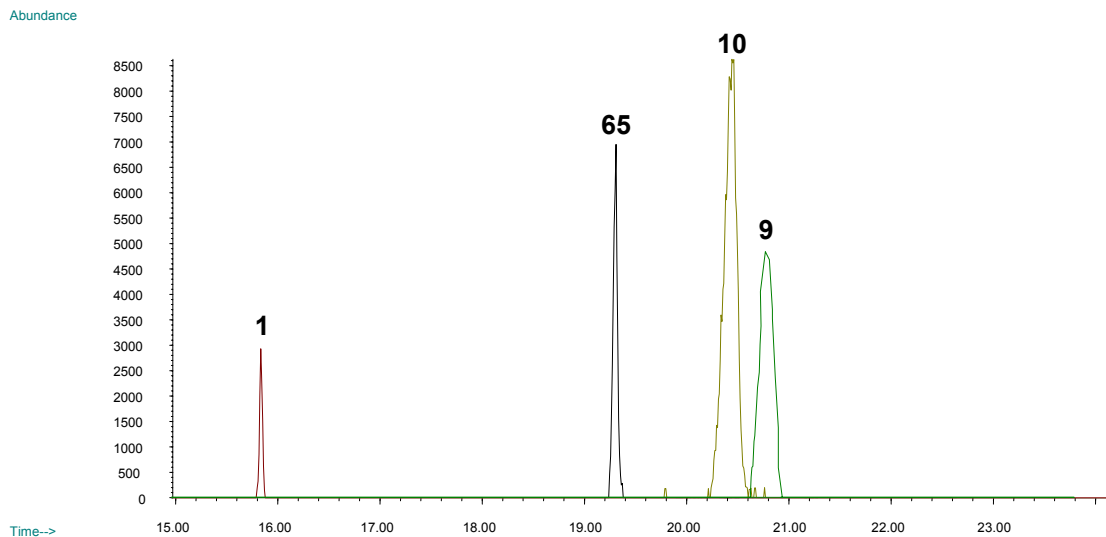


Abb. 114: XIC-Spectrum von **EK-65** (4.0 µg/ml)

Obwohl die Substanz wesentlich schwächer wirksam ist als die von Müller³⁷ untersuchten Squalenepoxidase-Hemmstoffe Terbinafin und Naftifin, ist das obige Sterolmuster mit dem der Arzneistoffe identisch. Somit konnte die Verbindung **EK-65** eindeutig als Squalenepoxidase-Inhibitor charakterisiert werden.

4.4.3 Arzneistoffe

Neben den aus unserer Arbeitsgruppe stammenden Verbindungen wurden auch einige bekannte Arzneistoffe getestet.

4.4.3.1 Imidazinole

Obwohl **Clonidin** (Antihypertonikum) und **Naphazolin** (α -Sympathomimetikum) pharmakologisch anderen Stoff- bzw. Indikationsgruppen zuzuordnen sind, besitzen sie doch mit dem Imidazolin-Ring ein Strukturelement, das dem der Azol-Antimykotika (vgl. Kapitel 1.3.3) ähnelt.

Eine Testung dieser Verbindungen sollte also klären, ob sich neben einer Beeinflussung des Pilzwachstums auch das für eine durch Azole indizierte Hemmung typische Lanosterol nachweisen läßt.

Die Testergebnisse zeigten jedoch, daß beide Substanzen weder das Pilzwachstum beeinflussen noch das zu vermutende Lanosterol akkumuliert.

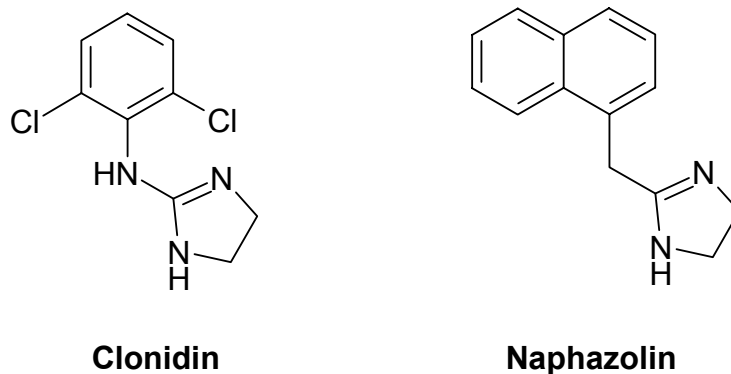
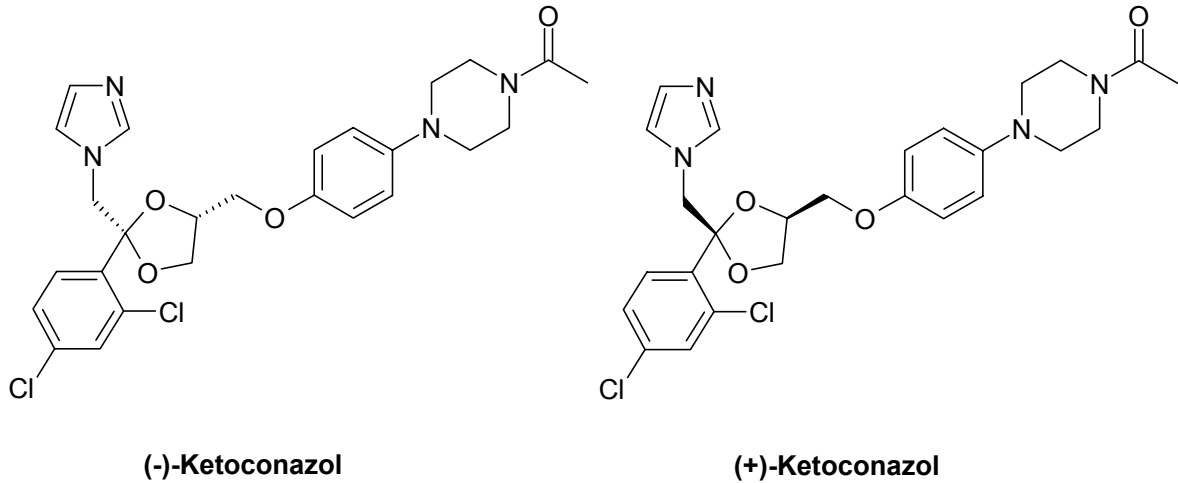


Abb. 115: Die Imidazole **Clonidin** und **Naphazolin**

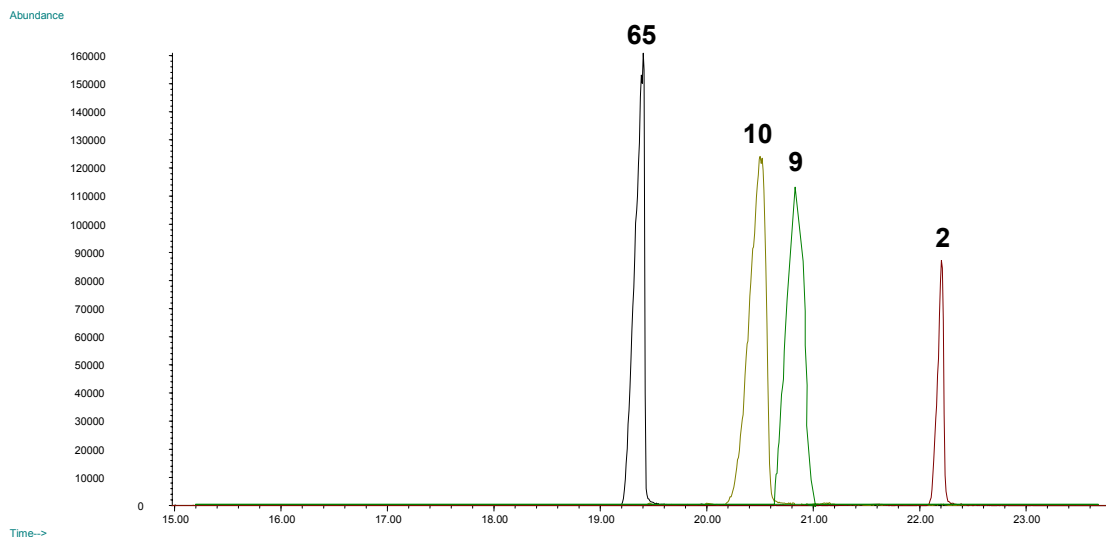
4.4.3.2 (+)- und (-)-Ketoconazol

Ketoconazol ist ein Imidazol-Antimykotikum zur systemischen Therapie. Der Wirkstoff ist als Racemat im Handel (Abb. 116). Durch die säulenchromatographische Trennung der Enantiomere⁸⁰ von *Prof. Dr. Joe Gal, University of Colorado, Denver, U.S.A.*, von dem die Substanzen für die beiden Testreihen stammen, war es erstmals möglich beide Enantiomere getrennt auf ihre antimykotische Aktivität hin zu untersuchen.

**Abb. 116:** (+)- und (-)-Ketoconazol

Vergleicht man beide Testreihen, so konnte man feststellen, daß der EC_{50} des (+)-Enantiomer ($\sim 2.9 \mu\text{g/ml}$) ca. um den Faktor 1.1 höher liegt als der des (-)-Enantiomers ($\sim 2.6 \mu\text{g/ml}$).

Bei beiden Substanzen akkumuliert **Lanosterol (2)**, das ein Merkmal für die Hemmung der Lanosterol-14 α -demethylase darstellt und typisch für den Hemmechanismus von Azol-Antimykotika ist (Abb. 117). Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, daß beide Enantiomere von Ketoconazol, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität, Inhibitoren der Lanosterol-14 α -demethylase sind.

**Abb. 117:** XIC-Spektrum von (+)-Ketoconazol (3.0 $\mu\text{g/ml}$)

4.4.3.3 Ciclopiroxolamin

Als einzig therapeutisch genutzter Vertreter der *N*-Hydroxypyridone ist **Ciclopirox** zwar ein Antimykotikum, greift jedoch nach bisherigen Erkenntnissen nicht in die Ergosterol-Biosynthese ein. Die fungizide Wirkung beruht auf einer Hemmung der zellulären Aufnahme lebensnotwendiger Zellbausteine, wobei gleichzeitig der Ausstrom anderer essentieller Zellbestandteile induziert wird.¹⁶

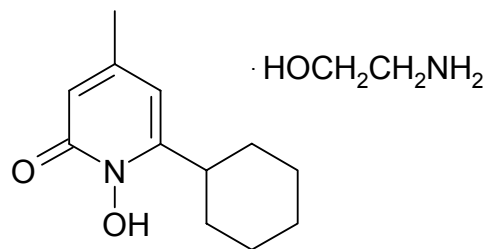


Abb. 118: Struktur von Ciclopiroxolamin

Um die antimykotische Aktivität gegenüber *Yarrowia lipolytica* mit denen der Ergosterol-Biosynthese-Inhibitoren vergleichen zu können, wurde die Substanz (Abb. 118) in die Testung mit einbezogen.

Obwohl kein Ergosterol-Biosynthese-spezifischer Hemmechanismus zu erwarten war, sollte der Arzneistoff zumindest das Pilzwachstum negativ beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen jedoch keinerlei antimykotische Aktivität. Ob es sich hierbei um ein erreger-, konzentration- bzw. löslichkeitspezifisches Phänomen handelt konnte abschließend noch nicht geklärt werden.

4.4.4 Isopimarane

Von *Prof. Dr. Kurt Hostettmann, Université de Genève, Schweiz* stammen 4 Isopimarane (Diterpene) die aus *Hypoestes serpens*, einer Acanthaceen-Art, extrahiert wurden.⁸¹ Da für den Pflanzenextrakt (Dichlormethan) eine antimykotische Wirkung beschrieben wurde, sollten diese Substanzen, die, zumindest was die Ringe A und B betrifft, eine gewisse Ähnlichkeit mit Ergosterol haben, auf eine mögliche Aktivität als SBI hin untersucht werden.

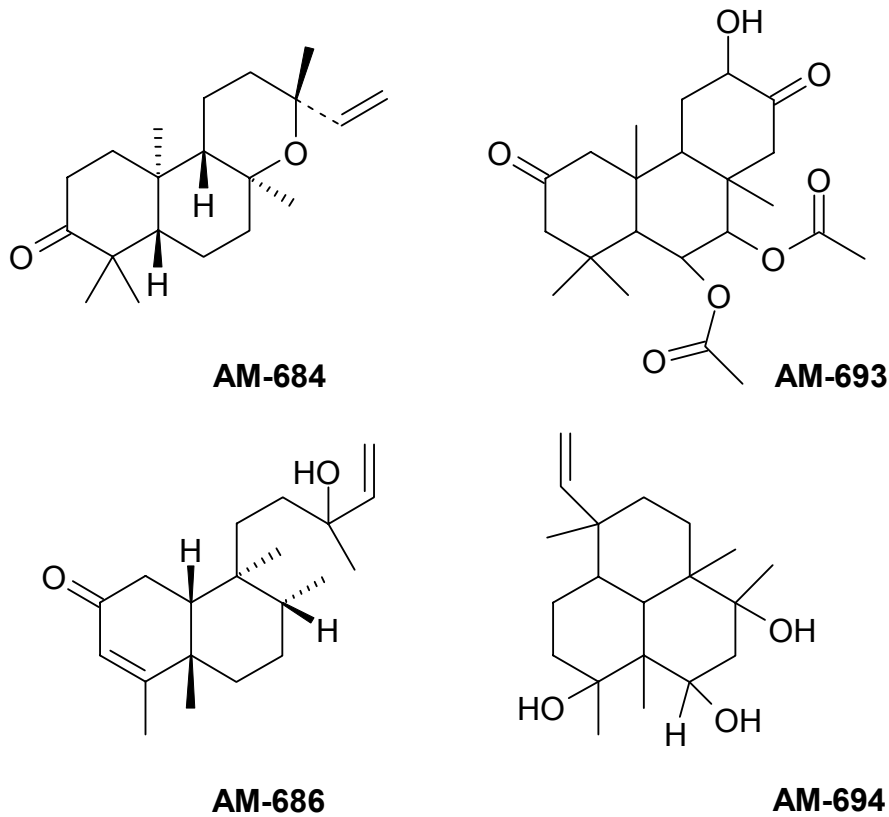


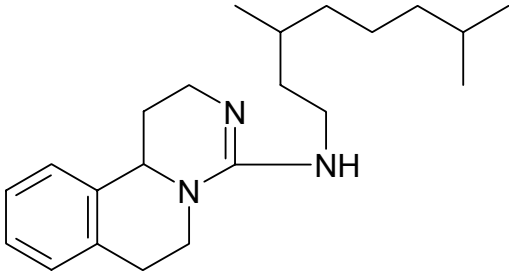
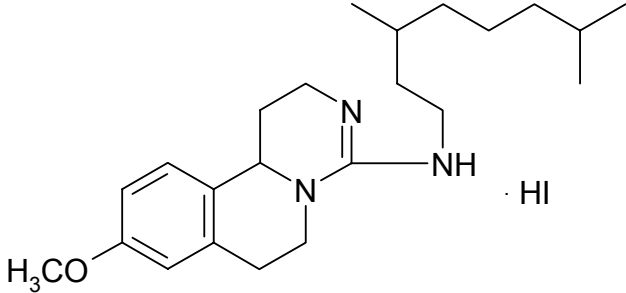
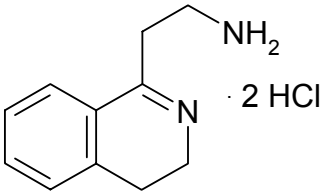
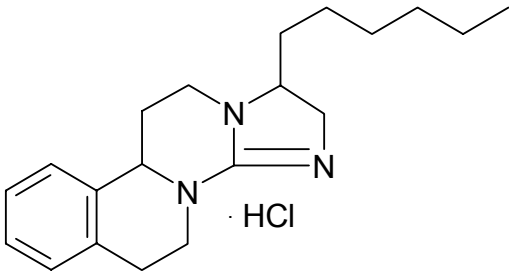
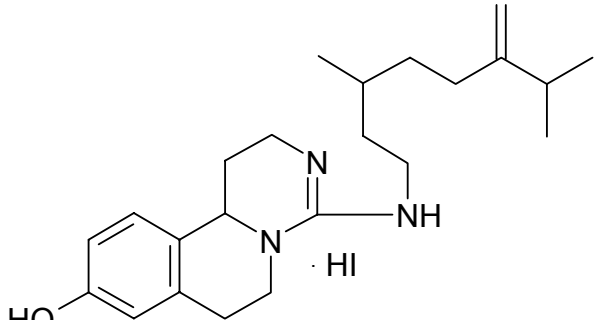
Abb. 119: Getestete Isopimarane

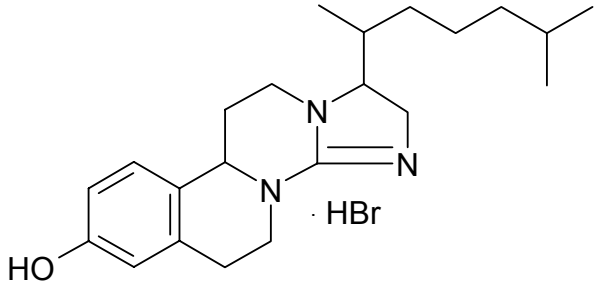
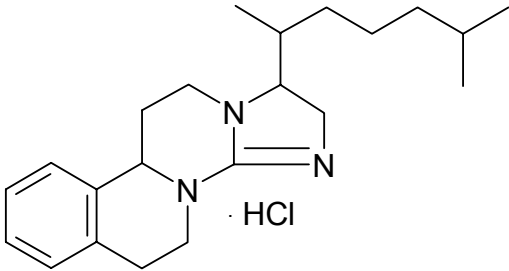
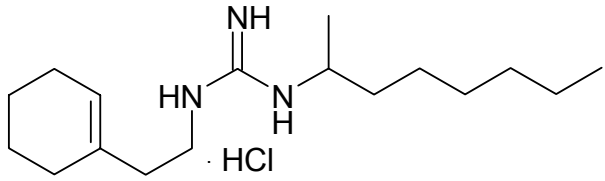
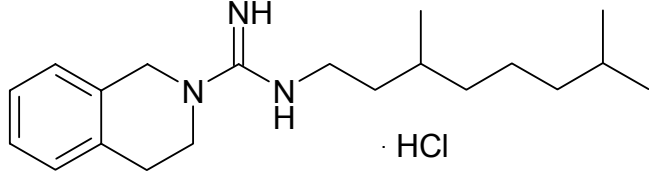
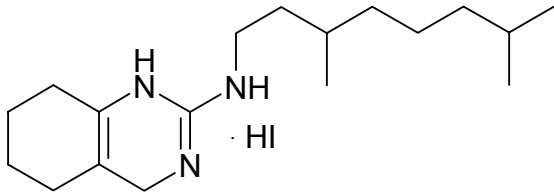
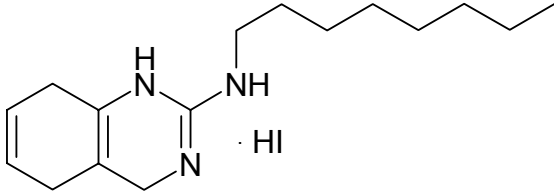
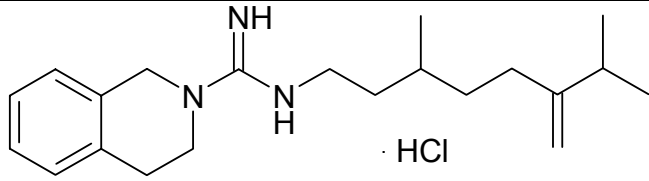
Wie die Ergebnisse der Screenings im Agar-Diffusionstest zeigen, konnte für keine der in Abb. 119 gezeigten Verbindungen antimykotische Aktivität gegenüber *Yarrowia lipolytica* nachgewiesen werden. Die Verbindungen wurden trotzdem der Testung auf Inhibition der Ergosterol-Biosynthese unterzogen, zeigten aber keinerlei Veränderungen im Sterolmuster.

4.4.5 Anellierte Tetrahydroisochinoline und Derivate

In einer weiteren Testreihe wurden 13 Verbindungen aus der Arbeitsgruppe von Dr. Edith Gößnitzer, Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich, getestet. Alle Testsubstanzen besitzen dem Sterol-Grundkörper ähnliche Strukturen und haben zusätzlich dazu Stickstoffatome in den für carbokationische Zwischenstufen bekannten Positionen. Die Substanzen können daher potentiell als HEIs die Sterol- $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase bzw. die Sterol- Δ^{14} -Reduktase inhibieren. Eine Aktivität gegenüber 8 verschiedenen pathogenen Pilzen wurde bereits beschrieben.⁸²

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Testsystem sollte diese Ergebnisse bestätigen und präzisieren.

	Struktur	EC ₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
GEP 159		> 4.0	kein SBI
GEP 330		> 4.0	kein SBI
GEP 425		> 4.0	kein SBI
GEP 469		> 4.0	kein SBI
GEP 489		> 4.0	kein SBI

	Struktur	EC ₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
GEP 500		> 4.0	kein SBI
GEP 501		> 4.0	kein SBI
GES 12		~ 35.0	kein SBI
GES 16		~ 23.0	kein SBI
GET 19		> 4.0	kein SBI
GET 123		> 4.0	kein SBI
GET 182		~ 11.0	kein SBI

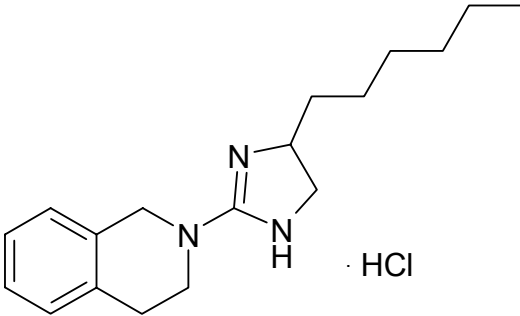
	Struktur	EC ₅₀ [µg/ml]	Zielenzym
GET 220		> 4.0	kein SBI

Tabelle 6: Gestestete Substanzen aus der Arbeitsgruppe Dr. Gößnitzer

Bei allen Substanzen lag die EC₅₀ über 4.0 µg/ml. Um eine Vorstellung über die Halbwachstumskonzentration zu bekommen und einen möglichen Hemmmechanismus nachzuweisen, wurden die Substanzen **GES 12**, **GES 16** und **GET 182** bei erhöhten Konzentrationen getestet.

Für keine der getesteten Substanzen inklusive der bei höheren Konzentrationen im Medium konnte eine Hemmung der Ergosterol-Biosynthese des Testkeims *Yarrowia lipolytica* nachgewiesen werden.

Die EC₅₀ für die wirksamste der bei höheren Konzentrationen im Medium getesteten Substanzen **GET 182** betrug ~ 11.0 µg/ml. Als Grund für die schlechte Wirksamkeit könnte eine mäßige Löslichkeit der Salze im Standardlösungsmittel Ethanol sein. Leider standen pro Verbindung nur ca. 20 mg zur Verfügung, so daß eine Darstellung der entsprechenden Basen in für die Testung ausreichenden Mengen nicht möglich war.

4.5 Agar-Diffusionstest eigener Substanzen

Die in Kapitel 3 beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Substanzen wurden anhand einiger Modelkeime im Agar-Diffusionstest auf antimikrobielle Aktivität getestet. Dieses Testverfahren dient lediglich dem grundsätzlichen Erkennen antimikrobieller Aktivität. Die gemessenen Hemmhöfe lassen sich daher nur begrenzt quantitative Aussagen zu.

Da Testreihen im in 4.1 beschriebenen Testsystem arbeits- und zeitaufwendiger, nicht zuletzt aber auch wesentlich teurer sind als der Agar-Diffusionstest, mußten sich alle neuen Substanzen in diesem „Vortest“ erst einmal als antimykotisch aktiv erweisen.

Folgende Mikroorganismen wurden beim Agar-Diffusionstest verwendet:

Candida glabrata – Hefe

Yarrowia lipolytica – Hefe

Aspergillus niger – Ascomycet

Staphylococcus equorum – grampositives Bakterium

Als Referenzsubstanzen wurden Clotrimazol und Tetracyclin eingesetzt. Die praktische Durchführung ist im Experimentellen Teil beschrieben.

4.5.1 Testergebnisse

In der nachfolgenden Tabelle sind die ermittelten Hemmhofdurchmesser aufgelistet. Die Angabe der Durchmesser erfolgt in Millimetern (WH = Wachstumshemmung; TH = totaler Hemmhof).

Substanz-Nr.	<i>Candida glabrata</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Staph. equorum</i>
11	---	---	---	---
12	---	---	---	---
13	---	---	---	---
14	---	---	---	---
15	---	---	---	WH 1

4 Analytischer Teil

Substanz-Nr.	<i>Candida glabrata</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Staph. equorum</i>
16	---	---	---	---
17	---	---	---	---
18	---	---	---	---
19	---	---	---	---
20	---	---	---	---
21	---	---	---	TH 2
22	---	---	---	---
23	---	---	---	---
24	---	---	---	---
26	---	---	---	WH 1
27	---	---	---	---
28	---	---	---	---
29	---	---	---	---
30	---	---	---	---
31	---	---	---	---
35	---	---	---	---
36	---	---	---	---
37	---	---	---	WH 1
38	---	---	---	---
39	---	---	---	---
40	---	---	---	---
41	---	---	---	---
42	---	---	---	---

Substanz-Nr.	<i>Candida glabrata</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Staph. equorum</i>
43	---	---	---	---
44	---	---	---	---
45	---	---	---	---
46	---	---	---	---
47	---	---	---	---
48	---	---	---	---
49	---	---	---	---
50	---	---	---	---
51	---	---	---	---
52	---	---	---	---
53	---	---	---	---
54	---	---	---	---
55	---	---	---	---
56	---	---	---	---
57	---	---	---	---
58	---	---	---	---
59	---	---	---	---
60	---	---	---	WH 1
61	---	---	---	WH 1
64	---	---	---	---
Clotrimazol	TH 7	TH 6	TH 6	---
Tetracyclin	---	---	---	TH 15

Tabelle 7: Testergebnisse des Agar-Diffusionstests

4.5.2 Zusammenfassung der Testergebnisse

Die Testergebnisse fallen mit Blick auf Tabelle 7 recht enttäuschend aus. Obwohl einige Substanzen bereits einen steroidalen Charakter aufweisen, sind die strukturellen Voraussetzungen für eine antimykotische Wirkung bei den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Substanzen nicht gegeben.

Mögliche Gründe bzw. die zu ziehenden Schlußfolgerungen für diese Ergebnisse werden in Kapitel 5.2.1 diskutiert.

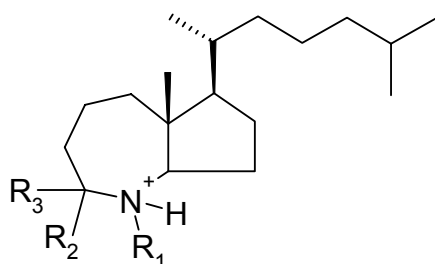
5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Themenschwerpunkte behandelt:

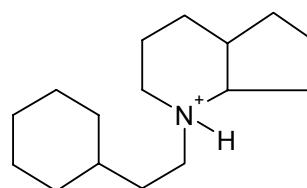
5.1 Zusammenfassung des präparativ-chemischen Teils

Der präparativ-chemische Teil beschäftigte sich mit der Synthese von Substanzen, die dem HEI, also dem enzymgebundenen Übergangszustand der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Reaktion, einer essentiellen Reaktion der Ergosterol-Biosynthese von Pilze, ähnlich sind.

Die antimykotische wirksamen Verbindungen von *Daab*³³, *Burbiel*³⁴ und *Salman*³⁵ dienten als Leitstrukturen. Ausgehend von einfachen Bausteinen wurden Azacylen synthetisiert, die Aufschlüsse über strukturelle Mindestvoraussetzungen im Hinblick auf eine inhibitorische Wirkung geben sollten.

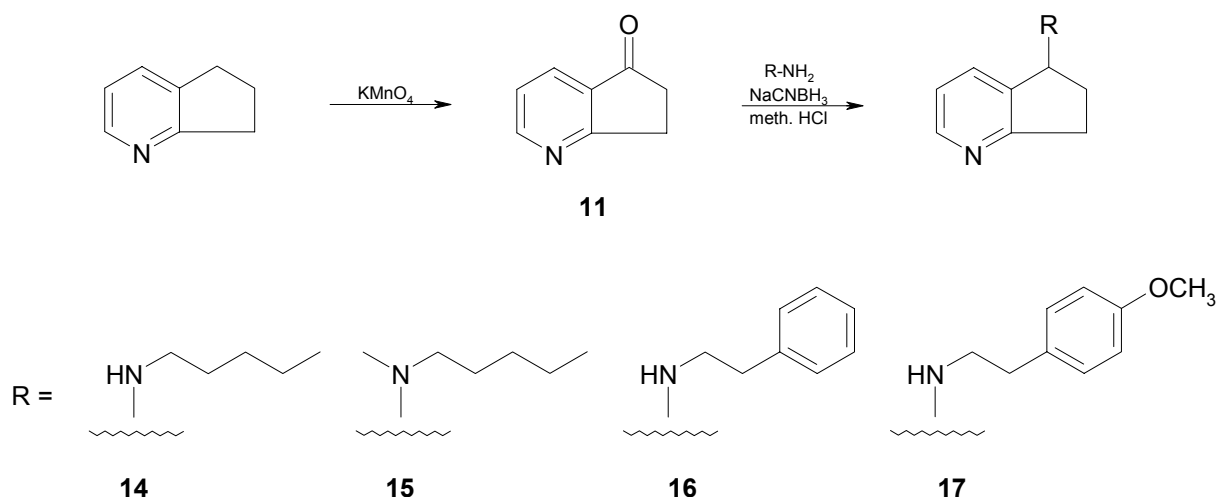


Leitstruktur *Salman* / *Burbiel*



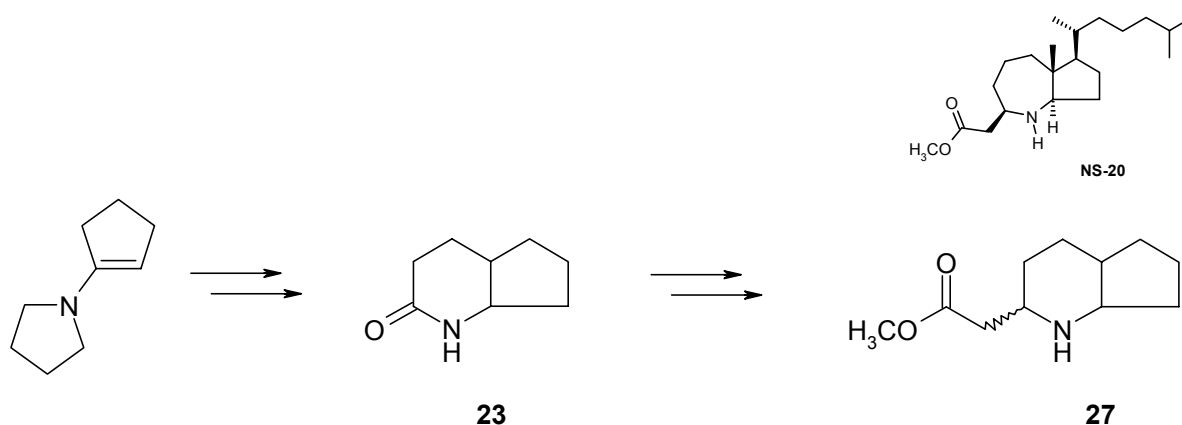
Leitstruktur *Daab*

Unter diesem Aspekt wurde durch Oxidation von Pyrindan mit KMnO_4 ein Ring-C/D-Analogon synthetisiert, das über eine Carbonylfunktion die Möglichkeit zum Einführen verschiedener Seitenketten besitzt. Über reduktive Aminierung konnten in der Folge verschiedene Substituenten an den Bicyclus angefügt werden.



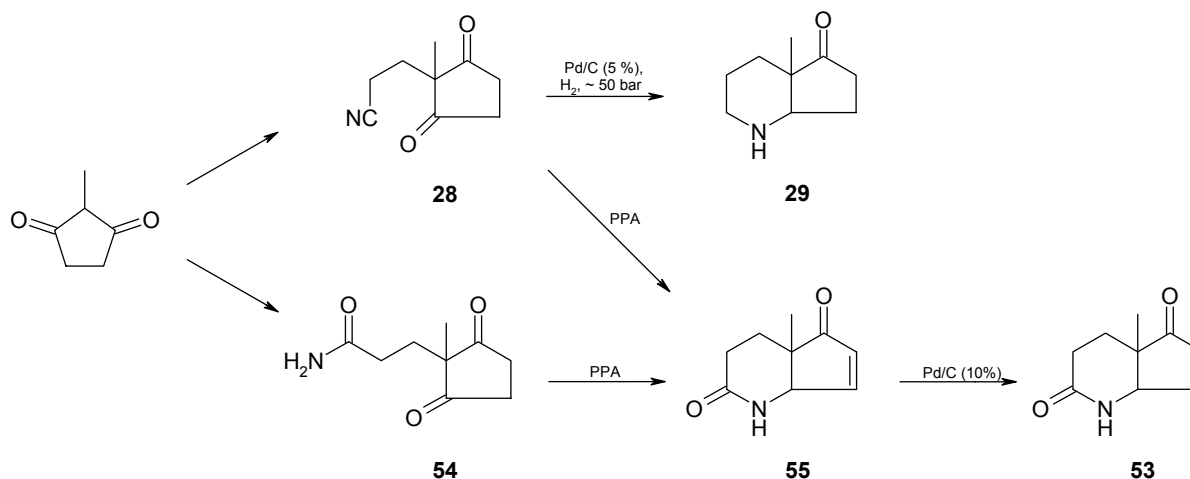
Um zu untersuchen, ob Seitenkette, anguläre Methylgruppe und/oder stereochemische Voraussetzungen für eine antimykotische Wirkung essentiell sind, sollte ein Analogon vom sehr guten Inhibitor **NS-20** synthetisiert werden, bei dem auf diese Gegebenheiten verzichtet wird.

Ausgehend von Pyrrolidino-1-cyclopenten wurde über die literaturbekannte Verbindung **23** durch anschließende Thionierung, *Eschenmoser*-Alkenylierung und Hydrierung die Verbindung **27** synthetisiert.



Die fehlende antimykotische Wirkung von **27** läßt den Schluß zu, daß die genannten Strukturgegebenheiten für die inhibitorische Wirkung essentiell sind.

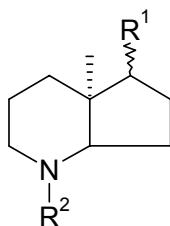
Unter diesem Gesichtspunkt wurde in der Folge die Grundkörper **29** und **53** synthetisiert.



Ausgehend von 2-Methyl-1,3-cyclopentadion wurde dabei durch *Michael*-Addition von Acrylnitril und anschließende Hochdruckhydrierung der Aza-Bicyclus **29** aufgebaut. Die Zwischenstufe **28** läßt sich durch Hydratisierung mit Polyphosphorsäure (PPA) u. anschließender Cyclisierung zu **55**, der ungesättigten

Vorstufe von **53**, umsetzen. Die Synthese von **55** gelang auch mit Acrylamid und anschließende Cyclisierung der so erhaltenen Verbindung **54**.

An den Grundkörper **29** wurden in der Folge durch *N*-Alkylierung und/oder Iminbildung, reduktive Aminierung und Veretherung bzw. Veresterung des entsprechenden sekundären Amins verschiedene Seitenketten und/oder Ring-A/B-Analoga angefügt.

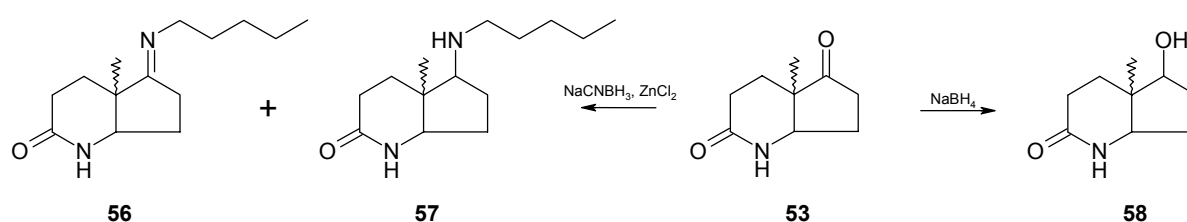


	R ¹	R ²		R ¹	R ²
36		H	45		H
38		H	47		
38		H	46		
39		H	48		
40			49		
42			50		
43		H	51		
44			52		

Tabelle 8: Derivate von **29**

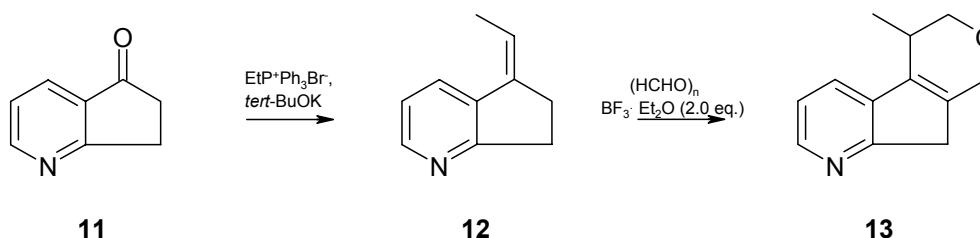
Dabei entstanden eine Reihe von Verbindungen die leider keinerlei antimykotische Wirkung zeigten, obwohl ihre Strukturen in natürlichen Vorbildern schon recht nahe kommen (Tabelle 8).

Auch **53** diente als Grundkörper für die Darstellung einiger Derivate mit *N*-Alkyl-Seitenketten. Diese sollten wieder theoretisch in der Lage sein, die carbokationsche Vorstufe von Lanosterol (Protosterol-Kation; vgl. Abb. 5) zu imitieren. Die bei **29** durchgeführten *O*-Alkylierungen über den ebenfalls synthetisierten Alkohol **58** wurden nicht mehr durchgeführt.



Dieser Grundkörper unterscheidet sich von **29** durch die Lactam-Struktur bei der sich Substitutionen wie schon bei **23** anbieten würden. Derlei Verbindung sind jedoch nicht mehr dargestellt worden.

Bei allen Grundkörpern scheiterten Bemühungen, mittels gängiger Methoden (*Wittig*-Reaktion, *Grignard*-Reaktion, Alkinylierung) eine reine Alkyl-Seitenkette darzustellen. Bei der Durchführung der *Wittig*-Reaktion bei den Dihydropyrindinen gelang zumindest die Darstellung einer C₂-Seitenkette (**12**). Diese ließ sich zwar nicht wie geplant verlängern, führte jedoch zu einem bisher noch nicht beschriebenen Oxa-aza-fluoren-Grundgerüst (**13**).



5.2 Zusammenfassung des Analytischen Teils

Mit den von Müller³⁷ bereits getesteten und in dieser Arbeit untersuchten Substanzen ist bereits eine ausreichende Datenmenge für eine computerbasierte Auswertung von Struktur–Wirkungs– und Struktur–Wirkstärke–Beziehungen vorhanden, die eine eindeutige Charakterisierung der antimykotischen Aktivität der getesteten Substanzen erlauben.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Testergebnisse geben darüber hinaus einen umfassenden Einblick über die verschiedenen Angriffspunkte Ergosterol-Biosynthese-inhibierender Substanzen.

Drei verschiedene Testreihen konnten vom Ansatz bis zur Auswertung der instrumentellen Analytik pro Woche durchgeführt werden. Dies und die im Vergleich zum Agar-Diffusionstest deutlich höher liegenden Kosten hatten zur Folge, daß eine Substanz erst dann für das SBI-Screening in Frage kam, wenn sie sich in entsprechenden Vortests (Agar-Diffusionstests) als antimykotisch erwiesen hat bzw. schon als antimykotisch bekannt war. Das ist der Grund warum auch keine im präparativ-chemischen Teil dieser Arbeit synthetisierten Substanzen in die Testung kamen (sehr zum Leidwesen des Autors).

Von den getesteten Substanzen erfüllten alle diese Voraussetzungen.

5.2.1 Nachbetrachtung der Testergebnisse der eigenen Substanzen

Für die fehlende antimykotische Wirksamkeit der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Substanzen können folgende strukturelle Unterschiede zu den natürlichen Sterolen bzw. den wirksamen Verbindung von *Burbiel* und *Salman* diskutiert werden:

- das planare, aromatische Ring-C-System der Dihydropyridine weicht stark von der vollständig gesättigten Struktur natürlicher Sterole ab. Die fehlende Wirkung kann jedoch auch damit begründet werden, daß der Pyridin-Stickstoff als schwache Base ($pK_s \sim 5.3$) unter physiologischen Bedingungen überwiegend unprotoniert vorliegt und somit auch die kationischen HEI nicht imitieren kann. Eine ständige positive Ladung wäre nur mit der Darstellung der entsprechenden quartären Salze zu erreichen.
- der durch Palladiumkatalyse unter Wasserstoff-Hochdruck-Atmosphäre

erzwungene Ringschluß von **28** führt selektiv zur *cis*-verknüpften Verbindung **29** (vgl. Abb. 65 und Abb. 66). Für **53** konnte im NOE-Experiment ebenfalls nachgewiesen werden, daß ausschließlich die *cis*-Verbindung entstanden ist. Da die natürliche Verknüpfung der Ringe C und D in Ergosterol und seinen Biosynthese-Vorstufen *trans* ist, kann hier ein Grund für die fehlende Wirksamkeit gesehen werden.

- die Seitenketten der vorgestellten Verbindungen unterscheiden sich im Volumen nicht wesentlich von denjenigen der Sterole der Ergosterol-Biosynthese. Auch beweisen die wirksamen Verbindungen von *Gans* und *Renard*, daß das Vorhandensein von Heteroatomen in der Seitenkette keinen wesentlich negativen Einfluß auf die Wirksamkeit hat. Aber offensichtlich reicht das alleinige Vorhandensein eines Seitenkettenäquivalents nicht aus, um diesen Verbindungen antimykotische Aktivität zu verleihen.

5.2.2 Inhibitoren der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase

Bei den Verbindungen von *Salman* konnten einige als potente und spezifische Inhibitoren der $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase identifiziert werden. Die Anzahl der getesteten Azasecosteroide erlaubt auch erstmalig vorsichtige Aussagen über bestimmte Struktur–Wirkstärke–Beziehungen.

So scheint eine Methylsubstitution des Stickstoffs die optimale Strukturvoraussetzung für eine gute inhibitorische Wirkung zu sein.

5.2.3 Inhibitoren der C-24-Methyltransferase

Bei den Azasterolen erwiesen sich diejenigen Verbindungen mit Hydroxy-Gruppe an C-3 allen anderweitig substituierten Verbindungen überlegen.

Über die strukturellen Voraussetzungen der Seitenkette lassen sich mit den bis jetzt getesteten Vertretern dieses Inhibitorentyps noch keine sicheren Aussagen treffen.

Mit der Substanz **MG-34** konnte erstmalig ein Inhibitor der $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase identifiziert werden.

5.2.4 Inhibitoren der Squalenepoxidcyclase / Sterol-C-4-Demethylase

Neue Targets in unserer Arbeitsgruppe stellen die Squalenepoxidcyclase und die Sterol-C-4-Demethylase dar. Auch die durch diese Enzyme katalysierten Vorgänge laufen über carbokationische Zwischenstufen ab. Diese versucht(e) *Lange* mit ihren

Verbindungen zu imitieren – leider, wie das Screening ihrer bisherigen Substanzen zeigt, bis zur Beendigung der vorliegenden Arbeit, noch ohne Erfolg. Die Substanzen besitzen zwar zum Teil ausgeprägte antimykotische Aktivität im Agar-Diffusions-Assay, hemmen aber keines der anvisierten Enzyme.

Allerdings konnte bei der Testung des Allylamin-Analogons **EK-65** von *Kirchisner* die Akkumulation von Squalen nachgewiesen werden. Obwohl das Pilzwachstum durch die Testsubstanz nicht signifikant abnahm, konnte mit dem Auftreten dieser Lanosterol-Vorstufe eine Beeinflussung der Squalenepoxidcyklase nachgewiesen werden.

5.2.5 Inhibitoren der Lanosterol-14 α -demethylase

Als Beispiel für eine selektive Hemmung der Lanosterol-14 α -demethylase können die beiden getesteten Enantiomere des **Ketoconazol** dienen. Bei beiden akkumuliert Lanosterol als klares Indiz für die selektive Hemmung dieses Enzyms.

Festzuhalten ist die Beobachtung, daß das (-)-Enantiomer minimal besser wirksamer ist als das (+)-Enantiomer (Faktor 1.1).

5.3 Ausblick

Wenn es auch nicht gelungen ist, die Synthese von neuen $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase-Inhibitoren unter Umgehung des teuren Edukts Vitamin D zu erreichen, erlauben die Verbindungen **29** über ihre Carbonyl-Gruppe und **53** über ihre Lactam-Struktur die einfache Darstellung entsprechender Derivate zur Darstellung von azasterolähnlichen Verbindungen.

Dennoch sollte man klar unterstreichen, daß diese Grundstrukturen wahrscheinlich nur mit *trans*-Verknüpfung jemals zu erfolgreichen SBIs führen werden. Ob die stereoselektive Darstellung dieser Strukturen jedoch auf „einfachem“ und kostengünstigem Weg als über das Edukt Vitamin D zu erreichen ist, sei an dieser Stelle dahingestellt. Die Ringspannung des 1-Pyrindins fördert, wie die vorliegende Arbeit zeigt, jedenfalls eindeutig die *cis*-Verknüpfung.

Die von Müller entwickelte Screening-Methode zur Charakterisierung des Inhibitionsverhalten von Substanzen hat sich als unverzichtbares Hilfsmittel bei der Untersuchung bekannter bzw. potentiell antimykotisch wirksamer Substanzen erwiesen. Sie wird für unserer Arbeitsgruppe mit ihrer (mittlerweile auf eine beachtliche Größe) angewachsenen Datenbank auch in Zukunft bei der Wirkstofffindung und -verbesserung ein wertvolles Werkzeug darstellen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Parameter

Alle Geräte wurden im Allgemeinen mit den nachstehenden Parametern betrieben, sofern nicht anders im Text angegeben.

6.1.1 Geräte des Testsystems auf Sterolbiosynthese-Inhibitoren

Folgende Geräte kamen bei dem in Kapitel 4.1 beschriebenen Testsystem zum Einsatz:

- **GC-MS**

Hewlett-Packard HP5972 EI-MS mit *GC HP5980II*, Split-/Splitless-Injektor, Constant-Flow-Control, Autosampler

ChemStation Software G1701BA Ver. B.01.00

Säule: *Agilent* HP5-MS, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm

Fluß: 1,4 ml/min Helium

Injektionsvolumen: 2 µl, splitless

Injektortemperatur: 250°C

Detektortemperatur: 280°C

Temperaturprogramm:

55°C	1 min
55°C → 260°C	20°C/min
260°C → 300°C	3°C/min
300°C	1 min

- **Mikrobiologische Werkbank**

Heraeus/Kendro HS-12

- **Schüttelinkubator**

Infors AG, Modell *AK-82*

240 UPM, 28°C

- **Brutschrank**
Memmert BE500
28°C, Luftzufuhr Stufe 6
- **Zentrifuge**
Heraeus/Kendro Megafuge 1.0
4000 UPM, 7 min, 35°C
- **SPE-Vakuumkammer**
IST-International Sorbent Technology VacMaster 10 mit PTFE-Hahn und -
Nadel
- **SPE-Kartuschen**
Merck® LiChrolut EN 200 mg, 3 ml
- **Membranfiltration**
Membranfiltrationsgerät GV-Serie von *Schleicher & Schuell*
Filter: *Schleicher & Schuell* Membranfilter RC-L 60, 1 µm, 50 mm

6.1.2 Geräte für den präparativ-chemischen Teil

Im Rahmen des Experimentellen Teils dieser Arbeit wurden nur solche Verbindungen aufgenommen, die ausreichend charakterisiert werden konnten. Bereits literaturbekannte Synthesestufen sind nur dann aufgeführt, wenn sie auf einem neuen Weg dargestellt oder um bislang unbekanntes Daten ergänzt werden konnten.

- **Schmelzpunktbestimmung**
Schmelzpunktapparatur *BÜCHI Melting Point B-540*
- **¹H-NMR-Spektrometer**
Jeol GSX 400 (400 MHz) bzw. *Jeol JNMR-GX 500* (500 MHz)
- **¹³C-NMR-Spektrometer**
Jeol GSX 400 (100 MHz) bzw. *Jeol JNMR-GX 500* (125 MHz)
- **IR-Spektrometer**
Jasco FT/IR-400 bzw. *Perkin Elmer FTIR-Paragon 1000*

- **Massenspektrometer**

Hewlett Packard 5989 A Mass Spectrometer

- **Elementaranalyse**

CHN-Elementaranalysator *Rapid* (Firma *Heraeus*)

Die oben genannten Kernresonanzspektrometer kamen ebenso bei DEPT- HH-COSY-, CH-COSY-, NOE-, HMQC- und HMBC-Spektren zum Einsatz Die hierbei angegebenen Zahlenwerte beziehen sich auf die δ -Skala mit Tetramethylsilan (TMS) als internem Standard ($\delta = 0.00$). Die chemischen Verschiebungen (δ) werden in ppm, die Kopplungskonstanten (J) in Hz angegeben. Als Lösungsmittel wurden CDCl_3 , CD_3OD oder $\text{DMSO}-d_6$ verwendet.

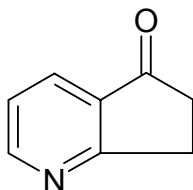
Bezüglich der IR-Spektren wurden Feststoffe als Kaliumbromid-Pressling gemessen, ölige bzw. flüssige Substanzen als Film zwischen Natriumchlorid-Fenster.

Die Massenspektren wurden mit folgenden Techniken aufgenommen: Elektronenstrahlionisation (EI) bei 70 eV Anregungsenergie und Chemische Ionisation (CI) mit Methan als Reaktandgas.

Die säulenchromatographische Reinigung der Rohprodukte wurde durch Flashchromatographie unter Verwendung von Kieselgel 60 der mittleren Korngröße 0.040 – 0.063 mm (*Merck*) durchgeführt. Die Elutionsmittel wurden vor Verwendung destilliert. Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigfolien Kieselgel 60₂₅₄ (*Macherey-Nagel*) verwendet. Daneben wurden die nach der Flashchromatographie erhaltenen Fraktionen mittels der in 6.1.1 genannten GC-MS auf Zusammensetzung bzw. Reinheit überprüft. Die Angaben zur Ausbeute beziehen sich daher nur auf die Substanzmenge der Fraktionen, bei denen diese Kriterien erfüllt waren.

6.2 Synthesen

6.2.1 6,7-Dihydro-5-oxo-5H-[1]-pyrindin (11)



1.19 g (10.0 mmol) 6,7-Dihydro-5H-[1]-pyrindin (Pyrindan; Aldrich®), 50 ml *tert.*-Butanol, 10 ml Wasser und 8,00 g Magnesiumsulfat werden in einem 500 ml Kolben vorgelegt. Unter Rühren wird über 15 min bei Raumtemperatur eine Lösung von 4.12 g (26.0 mmol) Kaliumpermanganat in 150 ml Wasser zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Braunstein wird abfiltriert und mit Ethanol und Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird 4 x mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert, über Kaliumcarbonat getrocknet und zu einem braunen Öl einrotiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EtOAc, DC: $R_f = 0.4$) gereinigt.

Ausbeute: 0.76 g (57 %)

grau-violetter Feststoff

Schmelzpunkt: 62 °C

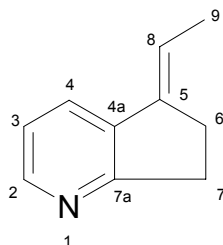
HR-MS: C₈H₇NO

Ber.: 133.0528

Gef.: 133.0524

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 2.80 (m, 2 H, CH₂), 3.30 (t, 2 H, J = 6.2 Hz, CH₂), 7.34 (dd, 1H, J = 2.8 Hz, 4.8 Hz, arom. H), 8.04 (dd, 1H, J = 1.3 Hz, 7.7 Hz, arom. H), 8.82 (dd, 1H, J = 1.3 Hz, 4.8 Hz,

	aromat. H)
¹³C-NMR (CDCl₃):	δ (ppm) = 28.8 (CH ₂), 35.8 (CH ₂), 122.5 (aromat. CH), 130.3 (quart. aromat. C), 131.9 (aromat. CH), 147.4 (aromat. CH), 174.4 (quart. aromat. C), 204.9 (C=O)
IR:	ν (cm ⁻¹) = 3400, 3088, 3013, 2959, 2918, 2851, 1710, 1572, 1469, 1417, 1318, 1281, 1256, 1162, 1092, 1049, 796
MS (APCI):	m/z (%) = 219 (100) [M ⁺ +1], 205 (26), 191 (100), 177 (18), 161 (18), 149 (18)
MS (EI 70 eV):	m/z (%) = 218 (2) [M] ⁺ , 161 (44), 149 (78), 118 (70), 91 (52), 57 (68)

6.2.2 (*E*)-5-Ethyliden-6,7-dihydro-5*H*-[1]-pyrindin (**12**)

14.8 g (40.0 mmol) Ethyltriphenylphosphoniumbromid und 2.24 g (30.0 mol) Kalium-*tert.*-butoxid werden in 40 ml THF (wasserfrei) gelöst. Anschließend werden 2.00 g (15.0 mmol) 6,7-Dihydro-5-oxo-5*H*-[1]-pyrindin (**11**) in 10 ml THF langsam unter Rühren dazu getropft und der Ansatz unter Stickstoff 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Gemisch filtriert, wobei mit THF nachgespült wird. Anschließend wird mit Diethylether extrahiert und die eingeeengten Etherphasen säulenchromatographisch (Ethylacetat:Hexan = 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 7.20 g (49 %)

schwarzer Feststoff

Schmelzpunkt: 52 °C

Elementaranalyse: C₁₀H₁₁N (145.21)

Ber.: C: 82.72 H: 7.64 N: 9.65

Gef.: C: 82.43 H: 7.56 N: 9.53

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1.81 (d, *J* = 7.1, 3 H, 9-H), 2.78 – 2.67 (m, 2 H, 6-H), 3.12 – 3.01 (m, 2 H, 7-H), 6.04 (m, 1 H, 8-H), 7.04 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 5.1 Hz, 1 H, 3-H), 7.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H, 4-H), 8.33 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, 2-H)

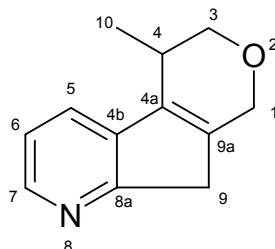
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 14.4 (CH_3 , C-9), 25.7 (CH_2 , C-6), 31.9 (CH_2 , C-7), 116.6 (olefin. CH, C-8), 121.3 (aromat. CH, C-3), 127.0 (aromat. CH, C-4), 135.0 (quart. aromat. C, C-4a), 140.0 (quart. olefin. C, C-5), 148.3 (aromat. CH, C-2), 166.5 (quart. aromat. C, C-7a)

IR: ν (cm^{-1}) = 3410, 2922, 2852, 1717, 1661, 1589, 1570, 1466, 1431, 1416, 1376, 1216, 1101, 788

MS (APCI): m/z (%) = 146 (100) [M^++1]

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 145 (100) [M^{++}], 130 (98), 117 (32), 103 (9), 89 (13), 77 (12), 63 (17), 51 (15)

6.2.3 4-Methyl-1,3,4,9-tetrahydro-2-oxa-8-aza-fluoren (13)



0.6 g (4 mmol) (*E*)-5-Ethyliden-6,7-dihydro-5*H*-[1]-pyridin (**12**) werden 3 Stunden mit 0.6 g (0.02 mol) Paraformaldehyd und 8.0 ml (0.06 mol) Bortriflourdiethyletherat in 50 ml Dichlormethan unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend verteilt man den Ansatz zwischen Wasser und Dichlormethan, trennt die organische Phase ab und extrahiert die wässrige noch dreimal mit Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer einrotiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (erst EtOAc, dann EtOH, dann MeOH) gereinigt.

Ausbeute: 60 mg (10 %)

dunkelrotes Öl

HR-MS: C₁₂H₁₃NO

Ber.: 187.0997

Gef.: 187.1001

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1.30 (d, *J* = 7.2, 3 H, 10-H), 2.78 (m, 1 H, 4-H), 3.37 (d, *J* = 7.7 Hz, 2 H, 9-H), 3.69 (dd, *J* = 11.4 Hz, *J* = 4.1 Hz, 1 H, 3-H), 3.91 (dd, *J* = 11.0 Hz, *J* = 4.1 Hz, 1 H, 3-H), 4.56 (d, *J* = 6.2 Hz, 2 H, 1-H), 7.15 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 5.1 Hz, 1 H, 6-H),

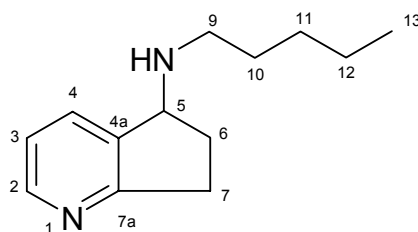
7.53 (dd, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1 H, 5-H), 8.31 (dd, $J = 5.1$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 1 H, 7-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 16.6 (CH_3 , C-10), 28.4 (CH, C-4), 39.3 (CH_2 , C-9), 66.5 (CH_2 , C-1), 70.8 (CH_2 , C-3), 121.1 (aromat. CH, C-6), 125.3 (aromat. CH, C-5), 137.3 (olefin. quart. C, C-4a), 137.5 (aromat. quart. C, C-4b), 138.8 (olefin. quart. C, C-9a), 144.5 (aromat. CH, C-7), 164.7 (aromat. quart. C, C-8a)

IR: ν (cm^{-1}) = 3400, 2927, 2854, 1718, 1657, 1589, 1489, 1458, 1365, 1146, 1024, 860, 775, 688

MS (APCI): m/z (%) = 188 (100) [$\text{M}^+ + 1$]

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 187 (61) [$\text{M}]^+$, 172 (40), 158 (82), 142 (62), 130 (89), 117 (100), 77 (42), 51 (38)

6.2.4 5-(*N*-Pentylamino)-6,7-dihydro-5*H*-[1]-pyrindin (**14**)

A. 1.0 g (12 mmol) *n*-Pentylamin werden in 5 ml trockenem Methanol vorgelegt und mit einer methanolischen HCl-Lösung auf pH 6 eingestellt. Zur Lösung werden 0.27 g (2.0 mmol) 6,7-Dihydro-5-oxo-5*H*-[1]-pyrindin (**11**) und 70 mg (12 mmol) Natriumcyanoborhydrid gegeben. Der Ansatz wird 72 Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wird die Lösung mit konz. Salzsäure auf pH < 2 eingestellt und eingeeengt. Der Rückstand wird in 2 ml Wasser aufgenommen und 3 x mit je 5 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit festem Kaliumhydroxid auf pH > 10 eingestellt, mit Natriumchlorid gesättigt und 5 x mit je 3 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EtOAc:MeOH = 2:1, DC: R_f = 0.45) gereinigt.

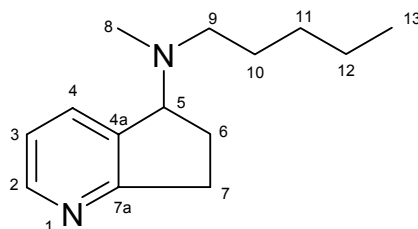
Ausbeute: 0.20 g (48 %)

braunes Öl

B. Zu einer Lösung bestehend aus 0.70 g (8.0 mmol) *n*-Pentylamin und 0.27 g (2.0 mmol) 6,7-Dihydro-5-oxo-5*H*-[1]-pyrindin (**11**) in 8 ml Methanol wird eine Lösung von 0.13 g (2.0 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 0.14 g (1.0 mmol) Zinkchlorid gelöst in 5 ml Methanol hinzugefügt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre für mindestens 3 Stunden gerührt. (Aufarbeitung siehe **A.**)

Ausbeute: 0.12 g (45 %)

HR-MS:	$C_{13}H_{20}N_2$
	Ber.: 203.1548
	Gef.: 203.1564
1H-NMR ($CDCl_3$):	δ (ppm) = 0.86 (m, 3 H, 13-H), 1.33 – 1.24 (m, 4 H, 11-H, 12-H), 1.57 – 1.44 (m, 2 H, 10-H), 1.89 – 1.81 (m, 1 H, 6-H), 2.47 – 2.39 (m, 1 H, 6-H), 2.66 (pseudo-dt, $J = 7.1$ Hz, $J = 0.9$ Hz, 2 H, 9-H), 2.89 (dt, $J = 12.4$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 1 H, 7-H), 3.07 (m, 1 H, 7-H), 4.26 (t, $J = 6.8$ Hz, 1 H, 5-H), 7.05 (dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 5.8$ Hz, 1 H, 3-H), 7.63 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H, 4-H), 8.36 (dd, $J = 5.0$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1 H, H-2)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$):	δ (ppm) = 14.0 (CH_3 , C-13), 22.5 (CH_2 , C-12), 29.5 (CH_2 , C-11), 29.9 (CH_2 , C-10), 31.5 (CH_2 , C-6), 32.2 (CH_2 , C-7), 47.0 (CH_2 , C-9), 61.3 (CH, C-5), 121.2 (aromat. CH, C-3), 132.2 (aromat. CH, C-4), 137.9 (aromat. quart. C, C-4a), 148.9 (aromat. CH, C-2), 164.7 (aromat. quart. C, C-7a)
IR:	ν (cm^{-1}) = 3662, 3303, 3047, 2958, 2929, 2858, 1579, 1464, 1421, 1265, 1092, 795, 737, 704
MS (APCI):	m/z (%) = 205 (100) [M^{+1}], 133 (60), 118 (41)
MS (EI 70 eV):	m/z (%) = 204 (7) [M^{+}], 118 (100), 91 (16), 69 (13), 57 (31)

6.2.5 5-(*N*-Methyl-*N*-pentylamino)-6,7-dihydro-5*H*-[1]-pyrindin (**15**)

A. 0.10 g (0.50 mmol) 5-(*N*-Pentylamino)-6,7-dihydro-5*H*-[1]-pyrindin (**14**), 0.25 ml Formaldehydlösung (37%ige wässrige Lösung) und 0.19 g (1.5 mmol) Natriumcyanoborhydrid werden in 6 ml Methanol gelöst und mit Eisessig auf pH 6 – 7 eingestellt. Der Ansatz wird unter Stickstoffatmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung mit konz. HCl auf pH < 2 eingestellt und eingeengt. Der Rückstand wird in 10 ml Wasser aufgenommen und 3 x mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit festem Kaliumhydroxid auf pH > 10 eingestellt, mit Natriumchlorid gesättigt und 5 x mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EtOAc: konz. NH₃ = 100:1, DC: R_f = 0.5) gereinigt.

Ausbeute: 60 mg (56 %)

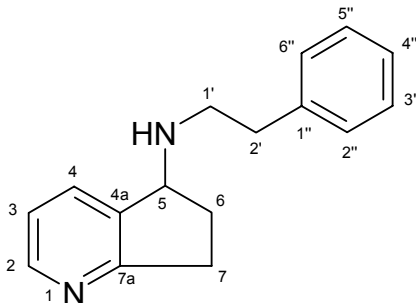
braunes Öl

B. 0.27 g (1.2 mmol) 6,7-Dihydro-5-oxo-5*H*-[1]-pyrindin (**11**) werden in 10 ml Methanol gelöst. Der Ansatz wird mit methanolischer HCl auf pH ~ 6 eingestellt. Anschließend werden 0.46 g (7.3 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 0.74 g (7.3 mmol) *N*-Methylpentylamin gelöst in 5 ml Methanol hinzugefügt. Der Ansatz wird unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur 72 Stunden gerührt. Anschließend wird die Lösung mit konz. HCl auf pH < 2 eingestellt und eingeengt. Der Rückstand wird in 10 ml Wasser aufgenommen und 3 x mit je 10 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit festem Kaliumhydroxid auf pH > 10 eingestellt, mit

Natriumchlorid gesättigt und 5 x mit je 10 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EtOAc:konz. NH_3 = 100:1, DC: R_f = 0.5) gereinigt.

Ausbeute: 0.12 g (45 %)

HR-MS:	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2$
	Ber.: 218.1783
	Gef.: 218.1805
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):	δ (ppm) = 0.86 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, 13-H), 1.32 – 1.18 (m, 4 H, 11-H, 12-H), 1.54 – 1.40 (m, 2 H, 10-H), 2.11 – 2.03 (m, 2 H, 6-H), 2.16 (s, 3 H, 8-H), 2.37 – 2.32 (m, 2 H, 9-H), 2.94 – 2.85 (m, 1 H, 7-H), 3.04 – 2.96 (m, 1 H, 7-H), 4.42 (t, J = 7.3 Hz, 1 H, 5-H), 7.08 (dd, J = 7.6 Hz, J = 4.9 Hz, 1 H, 3-H), 7.62 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, 4-H), 8.37 (d, J = 4.9 Hz, 1 H, 2-H)
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):	δ (ppm) = 14.0 (CH_3 , C-13), 22.0 (CH_2 , C-6), 22.6 (CH_2 , C-12), 27.8 (CH_2 , C-10), 29.6 (CH_2 , C-11), 32.4 (CH_2 , C-7), 37.5 (CH_3 , C-8), 53.5 (CH_2 , C-9), 67.3 (CH, C-5), 121.3 (aromat. CH, C-3), 133.3 (aromat. CH, C-4), 136.9 (quart. aromat. C, C-4a), 148.7 (aromat. CH, C-2), 164.6 (quart. aromat. C, C-7a)
IR:	ν (cm^{-1}) = 3410, 3063, 2955, 2930, 2858, 2795, 1738, 1666, 1592, 1579, 1464, 1422, 1093, 1051, 795, 728
MS (APCI):	m/z (%) = 219 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 205 (26), 191 (100), 177 (18), 161 (18), 149 (18)
MS (EI 70 eV):	m/z (%) = 218 (2) [M^{++}], 161 (44), 149 (78), 118 (70), 91 (52), 57 (68)

6.2.6 5-(*N*-2-Phenylethylamino)-6,7-dihydro-5*H*-[1]-pyrindin (16)

Zu einer Lösung von 0.73 g (6.0 mmol) 2-Phenylethylamin und 0.80 g (6.0 mmol) 6,7-Dihydro-5-oxo-5*H*-[1]-pyrindin (**11**) in 10 ml Methanol werden unter Rühren bei Raumtemperatur 0.38 g (6.0 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 0.42 g (6.0 mmol) Zinkchlorid, gelöst in 10 ml Methanol, gegeben. Die Lösung wird über Nacht gerührt und zur Aufarbeitung in 0.1 N Natronlauge (40 ml) aufgenommen. Anschließend wird der Großteil des Methanols abrotiert und die wässrige Phase 3 x mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und säulenchromato-graphisch (EtOAc:MeOH = 2:1, DC: $R_f = 0.45$) gereinigt.

Ausbeute: 0.14 g (17 %)

gelbes Öl

HR-MS: $C_{16}H_{18}N_2$

Ber.: 238.1470

Gef.: 238.1489

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 2.07 – 1.88 (m, 1 H, 6-H), 2.52 – 2.40 (m, 1 H, 6-H), 3.26 – 2.83 (m, 6 H, 7-H, 1'-H, 2'-H), 4.38 (t, $J = 6.6$ Hz, 1 H, 5-H), 7.05 (dd, $J = 7.4$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1 H, 3-H), 7.32 – 7.13 (m, 5 H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H), 7.65 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H, 4-

H), 8.38 (d, $J = 4.8$ Hz, 1 H, 2-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 32.2 (2 CH_2 , C-6, C-7), 35.8 (CH_2 , C-2'), 47.7 (CH_2 , C-1'), 60.9 (CH, C-5), 121.3 (aromat. CH, C-3), 126.4 (aromat. CH, C-4''), 128.6 (2 aromat. CH, C-2'', C-6''), 128.7 (2 aromat. CH, C-3'', C-5''), 129.7 (aromat. CH, C-4), ca. 132* (quart. aromat. C, C-4a), ca. 136* (quart. aromat. C, C-1''), 149.2 (aromat. CH, C-2), 164.8 (quart. aromat. C, C-7a)

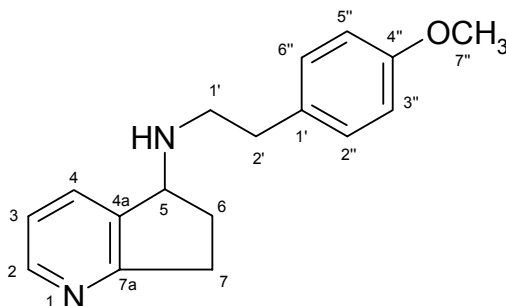
IR: ν (cm^{-1}) = 3399, 3052, 2959, 2931, 2871, 2860, 1638, 1584, 1458, 1423, 1378, 1266, 1151, 1096, 793, 737, 702

MS (APCI): m/z (%) = 239 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 168 (28), 154 (50), 138 (80)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 238 (2) [M] $^+$, 147 (42), 118 (100)

* gemäß HMBC

6.2.7 5-[N-2-(4-Methoxyphenyl)-ethylamino]-6,7-dihydro-5H-[1]-pyrindin (17)



Zu einer Lösung von 0.46 g (3.0 mmol) 2-(4-Methoxyphenyl)-ethylamin und 0.40 g (3.0 mmol) und 6,7-Dihydro-5-oxo-5H-[1]-pyrindin (**11**) in 5 ml Methanol werden unter Rühren bei Raumtemperatur 0.19 g (3.0 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 0.21 g (3.0 mmol) Zinkchlorid, gelöst in 5 ml Methanol, gegeben. Die Lösung wird über Nacht gerührt und zur Aufarbeitung in 0.1 N Natronlauge (20 ml) aufgenommen. Anschließend wird der Großteil des Methanols abrotiert und die wässrige Phase 3 x mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und säulenchromatographisch (EtOAc:MeOH = 2:1, DC: $R_f = 0.45$) gereinigt.

Ausbeute: 0.17 g (21%)

dunkelbraunes Öl

HR-MS: $C_{16}H_{18}N_2$

Ber.: 268.1576

Gef.: 268.1575

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 2.00 – 1.90 (m, 1 H, 6-H), 2.49 – 2.38 (m, 1 H, 6-H), 2.91 – 2.68 (m, 4 H, 1'-H, 2'-H), 3.00 – 2.92 (m, 1 H, 7-H), 3.19 – 3.05 (m, 1 H, 7-H), 3.68 (s, 3 H, 7''-H), 6.80 – 6.73 (m, 2 H,

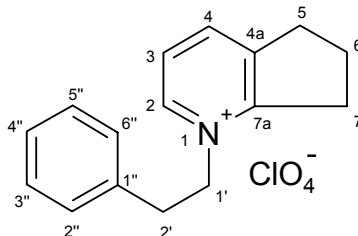
3''-H, 5''-H), 7.01 – 7.04 (m, 2 H, 2''-H, 6''-H), 7.26 (dd, $J = 6.5$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 1 H, 3-H), 7.84 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H, 4-H), 8.40 (d, $J = 5.3$ Hz, 1 H, 2-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 29.7 (CH_2 , C-6), 30.5 (CH_2 , C-7), 32.9 (CH_2 , C-2'), 49.6 (CH_2 , C-1'), 56.0 (CH_3 , C-7''), 62.3 (CH, C-5), 115.4 (2 aromat. CH, C-3'', C-5''), 123.7 (aromat. CH, C-3), 131.0 (2 aromat. CH, C-2'', C-6''), 131.1 (quart. aromat. C, C-1''), 136.0 (aromat. CH, C-4), 139.6 (quart. aromat. C, C-4a), 150.3 (aromat. CH, C-2), 160.3 (quart. aromat. C, C-4''), 166.4 (quart. aromat. C, C-7a)

IR: ν (cm^{-1}) = 3421, 2999, 2955, 2934, 2836, 2423, 2212, 1611, 1585, 1513, 1442, 1248, 1178, 1115, 1032, 822

MS (APCI): m/z (%) = 269 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 192 (13), 147 (20), 135 (11), 118 (39)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 268 (1) [$\text{M}]^+$, 147 (27), 118 (100), 91 (11), 77 (7), 65 (6), 51 (4)

6.2.8 *N*-(2-Phenylethyl)-6,7-dihydro-5*H*-[1]pyrindiniumperchlorat (18)

3.98 g (25.0 mmol) 6,7-Dihydro-5*H*-pyrindin und 5.09 g (27.5 mmol) 2-Phenylethylbromid werden in 12 ml Aceton unter Zusatz von 240 mg (1.28 mmol) Lithiumiodid-Trihydrat unter Lichtschutz 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der gebildete Niederschlag wird abgetrennt, in wenig Wasser gelöst, durch Zusatz von 10 ml gesättigter Natriumperchlorat-Lösung in der Siedehitze umgefällt und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1.94 g (24 %)

weiße Kristalle

Schmelzpunkt: 149 °C

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 2.13 (m, 2 H, 6-H), 3.10 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H, 5-H), 3.22 (m, 4 H, 7-H, 2'-H), 4.74 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H, 1'-H), 7.21 – 7.18 (m, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.34 – 7.25 (m, 3 H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 7.85 (dd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1 H, 3-H), 8.38 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, 4-H), 8.67 (d, *J* = 5.9 Hz, 1 H, 2-H)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 21.7 (CH₂, C-6), 30.0 (CH₂, C-5), 30.6 (CH₂, C-7), 34.6 (CH₂, C-2'), 58.3 (CH₂, C-1'), 124.8 (aromat. CH, C-3), 126.6 (aromat. CH, C4''), 128.1 (2 aromat. CH, C-2'', C-6''), 128.5 (2 aromat. CH, C-3'', C-5''), 135.7 (quart. aromat. C, C-

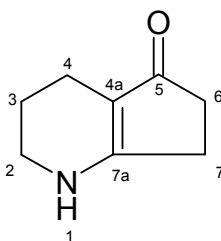
1"), 140.2 (aromat. CH, C-4), 141.3 (aromat. CH, C-2), 144.2 (quart. aromat. C, C-4a), 160.5 (quart. aromat. C, C-7a)

IR: ν (cm⁻¹) = 3410, 2929, 2856, 1703, 1639, 1452, 1361, 1257, 1232, 1020, 800, 702

MS (APCI): m/z (%) = 224 (100) [M⁺+1]-ClO₄

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 223 (31) [M]⁺⁺]-ClO₄, 118 (30), 104 (100), 77 (14)

6.2.9 5-Oxo-1,2,3,4,6,7-hexahydro-5H-[1]-pyrindin (19)



In einem Zweihalskolben mit Septum und Zweiwegehahn werden 1.0 g (7.51 mmol) 6,7-Dihydro-5-oxo-5H-[1]-pyrindin (**11**) in 50 ml Ethanol gelöst und 0.1 g Hydrierkatalysator (Pd/C 10%) zugegeben. Die Apparatur wird im Wasserstrahlvakuum evakuiert und anschließend mittels einer Gasbürette mit Niveauegleichssystem Wasserstoff eingeleitet. Den Reaktionsansatz rührt man nun bei Raumtemperatur bis zum Ende der Wasserstoffaufnahme. Vor Öffnen der Apparatur wird der Wasserstoff durch Evakuierung entfernt. Der Katalysator wird über eine Glasfritte abgetrennt, wobei ständig mit Wasser befeuchtet wird. Anschließend wird mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rohextrakt wird abschließend säulenchromatographisch (EtOAc:Heptan = 1:1 DC: $R_f = 0.5$) gereinigt.

Ausbeute: 0.85 g (85 %)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 143 °C

HR-MS: $C_8H_{11}NO$

Ber.: 135.0684

Gef.: 135.0714

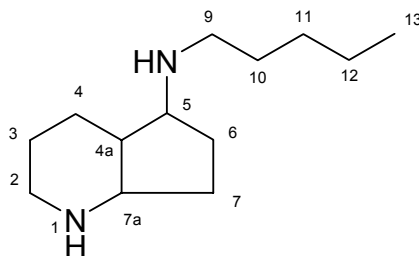
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 1.80 (dt, $J = 11.9$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 2 H, 3-H), 2.26 (t, $J = 5.9$ Hz, 2 H, 4-H), 2.37 (t, $J = 5.2$ Hz, 2 H, 7-H), 2.49 (t, $J = 5.2$ Hz, 2 H, 6-H), 3.34 (m, 2 H, 2-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 17.9 (CH_2 , C-4), 20.7 (CH_2 , C-3), 25.6 (CH_2 , C-6), 33.2 (CH_2 , C-7), 41.9 (CH_2 , C-2), 108.8 (olefin. quart. C, C-4a), 172.3 (olefin. quart. C, C-7a), 200.8 (C=O, C-5)

IR: ν (cm^{-1}) = 3390, 2930, 2855, 1670, 1542, 1396, 1346, 1294

MS (APCI): m/z (%) = 138 (100) [$\text{M}^+ + 1$]

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 137 (100 [$\text{M}]^{++}$), 108 (88), 94 (68), 81 (57)

6.2.10 5-(*N*-Pentylamino)-octahydro-[1]-pyrindin (20)

0.15 g (0.73 mmol) 5-(*N*-Pentylamino)-6,7-dihydro-5*H*-[1]-pyrindin (**14**) werden in einem Zweihalskolben in Eisessig gelöst. Dann werden in dieser Lösung 20 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) suspendiert. Anschließend wird das Gefäß mittels Wasserstrahlpumpe mehrmals evakuiert und anschließend unter durchwirbelndem Rühren einer Wasserstoffatmosphäre ausgesetzt. Sobald kein Wasserstoff mehr verbraucht wird ist die Reaktion beendet. Zur Aufarbeitung wird der Katalysator vorsichtig abfiltriert. Das Lösungsmittel wird abrotiert und der Rückstand säulenchromato-graphisch gereinigt.

Ausbeute: 34 mg (22 %)

gelbes Öl

HR-MS: C₁₃H₂₆N₂

Ber.: 210.2096

Gef.: 210.2080

¹H-NMR (CDCl₃): Bei der obigen Reaktion entstehen verschiedene Isomere ([A], [B] und [C]), die nicht weiter getrennt wurden. Eine Integration der Signale war daher nicht möglich. Die Signale für 2-H, 3-H und 4-H sind bei jeweils 2 Isomeren identisch.

δ (ppm) = 0.84 (13-H [A], [B] & [C]), 1.06 (4a-H [C]), 1.12 (6-H [C]), 1.21 (4-H [A]), 1.23 (11-H [A], [B] & [C]), 1.27 (12-H [A], [B] & [C]), 1.35 (6-H [B], 7-H [A]), 1.37 (7-H [B]), 1.39 (4-H [B]), 1.43 (6-H [A], 10-H [A], [B] & [C]), 1.44 (7-H [C]), 1.52 (4-H [B]), 1.54 (4-H [A]), 1.60 (3-H [B]), 1.62 (3-H [A]), 4a-H [A], 7-H [A]), 1.62 (7-H [B]), 1.70 (3-H [B]), 1.80 (6-H [B]), 1.83 (3-H [A]), 1.90 (6-H [A]), 1.92 (H-4a [A]), 2.02 (6-H [C]), 2.31 (7a-H [C]), 2.49 (9-H [B]), 2.54 (2-H [A]), 2.55 (2-H [B], 9-H [C]), 2.61 (7a-H [B]), 2.74 (9-H [A]), 2.92 (2-H [A]), 3.02 (7a-H [A]), 3.04 (2-H [B]), 3.15 (5-H [A]), 3.16 (5-H [C]), 3.33 (5-H [A])

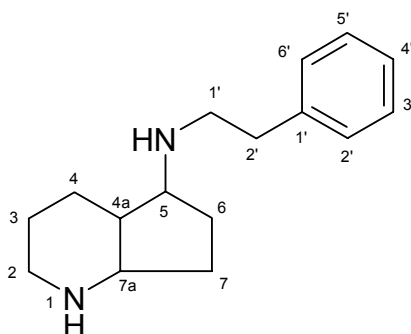
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Bei der obigen Reaktion entstehen verschiedene Isomere ([A], [B] und [C]), die nicht weiter getrennt wurden. Die Signale für C-2, C-3 und C-4 sind bei jeweils 2 Isomeren identisch.

δ (ppm) = 13.9 (2 CH_3 , C-13 [A], [B] & [C]), 19.7 (CH_2 , C-3 [A]), 22.2 (CH_2 , C-3 [B]), 22.5 (CH_2 , C-12 [A], [B] & [C]), 23.7 (CH_2 , C-4 [A]), 23.8 (CH_2 , C-4 [B]), 25.0 (CH_2 , C-7 [A]), 26.1 (CH_2 , C-7 [B]), 28.7 (CH_2 , C-6 [A]), 28.9 (CH_2 , C-6 [B]), 29.1 (CH_2 , C-6 [C]), 29.5 (CH_2 , C-11 [A], [B] & [C]), 29.8 (CH_2 , C-10 [A]), 30.0 (CH_2 , C-10 [B] & [C]), 30.3 (CH_2 , C-7 [C]), 39.5 (CH- C-4a [A]), 40.3 (CH_2 , C-9 [A]), 45.2 (CH, C-4a [B]), 45.3 (CH_2 , C-2 [A]), 47.1 (CH_2 , C-2 [B]), 48.5 (CH_2 , C-9 [B]), 48.8 (CH_2 , C-9 [C]), 51.3 (CH, C-4a [C]), 55.9 (CH, C-5 [A]), 58.3 (CH, C-5 [B]), 59.2 (CH, C-5 [C]), 60.8 (CH, C-7a [A]), 61.6 (CH, C-7a [B]), 62.2 (CH, C-7a [C])

IR: ν (cm^{-1}) = 3402, 2958, 2873, 1712, 1651, 1564, 1408, 1271, 1014, 883, 735

MS (APCI): m/z (%) = 211 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 138 (21)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 210 (27) [M^+], 181 (18), 166 (41), 152 (77), 137 (56), 122 (100), 110 (58)

6.2.11 5-(*N*-2-Phenylethylamino)-octahydro-[1]-pyridin (21)

0.21 g (0.88 mmol) 5-(*N*-2-Phenylethylamino)-6,7-dihydro-5*H*-[1]-pyridin (**16**) werden in einem Zweihalskolben in Eisessig gelöst. Dann werden in dieser Lösung 20 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) suspendiert. Anschließend wird das Gefäß mittels Wasserstrahlpumpe mehrmals evakuiert und anschließend unter durchwirbelndem Rühren einer Wasserstoffatmosphäre ausgesetzt. Sobald kein Wasserstoff mehr verbraucht wird ist die Reaktion beendet. Zur Aufarbeitung wird der Katalysator vorsichtig abfiltriert. Das Lösungsmittel wird abrotiert und der Rückstand säulen-chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 97 mg (45 %)

braunes Öl

HR-MS: $C_{16}H_{24}N_2$

Ber.: 244.4940

Gef.: 244.1954

1H -NMR ($CDCl_3$): Bei der obigen Reaktion entstehen verschiedene Isomere ([A] und [B]), die nicht weiter getrennt wurden. Eine Integration der Signale war daher nicht möglich.

δ (ppm) = 1.14 (4a-H [A]), 1.22 (3-H [B]), 1.41 (6-H [B], 7-H

[B]), 1.46 (3-H [A]), 1.52 (6-H [A], 7-H [A]), 1.57 (3-H [A]), 1.58 (3-H [B]), 1.63 (3-H [B]), 1.66 (4-H [A], 4a-H [B]), 1.68 (4-H [B]), 1.86 (6-H [A], 7-H [A]), 2.00 (6-H [B], 7-H [B]), 2.36 (7a-H [A]), 2.60 (2-H [B]), 2.62 (2-H [A]), 2.67 (7a-H [B]), 2.80 (2'-H [A] & [B]), 2.82 (1'-H [A] & [B]), 2.91 (1'-H [A] & [B]), 2.99 (2-H [A]), 3.01 (2-H [B]), 3.21 (5-H [A]), 3.22 (5-H [B]), 7.18 (3''-H, 5''-H [A] & [B]), 7.20 (4''-H [A] & [B]), 7.27 (2''-H, 6''-H [A] & [B])

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Bei der obigen Reaktion entstehen verschiedene Isomere ([A] und [B]), die nicht weiter getrennt wurden.

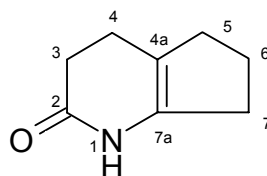
δ (ppm) = 21.8 (CH_2 , C-3 [A]), 23.6 (CH_2 , C-3 [B]), 25.8 (CH_2 , C-4 [A]), 26.2 (CH_2 , C-4 [B]), 28.7 (2 CH_2 , C-7 [A] & [B]), 30.0 (CH_2 , C-6 [A]), 30.2 (CH_2 , C-6 [B]), 36.3 (CH_2 , C-2' [A]), 36.5 [CH_2 , C-2' [B]), 44.9 (CH_2 , C-2 [A]), 45.0 (CH, C-4a [A]), 46.9 (CH_2 , C-2 [B]), 49.6 (CH_2 , C-1' [A]), 49.8 (CH_2 , C-1' [B]), 50.9 (CH, C-4a [B]), 58.1 (CH, C-5 [A]), 59.0 (CH, C-5 [B]), 61.2 (CH, C-7a [B]), 62.0 (CH, C-7a [A]), 126.0 (quart. arom. C, C-1'' [A]), 126.1 (quart. arom. C, C-1'' [B]), 128.3 (aromat. CH, C-2'' [A], C-6'' [A]), 128.4 (aromat. CH, C-2'' [B], C-6'' [A]), 128.6 (aromat. CH, C-3'', C-5'' [A] & [B]), 139.9 (aromat. CH, C-4'' [A] & [B])

MS (APCI): m/z (%) = 245 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 153 (43), 124 (13)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 244 (2) [M^+], 153 (100), 124 (63), 105 (28), 96 (39), 79 (29), 70 (45), 56 (59)

IR: ν (cm^{-1}) = 3282, 3026, 2925, 2851, 1648, 1603, 1496, 1453, 1347, 1116, 749, 700

6.2.12 2-Oxo-1,2,3,4,6,7-hexahydro-5H-[1]pyrindin (22)



In einem 250 ml-Kolben werden 30 g (0.22 mol) Pyrrolidino-1-cyclopenten in 110 ml wasserfreiem Dioxan gelöst. Unter Rühren werden 16 g (0.22 mol) Acrylamid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt, am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM:EtOH = 14:1, DC: R_f = 0.8) gereinigt.

Ausbeute: 6.7 g (22 %)

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 119 °C

HR-MS: $C_8H_{13}NO$

Ber.: 137.0841

Gef.: 137.0843

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 2.00 – 1.90 (m, 2 H, 6-H), 2.39 – 2.21 (m, 6 H, 4-H, 5-H, 7-H), 2.53 (t, J = 8.0, 2 H, 3-H), 7.48 (s, 1 H, N-H)

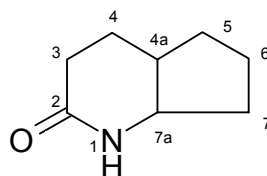
^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 21.3 (CH_2 , C-4), 21.5 (CH_2 , C-6), 30.7 (CH_2 , C-3), 31.0 (CH_2 , C-5), 32.5 (CH_2 , C-7), 113.1 (olefin. quart. C, C-4a), 133.5 (quart. olefin. C, C-7a), 171.8 (C=O, C-2)

IR: ν (cm⁻¹) = 3251, 2955, 2866, 1651

MS (APCI): m/z (%) = 138 (100) [M⁺+1]

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 137 (85) [M]⁺, 109 (33), 94 (28), 81 (100), 67 (19),
55 (40)

6.2.13 2-Oxo-octahydro-[1]-pyrindin (23)



6.7 g (49 mmol) 1,3,4,5,6,7-Hexahydro-2-oxo-[1]-pyrindin (**22**) werden in 50 ml Ethanol gelöst und mit 1.3 g Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) versetzt. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur und Normaldruck hydriert, bis kein Wasserstoff mehr verbraucht wird. Der Katalysator wird abfiltriert, das Filtrat wird einrotiert (DC: DCM:EtOH = 1:1, $R_f = 0.5$).

Ausbeute: 6.2 g (91 %)

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 58 °C

HR-MS: $C_8H_{13}NO$

Ber.: 139.0997

Gef.: 139.1029

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 1.95 – 1.46 (m, 8 H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H), 2.38 – 2.20 (m, 3 H, 3-H, 4a-H), 3.78 – 3.72 (m, 1 H, 7a-H), 6.40 (s, 1 H, N-H)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 23.0 (CH_2 , C-6), 24.0 (CH_2 , C-4), 29.0 (CH_2 , C-3), 29.1 (CH_2 , C-5), 34.8 (CH_2 , C-7), 35.7 (CH, C-4a), 56.3 (CH, C-

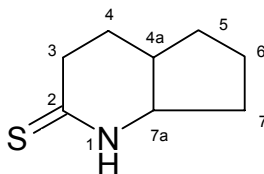
7a), 173.1 (C=O, C-2)

IR: ν (cm⁻¹) = 3208, 2948, 1666, 1453

MS (APCI): m/z (%) = 140 (100) [M⁺+1]

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 139 (32) [M]⁺, 110 (100), 82 (22)

6.2.14 2-Thiono-octahydro-[1]-pyrindin (24)



5.6 g (40 mmol) Octahydro-2-oxo-[1]-pyrindin (**23**) in 50 ml wasserfreiem Toluol werden mit 8.1 g (20 mmol) Lawesson Reagenz versetzt und 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Gemisch einrotiert und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM, DC: $R_f = 0.4$) gereinigt.

Ausbeute: 4.5 g (73 %)

hellgelber Feststoff

Schmelzpunkt: 81 °C

Elementaranalyse: C₈H₁₃NS (155.26)

Ber.: C: 61.89 H: 8.44 N: 9.02 S: 20.65

Gef.: C: 61.90 H: 8.35 N: 9.01 S: 20.21

HR-MS: C₈H₁₃NS

Ber.: 155.0769

Gef.: 155.0774

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1.77 – 1.42 (m, 5 H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H), 1.90 – 1.79 (m, 2 H, 4-H, 5-H), 2.00 – 1.91 (m, 1 H, 7-H), 2.31 (m, 1 H, 4a-

H), 2.72 – 2.62 (m, 1 H, 3-H), 2.91 – 2.81 (m, 1 H, 3-H), 3.69 (m, 1 H, 7a-H), 8.40 (s, 1 H, N–H)

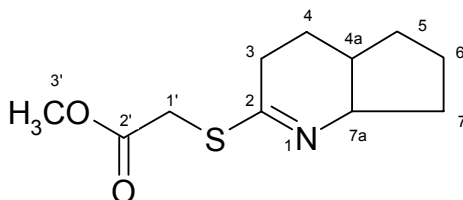
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 23.1 (CH₂, C-6), 24.2 (CH₂, C-4), 30.1 (CH₂, C-5), 33.9 (CH₂, C-7), 34.9 (CH₂, C-4a), 37.4 (CH, C-3), 58.8 (CH-C-7a), 203.3 (C=S, C-2)

IR: ν (cm⁻¹) = 3159, 3046, 2950, 2870, 1703, 1561, 1313, 1105

MS (APCI): m/z (%) = 156 (100) [M⁺+1]

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 155 (100) [M]⁺, 126 (50), 112 (26), 88 (12), 67 (36)

**6.2.15 (4,4a,5,6,7,7a-Hexahydro-3H-[1]-pyrindin-2-ylsulfanyl)-
essigsäuremethylester (25)**



4.65 g (29.0 mmol) Octahydro-[1]-pyrindin-2-thion (**24**) werden in 275 ml Acetonitril gelöst und mit 6.08 g (39.0 mmol) Bromessigsäuremethylester versetzt und 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbe Lösung wird eingeeengt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, mit einer gesättigten Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Ausbeute: 6.03 g (88 %)

gelbes Öl

¹H-NMR (CDCl₃):

δ (ppm) = 1.40 – 1.29 (m, 1 H, 5-H), 1.60 – 1.41 (m, 4 H, 4-H, 6-H, 7-H), 1.83 – 1.69 (m, 2 H, 4-H, 5-H), 2.29 – 1.97 (m, 4 H, 3-H, 4a-H, 7-H), 3.81 – 3.61 (m, 5 H, 1'-H, 3'-H), 3.95 – 3.83 (m, 1 H, 7a-H)

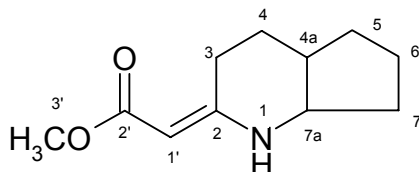
¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm) = 21.8 (CH₂, C-6), 22.3 (CH₂, C-4), 27.5 (CH₂, C-3), 28.7 (CH₂, C-5), 30.0 (CH₂, C-1'), 33.0 (CH₂, C-7), 33.8 (CH, C-4a), 51.3 (CH₃, C-3'), 62.4 (CH-C-7a), 160.5 (C=O, C-2'), 169.4 (C=N, C-2)

MS (APCI): m/z (%) = 228 (100) [$M^+ + 1$], 196 (8)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 227 (32) [M^+], 195 (10), 168 (100), 167 (59), 154 (89), 79 (27), 67 (20), 53 (13)

6.2.16 (Octahydro-[1]-pyrindin-2-yliden)-essigsäuremethylester (26)



6.8 g (30 mmol) (4,4a,5,6,7,7a-Hexahydro-3H-[1]-pyrindin-2-ylsulfanyl)-essigsäuremethylester (**25**), 20 g (75 mmol) Triphenylphosphin und 0.12 g (1.1 mmol) Kalium-*tert.*-butanolat werden in 165 ml DMF 4 Stunden bei 140 °C Ölbadtemperatur unter Stickstoffatmosphäre erhitzt und anschließend über Nacht bei RT weitergerührt. Das Gemisch wird eingeeengt, der Rückstand mit 10%iger Salzsäure versetzt und mit Toluol extrahiert. Die wässrige Phase wird mit festem Kaliumhydrogencarbonat alkalisiert und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden einrotiert und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM, $R_f = 0.6$) gereinigt.

Ausbeute: 1.4 g (24 %)

gelbes Öl

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 1.42 (m, 2 H, 5-H), 1.54 (m, 2 H), 1.73 (m, 1 H), 1.84 (m, 2 H), 1.96 (dd, 1 H, $J = 5.5$ Hz), 2.19 (dq, 1 H, $J = 5.5$ Hz), 2.27 (m, 2 H), 3.62 (s, 3 H, H-3'), 3.69 (m, 1H, H-7a), 4.38 (s, 1 H, 1'H), 8.64 (s, 1 H, NH)

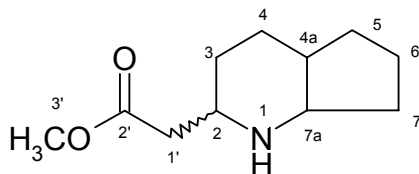
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 23.3 (CH_2 , C-6), 24.4 (CH_2 , C-5), 28.1 (CH_2 , C-7), 31.2 (CH, C-4a), 35.3 (CH_2 , C-4), 36.9 (CH_2 , C-3), 49.8 (CH, C-7a), 54.0 (OCH_3 , C-3'), 79.1 (quart. olefin. C, C-2), 164.3 (olefin CH, C-1'), 170.9 (C=O, C-2')

IR: ν (cm⁻¹) = 2948, 2866, 1650, 1591, 1243, 1167

MS (APCI): m/z (%) = 196 (100) [M⁺⁺1], 164 (24)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 195 (48) [M]⁺⁺, 164 (50), 134 (49)

6.2.17 (Octahydro-[1]-pyrindin-2-yl)-essigsäuremethylester (27)



0.195 g (1.00 mmol) (Octahydro-[1]-pyrindin-2-yliden)-essigsäuremethylester (**26**), gelöst in 2 ml Methanol, werden mit einer Lösung von 0.127 g (1.98 mmol) Natriumcyanoborhydrid, 0.135 g (1.34 mmol) Zinkchlorid in 1 ml Methanol, versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt, anschließend direkt auf Kieselgel einrotiert und säulenchromatographisch (Heptan:EtOAc:EDMA = 7:3:0.5, DC: $R_f = 0.3$) gereinigt.

Ausbeute: 95 mg (48 %)

gelbes Öl

HR-MS: $C_{11}H_{19}NO_2$

Ber.: 197.1416

Gef.: 197.1381

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 1.91 – 1.36 (m, 10 H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H), 2.38 (dd, $J = 2.6$ Hz, $J = 5.1$ Hz, 2 H, 1'-H), 2.91 – 2.84 (m, 1 H, 4a-H), 3.13 (t, $J = 4.4$ Hz, 1 H, 7a-H), 3.67 (s, 3 H, 3'-H), 3.68 (m, 1 H, 2-H)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 22.3 (CH_2 , C-6), 24.9 (CH_2 , C-5), 26.3 (CH_2 , C-7), 27.4 (CH_2 , C-4), 33.7 (CH_2 , C-3), 38.8 (CH, C-4a), 41.4 (CH_2 ,

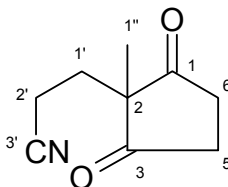
C-1'), 51.5 (CH, C-7a), 52.9 (CH, C-2), 59.1 (OCH₃, C-3'),
172.9 (C=O, C-2')

IR: ν (cm⁻¹) = 3330, 2956, 2866, 1739, 1373, 1240, 1047

MS (APCI): m/z (%) = 198 (40) [M⁺+1], 124 (22)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 197 (16) [M]⁺, 166 (42), 139 (26), 124 (100)

6.2.18 2-Methyl-2-(2-cyanoethyl)-cyclopentan-1,3-dion (28)



0.64 g (16 mmol) Natriumhydroxid werden in 50 ml Wasser gelöst, 11 g (10 mmol) 2-Methyl-1,3-cyclopentadion zugegeben und 10 min unter Rühren erhitzt. Anschließend werden 26 g (0.48 mol) Acrylnitril in 30 ml Dioxan zugegeben und 25 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der entstandene Feststoff abfiltriert und mit einer 1:1 Dioxan-Wasser-Mischung gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 8 ml 2 N HCl versetzt und zum Öl eingengt. Dieses wird in 30 ml Ethylacetat aufgenommen, 30 min unter Rückfluß erhitzt und nach dem Abkühlen filtriert. Das Filtrat wird mit 50 ml Chloroform versetzt, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (EtOAc, DC: $R_f = 0.7$) gereinigt.

Ausbeute: 8.4 g (49 %)

gelbes Öl

HR-MS: $C_9H_{13}NO_3$

Ber.: 165.0790

Gef.: 165.0798

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 1.19 (s, 3 H, 1''-H), 2.03 (t, $J = 7.8$, 2 H, C-1'), 2.37 (t, $J = 7.8$, 2 H, 2'-H), 2.78 – 2.96 (m, 4 H, 5-H, 6-H)

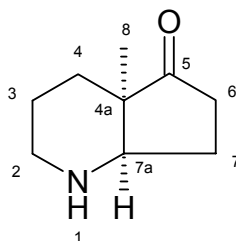
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 12.7 (CH_2 , C-2'), 20.8 (CH_3 , C-1''), 28.3 (CH_2 , C-1'), 34.9 (2 CH_2 , C-5, C-6), 55.2 (quart. C, C-2), 118.6 ($\text{C}\equiv\text{N}$, C-3'), 214.6 (2 $\text{C}=\text{O}$, C-1, C-3)

IR: ν (cm^{-1}) = 3060, 2974, 2932, 2873, 2248, 1721, 1454, 1421

MS (APCI): m/z (%) = 166 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 125 (11)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 165 (24) [M] $^+$, 125 (100), 97 (33), 69 (54)

6.2.19 4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (29)



1.0 g (6.1 mmol) 2-Methyl-2-(2-cyanoethyl)-cyclopentan-1,3-dion (**28**) werden in 100 ml absoluten Ethylacetat gelöst und in einen Hochdruckbehälter überführt. Nach Zugabe von 100 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) wird das Reaktionsgemisch über Nacht bei 50 atm H₂-Druck hydriert. Es findet eine Druckabnahme um ca. 15 atm statt. Der Katalysator wird abfiltriert, mit Ethylacetat nachgewaschen und die Filtrate eingeeengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH = 5:1, DC: R_f = 0.3) gereinigt.

Ausbeute: 0.40 g (45 %)

gelbes Öl

Elementaranalyse: C₉H₁₅NO (153.23)

Ber.: C: 70.55 H: 9.87 N: 9.14

Gef.: C: 68.10 H: 10.30 N: 8.72

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 0.95 (s, 3 H, 8-H), 1.25 (m, 2 H, 3-H, 4-H), 1.45 (m, 1 H, 3-H), 1.59 (bs, 1 H, N-H), 1.66 (t, 1 H, J = 11 Hz, 7-H), 2.05 (d, 1 H, J = 12.8 Hz, 4-H), 2.14 (m, 1 H, 7-H), 2.30 (ddd, 1 H, J = 19.1 Hz, J = 9.6 Hz, J = 2.2 Hz, 6-H), 2.46 (dd, 1 H, J = 9.5 Hz, 6-H), 2.53 (dt, 1 H, J = 2.4 Hz, J = 11.3 Hz, 2-H), 2.90 (d, 1

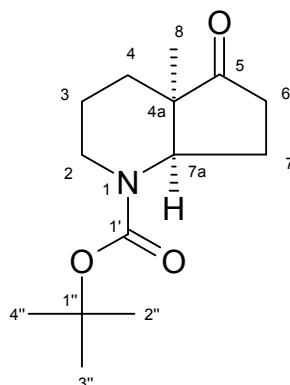
H, $J = 11.7$ Hz, 2-H), 3.08 (d, 1 H, $J = 4.2$ Hz, 7a-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 22.0 (CH_3 , C-8), 23.6 (CH_2 , C-3), 25.8 (CH_2 , C-7), 29.8 (CH_2 , C-4), 33.4 (CH_2 , C-6), 44.9 (CH_2 , C-2), 49.5 (quart. C, C-4a), 62.4 (CH , C-7a), 220.6 ($\text{C}=\text{O}$, C-5)

IR: ν (cm^{-1}) = 3429, 2933, 2853, 1731, 1645, 1539, 1455

MS (APCI): m/z (%) = 154 (100) [M^++1]

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 153 (48) [M^+], 110 (8), 97 (100), 82 (87), 68 (12), 53 (6)

6.2.20 *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (30)

0.500 g (3.26 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (**29**) werden mit 0.632 g (15.8 mmol) Natriumhydroxid in Eiswasser gelöst und im Eisbad gekühlt. Anschließend werden 1.50 g (7.00 mmol) Di-*tert*-butyl-dicarbonat, gelöst in 15 ml THF, über einen Tropftrichter unter starkem Rühren tropfenweise zugegeben. Nach 10 Minuten wird das Eisbad entfernt und die Lösung weitere 21 Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung wird die organische Phase abrotiert und die wässrige 3x mit Diethylether extrahiert. Die vereinten Etherphasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH = 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.810 g (98 %)

gelbes Öl

Elementaranalyse: C₁₄H₂₃NO₃ (253.34)

Ber.: C: 66.37 H: 9.15 N: 5.53

Gef.: C: 66.09 H: 8.98 N: 5.39

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1.09 (s, 3 H, 8-H), 1.27 (m, 1 H, 4-H), 1.63 – 1.37 (m, 12 H, 3-H, 4-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H), 2.07 – 1.92 (m, 2 H, 7-H), 2.27 – 2.14 (m, 1 H, 6-H), 2.57 – 2.46 (m, 1 H, 6-H), 2.84 – 2.74 (m, 1 H, 2-H), 4.01 (d, *J* = 12.7 Hz, 1 H, 2-H), 4.28

(pseudo-s, 1 H, 7a-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zeigen einige Signale (Rotamere) eine geringere Intensität als die übrigen*.

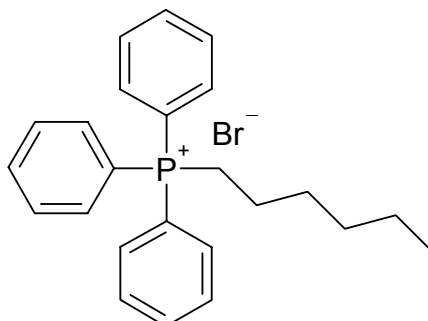
δ (ppm) = 18.3 (CH_3 , C-8), 20.0 (CH_2 , C-3), 20.6 (CH_2 , C-7), 27.0 (CH_2 , C-4), 28.4 (3 CH_3 , C-2'', C-3'', C-4''), 35.3 (CH_2 , C-6), 38.5* (CH_2 , C-2), 45.4 (quart. C, C-4a), 58.1* (CH , C-7a), 79.9 (quart. C, C-1''), 155.3 (C=O , C-1'), 219.2 (C=O , C-5)

IR: ν (cm^{-1}) = 3447, 2973, 2942, 2873, 1739, 1681, 1416, 1148

MS (APCI): m/z (%) = 254 (6) [M^++1], 198 (100), 154 (6)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 253 (8) [$\text{M}]^{++}$, 197 (25), 153 (29), 138 (22), 97 (35), 57 (100)

6.2.21 Hexyltriphenylphosphoniumbromid (31)



2.62 g (10.0 mmol) Triphenylphosphin werden mit 1.65 g (10.0 mmol) 1-Bromhexan in 15 ml Toluol versetzt und 24 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Der entstandene weiße Feststoff wird abfiltriert und mit heißem Toluol nachgewaschen.

Ausbeute: 2.35 g (55 %)

blassrosa Feststoff

Schmelzpunkt: 200 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 0.75 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₃), 1.17 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.57 (m, 4 H, 2 CH₂), 3.75 (m, 2 H, CH₂), 7.62 – 7.82 (m, 15 H, Aromat)

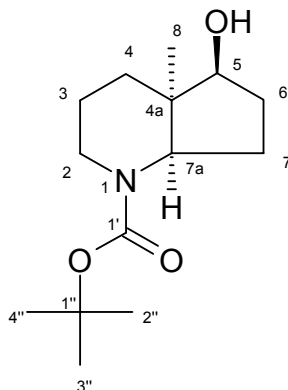
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 13.9 (CH₃), 22.2 (CH₂), 22.9 (CH₂), 29.9 (CH₂), 30.1 (CH₂), 31.3 (CH₂), 118.1, 118.8, 130.4, 133.7, 134.9 (alle arom. quart. C bzw. CH)

IR: ν (cm⁻¹) = 3050, 3007, 2930, 2856, 2789, 1586, 1482, 1433, 1112

MS (APCI): *m/z* (%) = 347 (32) [M⁺+1]-Br

MS (EI 70 eV): *m/z* (%) = 346 (14) [M]⁺-Br, 346 (16), 108 (50)

6.2.22 *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-5-hydroxy-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (35)



0.8 g (3.2 mmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (**30**) werden bei Raumtemperatur portionsweise unter Rühren zu einer Lösung von 50 mg (1.2 mmol) Natriumborhydrid in 5 ml Isopropylalkohol gegeben. Durch Stehen lassen über Nacht wird die Reaktion vervollständigt. Dann wird vorsichtig so viel verd. Salzsäure zugesetzt, bis sich kein Wasserstoff mehr entwickelt. Die erhaltene Lösung extrahiert man fünfmal mit Ether, trocknet den Extrakt mit Natriumsulfat und destilliert das Lösungsmittel ab. Abschließend wird das Produkt säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH = 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.68 g (84 %)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 101 °C

Elementaranalyse: C₁₄H₂₅NO₃ (255.36)

Ber.: C: 65.85 H: 9.87 N: 5.49

Gef.: C: 65.77 H: 9.73 N: 5.42

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1.07 (s, 3 H, 8-H), 1.43 – 1.32 (m, 3 H), 1.46 – 1.43 (s, 9 H, H-2'', H-3'', H-4''), 1.67 – 1.49 (m, 4 H), 1.83 – 1.67 (m,

2 H), 2.10 – 2.00 (m, 1 H), 2.89 – 2.65 (s, 1 H), 3.81 (t, 1 H), 3.98 (s, 1 H, OH)

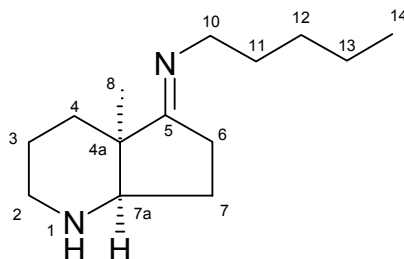
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 20.7 (CH₂, C-7), 21.5 (CH₂, C-6), 21.9 (CH₃, C-8), 24.5 (CH₂, C-3), 28.5 (3 CH₃, C-2'', C-3'', C-4''), 29.5 (CH₂, C-4), 38.7 (CH₂, C-2), 41.0 (quart. C, C-4a), 58.3 (CH, C-7a), 79.4 (quart. C, C-1''), 80.5 (CHOH, C-5), 155.6 (C=O, C-1')

IR: ν (cm⁻¹) = 3466, 2970, 2871, 1669, 1432, 1364, 1281, 1170, 1146, 1095, 962, 876

MS (APCI): m/z (%) = 256 (3) [M⁺+1], 200 (100), 182 (24), 156 (11)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 255 (3) [M]⁺, 199 (7), 156 (81), 112 (18), 96 (23), 57 (100)

6.2.23 5-(Pentylimino)-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (36)



Zu einer Lösung von 8.0 g (91 mmol) n-Pentylamin und 3.5 g (23 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (**29**), gelöst in 100 ml Methanol, wird eine Lösung von 1.4 g (23 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 1.0 g (7.3 mmol) Zinkchlorid in 50 ml Methanol gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre für die Dauer von 5 Tagen (120 Stunden) gerührt, wobei jeden Tag die Umsatzrate per DC kontrolliert wird. Nach erfolgter Umsetzung wird das Gemisch in 200 ml 0.1 N Natronlauge aufgenommen. Hiernach wird das Methanol abrotiert und der wässrige Rest mit 3 x mit je 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Extrakte werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH:EDMA 5:1:0.1, dann EtOAc: EDMA 1:1, dann MeOH, DC: EtOAc:EtOH:EDMA = 5:1:0.1 R_f = 0.1) gereinigt.

Ausbeute: 1.7 g (33 %)

gelbes Öl

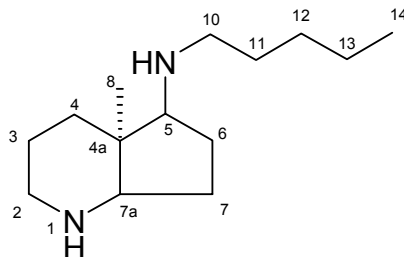
HR-MS: $C_{14}H_{26}N_2$

Ber.: 222.2096

Gef.: 222.2095

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H, 14-H), 0.89 (s, 3 H, 8-H), 1.48 – 1.17 (m, 8 H, 3-H, 4-H, 12-H, 13-H, N-H), 1.61 – 1.49 (m, 3 H, 7-H, 11-H), 2.00 – 1.92 (m, 1 H, 7-H), 2.10 (pseudo-d, $J = 13.1$ Hz, 1 H, 3-H), 2.24 (ddd, $J = 14.2$ Hz, $J = 9.6$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1 H, 6-H), 2.44 (dd, $J = 14.2$ Hz, 1 H, 6-H), 2.52 (dt, $J = 12.8$ Hz, $J = 3.4$ Hz, 1 H, 2-H), 2.90 – 2.83 (m, 2 H, 2-H, 7a-H), 3.21 (m, 2 H, 10-H)
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 14.1 (CH_3 , C-14), 22.6 (CH_2 , C-13), 23.3 (CH_2 , C-4), 25.2 (CH_3 , C-8), 25.6 (CH_2 , C-6), 27.4 (CH_2 , C-7), 29.8 (CH_2 , C-12), 30.4 (CH_2 , C-11), 31.4 (CH_2 , C-3), 45.2 (CH_2 , C-2), 46.4 (CH_2 , C-10), 63.4 (CH, C-7a), 179.8 (C=N, C-5)
- IR:** ν (cm^{-1}) = 3334, 2931, 2856, 2721, 1736, 1678, 1454, 1377, 1311, 1269, 1171, 1124, 1088, 1007, 852, 737
- MS (APCI):** m/z (%) = 223 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 166 (6), 121 (5)
- MS (EI 70 eV):** m/z (%) = 222 (13) [$\text{M}]^+$, 194 (21), 166 (66), 136 (27), 110 (41), 82 (31), 70 (21), 55 (35)

6.2.24 5-(N-Pentylamino)-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (37)



Zu einer Lösung von 8.0 g (91 mmol) Pentylamin und 3.5 g (23 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (**29**), gelöst in 100 ml Methanol, wird eine Lösung von 1.4 g (23 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 1.0 g (7.3 mmol) Zinkchlorid in 50 ml Methanol gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre für die Dauer von 5 Tagen (120 Stunden) gerührt, wobei jeden Tag die Umsatzrate per DC kontrolliert wird. Nach erfolgter Umsetzung wird das Gemisch in 200 ml 0.1 N Natronlauge aufgenommen. Hiernach wird das Methanol abrotiert und der wässrige Rest mit 3 x mit je 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Extrakte werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH:EDMA 5:1:0.1, dann EtOAc:EDMA = 1:1, dann MeOH, DC: EtOAc:EtOH:EDMA = 5:1:0.1 $R_f = 0.1$) gereinigt.

Ausbeute: 0.36 g (7 %)

gelbes Öl

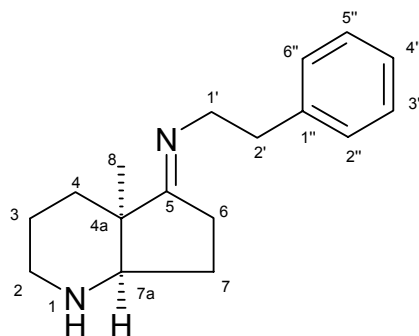
HR-MS: $C_{14}H_{28}N_2$

Ber.: 224.2253

Gef.: 224.2257

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 0.86 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, 14-H), 1.06 (s, 3 H, 8-H), 1.33 – 1.21 (m, 5 H, 3-H, 4-H, 11-H, 12-H), 1.48 – 1.34 (m, 8 H, 3-H, 6-H, 11-H, 12-H, 13-H, N-H), 1.67 – 1.57 (m, 1 H, 7-H), 1.92 – 1.85 (m, 1 H, 7-H), 2.00 – 1.93 (m, 1 H, 6-H), 2.51 – 2.45 (m, 1 H, 10-H), 2.62 – 2.54 (m, 2 H, 5-H, 10-H), 2.81 – 2.68 (m, 3 H, 2-H, 7a-H)
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 14.0 (CH_3 , C-14), 22.1 (CH_2 , C-13), 22.6 (CH_2 , C-4), 23.2 (CH_3 , C-8), 23.3 (CH_2 , C-7), 25.7 (CH_2 , C-3), 28.2 (CH_2 , C-6), 29.6 (CH_2 , C-12), 30.2 (CH_2 , C-11), 39.6 (quart. C, C-4a), 39.9 (CH_2 , C-2), 48.9 (CH_2 , C-10), 62.3 (CH, C-7a), 68.1 (CH, C-5)
- IR:** ν (cm^{-1}) = 3296, 2929, 2860, 2808, 1657, 1554, 1462, 1404, 1379, 1281, 1228, 1124, 968, 727
- MS (APCI):** m/z (%) = 225 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 121 (23)
- MS (EI 70 eV):** m/z (%) = 224 (5) [$\text{M}]^{+}$, 166 (26), 112 (24), 98 (100), 84 (23), 70 (41), 57 (37)

6.2.25 5-(2-Phenylethylimino)-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (38)



Zu einer Lösung von 11.0 g (91 mmol) 2-Phenylethylamin und 3.5 g (23 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (**29**), gelöst in 100 ml Methanol, wird eine Lösung von 1.4 g (23 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 1.0 g (7.3 mmol) Zinkchlorid in 50 ml Methanol gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre für die Dauer von 5 Tagen (120 Stunden) gerührt, wobei jeden Tag die Umsatzrate per DC kontrolliert wird. Nach erfolgter Umsetzung wird das Gemisch in 200 ml 0.1 N Natronlauge aufgenommen. Hiernach wird das Methanol abrotiert und der wässrige Rest mit 3 x mit je 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Extrakte werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH:EDMA = 5:1:0.1, dann EtOAc: EDMA = 1:1, dann MeOH, DC: EtOAc:EtOH:EDMA = 5:1:0.1 $R_f = 0.2$) gereinigt.

Ausbeute: 1.5 g (26 %)

gelbes Öl

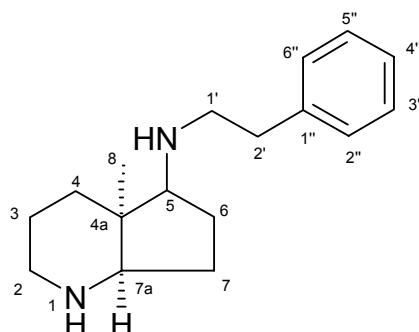
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 0.9 (s, 3 H, 8-H), 1.72 – 1.18 (m, 6 H, 3-H, 4-H, 6-H, 7-H), 1.96 – 1.86 (m 1 H, 6-H), 2.15 – 1.97 (m, 2 H, 2-H, 7-H), 2.57 – 2.48 (m, 1 H, 7a-H), 3.05 – 2.62 (m, 5 H, 2-H, 1'-H, 2'-H), 7.23 – 7.09 (m, 3 H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 7.39 – 7.25 (m, 2 H, 3''-H, 5''-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 23.2 (CH_2 , C-4), 25.2 (CH_3 , C-8), 25.6 (CH_2 C-7), 27.2 (CH_2 , C-3), 31.2 (CH_2 , C-6), 37.1 (CH_2 , C-2'), 45.1 (CH_2 , C-2), 46.5 (quart. C, C-4a), 55.2 (CH_2 , C-1'), 62.3 (CH, C-7a), 126.2 (aromat. CH, C-4''), 128.1 (2 aromat. CH, C-3'' & C-5''), 129.0 (2 aromat. C, C-2'' & C-6''), 140.6 (quart. aromat. C, C-1''), 181.0 (C=N, C-5)

MS (APCI): m/z (%) = 257 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 167 (36)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 256 (12) [M^+], 1367 (97), 136 (60), 105 (100), 79 (38), 56 (79)

6.2.26 5-(N-2-Phenylethylamino)-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (39)



Zu einer Lösung von 11.0 g (91 mmol) 2-Phenylethylamin und 3.5 g (23 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (**29**), gelöst in 100 ml Methanol, wird eine Lösung von 1.4 g (23 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 1.0 g (7.3 mmol) Zinkchlorid in 50 ml Methanol gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre für die Dauer von 5 Tagen (120 Stunden) gerührt, wobei jeden Tag die Umsatzrate per DC kontrolliert wird. Nach erfolgter Umsetzung wird das Gemisch in 200 ml 0.1 N Natronlauge aufgenommen. Hiernach wird das Methanol abrotiert und der wässrige Rest mit 3 x mit je 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Extrakte werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH:EDMA = 5:1:0.1, dann EtOAc:EDMA = 1:1, dann MeOH, DC: EtOAc:EtOH:EDMA = 5:1:0.1 R_f = 0.2) gereinigt.

Ausbeute: 0.24 g (4 %)

gelbes Öl

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 1.14 (s, CH_3 , 8-H), 1.75 – 1.22 (m, 6 H, 3-H, 4-H, 6-H, 7-H), 2.10 – 1.90 (m, 3 H, 2-H, 6-H, 7-H), 3.01 – 2.68 (m, 6 H, 2-H, 5-H, 1'-H, 2'-H), 3.08 (t, J = 8.6 Hz, 1 H, 7a-H), 7.25 – 7.14 (m, 3 H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 7.36 – 7.26 (m, 2 H, 3''-H, 5''-H)

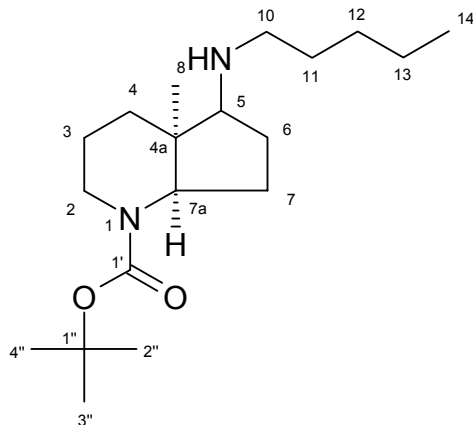
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 19.9 (CH_2 , C-4), 22.9 (CH_2 , C-7), 23.3 (CH_3 , C-8), 25.3 (CH_2 , C-3), 27.7 (CH_2 , C-6), 36.4 (CH_2 , C-2'), 43.4 (CH_2 , C-2), 49.9 (CH_2 , C-1'), 67.6 (CH , C-5), 128.5 (aromat. CH, C-4''), 128.7 (2 aromat. CH, C-3'', C-5''), 128.8 (2 aromat. CH, C-2'', C-6''), 139.8 (quart. aromat. C, C-1'')

IR: ν (cm^{-1}) = 3274, 3029, 2952, 1733, 1653, 1496, 1455, 1266, 738, 701

MS (APCI): m/z (%) = 259 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 167 (43)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 258 (2) [$\text{M}^{+ \cdot}$], 167 (42), 105 (50), 94 (100), 70 (31), 56 (43)

6.2.27 *N*-(*tert*.-Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-(*N*-pentylamino)-octahydro-[1]-pyrindin (40)



2.0 g (24 mmol) *n*-Pentylamin werden in 5 ml trockenem Methanol vorgelegt und mit einer methanolischen HCl-Lösung auf pH 6 eingestellt. Zur Lösung werden 0.55 g (2.2 mmol) *N*-(*tert*.-Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (**30**) und 0.14 g (24 mmol) Natriumcyanoborhydrid gegeben. Der Ansatz wird 72 Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wird die Lösung mit konz. HCl auf pH < 2 eingestellt und eingengt. Der Rückstand wird in 2 ml Wasser aufgenommen und 3 x mit je 5 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit festem Kaliumhydroxid auf pH > 10 eingestellt, mit Natriumchlorid gesättigt und 5 x mit je 3 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EtOAc:MeOH = 5:1, DC: R_f = 0.1) gereinigt)

Ausbeute: 0.66 g (9 %)

farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 297 °C

HR-MS: $C_{19}H_{36}N_2O_2$

Ber.: 324.2777

Gef.: 324.2760

¹H-NMR (CD₃OD): Im ¹H-NMR-Spektrum sind bei einigen Signalen zwei in den Signallagen geringfügig verschiedene Rotamere, deren Verhältnis nicht zu bestimmen war, zu erkennen.

δ (ppm) = 0.98 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, 14-H), 1.15 (2 s, 1 H, 8-H [A] & [B]), 1.47 – 1.31 (m, 4 H, 11-H, 13-H), 1.49 (s, 9-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H), 1.67 – 1.55 (m, 6 H, 3-H [A] & [B], 4-H, 6-H, 12-H), 1.84 – 1.73 (m, 1 H, 7-H [A] & [B]), 1.96 – 1.85 (m, 1 H, 7-H [A] & [B]), 2.20 – 2.08 (m, 1 H, 6-H), 2.68 – 2.60 (m, 1 H, 10-H), 2.78 – 2.69 (m, 1 H, 10-H), 2.97 – 2.79 (m, 2 H, 2-H [A] & [B], 5-H), 3.99 (d, J = 13.1 Hz, 1 H, 2-H [A] & [B]), 4.08 (m, 1 H, 7a-H [A] & [B])

¹³C-NMR (CD₃OD): Im ¹³C-NMR-Spektrum sind bei einigen Signalen zwei in den Signallagen geringfügig verschiedene Rotamere [A und B] mit unterschiedlicher Intensität zu erkennen.

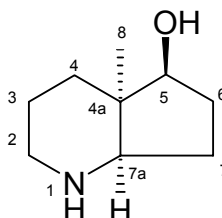
δ (ppm) = 14.6 (CH₃, C-14), 21.8 (CH₂, C-3 [A]), 22.1 (CH₂, C-3 [B]), 22.6 (CH₂, C-7 [A]), 22.8 (CH₃, C-8 [A]), 23.0 (CH₃, C-8 [B]), 23.1 (CH₂, C-7 [B]), 23.9 (CH₂, C-13), 26.2 (CH₂, C-4), 27.8 (CH₂, C-6), 29.0 (3 CH₃, C-2'', C-3'' & C-4''), 29.9 (CH₂, C-12), 30.9 (CH₂, C-11), 39.2 (CH₂, C-2 [A]), 40.3 (CH₂, C-2 [B]), 42.0 (quart. C, C-4a), 49.9 (CH₂, C-10), 60.5 (CH, C-7a [A]), 61.9 (CH, C-7a [B]), 68.5 (CH, C-5 [A]), 68.6 (CH, C-5 [B]), 81.3 (quart. C, C-1''), 157.5 (C=O, C-1' [A]), 157.6 (C=O, C-1' [B])

IR: ν (cm⁻¹) = 2956, 2933, 2862, 1685, 1454, 1423, 1365, 1281, 1174, 1147, 966, 893, 737

MS (APCI): m/z (%) = 325 (100) [M⁺+1], 269 (76), 225 (16), 142 (8)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 324 (5) [M]⁺⁺, 251 (7), 198 (8), 166 (7), 142 (45), 126 (12), 113 (13), 98 (100), 84 (17), 70 (32), 57 (43)

6.2.28 5-Hydroxy-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (41)



1.5 g (10 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (**29**) werden bei Zimmertemperatur portionsweise unter Rühren zu einer Lösung von 0.15 g (4.0 mmol) Natriumborhydrid in 12 ml Isopropylalkohol gegeben. Durch Stehen über die Dauer von 72 Stunden wird die Reaktion vervollständigt. Dann wird vorsichtig so viel verd. HCl zugesetzt, bis sich kein Wasserstoff mehr entwickelt. Die erhaltene Lösung extrahiert man 5 x mit je 10 ml Ether, trocknet den Extrakt mit Natriumsulfat und destilliert das Lösungsmittel ab. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH = 5:1, DC: $R_f = 0.19$) gereinigt.

Ausbeute: 1.5 g (97%)

gelbes Öl

HR-MS: $C_9H_{17}NO$

Ber.: 153.1154

Gef.: 153.1151

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 0.73 (s, 3 H, 8-H), 1.41 (m, 1 H, 4-H), 1.51 – 1.45 (m, 1 H, 3-H), 1.58 – 1.52 (m, 1 H, 7-H), 1.81 – 1.74 (m, 1 H, 4-H), 2.00 – 1.84 (m, 3 H, 3-H, 6-H, 7-H), 2.16 – 2.06 (m, 1 H, 6-H), 2.55 (m, 1 H, 2-H), 2.73 (pseudo-d, $J = 6.0$ Hz, 1 H, 7a-H), 2.96 – 2.90 (m, 1 H, 2-H), 3.67 (pseudo-d, $J = 6.0$ Hz, 1 H,

5-H)

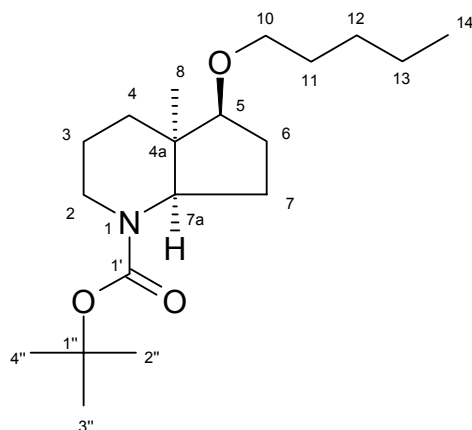
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 24.3 (CH₂, C-7), 25.3 (CH₃ C-8), 28.8 (CH₂, C-3), 30.9 (CH₂, C-4), 33.2 (CH₂, C-6), 44.2 (quart. C, C-4a), 45.2 (CH₂, C-2), 65.5 (CH, C-7a), 83.1 (CHOH, C-5)

IR: ν (cm⁻¹) = 3398, 3053, 2960, 2936, 1733, 1638, 1454, 1380, 1312, 1268, 1173, 1115, 1087, 1006, 735

MS (APCI): m/z (%) = 156 (100) [M⁺+1], 138 (35)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 155 (5) [M]⁺, 112 (13), 94 (100), 83 (5), 55(40)

**6.2.29 *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-pentyloxy-octahydro-[1]-pyrindin
(42)**



A. 0.65 g (2.6 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-5-hydroxy-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (**35**) werden in 5 ml trockenem THF gelöst und mit 90 mg (3.8 mmol) NaH versetzt und kurz bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden über eine Spritze 0.58 g (3.8 mmol, 0.48 ml) *n*-Pentylbromid zugetropft. Zusätzlich wird dem Gemisch eine Spatelspitze Kaliumiodid hinzugefügt. Anschließend wird 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt und dann weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Lösung auf 10 ml eingengt und vorsichtig auf kaltes Wasser gegossen. Anschließend wird 3 x mit je 10 ml EtOAc extrahiert, eingengt und säulenchromatographisch (Heptan:EtOAc = 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.20 g (24 %)

farbloses Öl

B. Die analoge Reaktion mit 0.76 g (3.8 mmol, 0.50 ml) *n*-Pentyljodid (ohne Zusatz von Kaliumiodid) erbrachte 27 % Ausbeute (0.22 g).

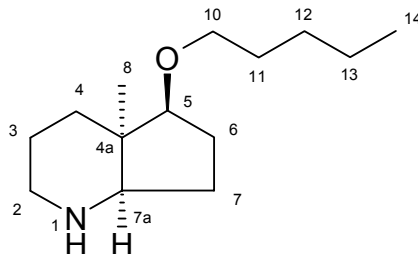
HR-MS: C₁₉H₃₅NO₃

Ber.: 325.2617

Gef.: 325.2617

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):** Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind bei einigen Signalen zwei in den Signallagen geringfügig verschiedene Rotamere (Verhältnis ca. 1:1) zu erkennen.
- δ (ppm) = 0.89 (t, $J = 0.89$ Hz, 3 H, 14-H), 1.08 (s, 3 H, 8-H), 1.86 – 1.20 (m, 22 H, 3-H, 4-H, 6-H, 7-H, 11-H, 12-H, 13-H, H-2'', H-3'', H-4''), 2.06 – 1.95 (m, 1 H, 6-H), 2.85 – 2.67 (m, 1 H, 2-H [A], 2-H [B]), 3.40 – 3.33 (m, 3 H, 5-H, 10-H), 3.94 – 3.83 (m, 1 H, 2-H [A], 7a-H [A]), 4.12 – 3.97 (m, 1 H, 2-H [B], 7a-H [B])
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):** Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum sind bei einigen Signalen zwei in den Signallagen geringfügig verschiedene Rotamere [A und B] mit unterschiedlicher Intensität zu erkennen.
- δ (ppm) = 14.1 (CH_3 , C-14), 20.5 (CH_2 , C-3 [A]), 20.8 (CH_2 , C-3 [B]), 21.3 (CH_2 , C-7 [A]), 21.8 (CH_2 , C-7 [B]), 22.5 (CH_2 , C-13), 22.6 (CH_3 , C-8), 25.0 (2 CH_2 , C-4 [A] & [B]), 26.5 (CH_2 , C-6 [A]), 26.6 (CH_2 , C-6 [B]), 28.4 (CH_2 , C-12), 28.5 (3 CH_3 , C-2'', C-3'' & C-4''), 29.8 (CH_2 , C-11), 38.1 (CH_2 , C-2 [A]), 39.2 (CH_2 , C-2 [B]), 40.9 (quart. C, C-4a), 57.5 (CH, C-7a [A]), 58.8 (CH, C-7a [B]), 70.2 (CH_2 , C-10), 79.2 (quart. C, C-1''), 87.3 (CH, C-5 [A]), 87.4 (CH, C-5 [B]), 155.5 (C=O, C-1' [A]), 155.8 (C=O, C-1' [B])
- IR:** ν (cm^{-1}) = 3445, 2956, 2935, 2869, 1693, 1457, 1422, 1364, 1281, 1231, 1174, 1146, 1120, 1056, 964, 893
- MS (APCI):** m/z (%) = 326 (9) [M^++1], 270 (100), 226 (20), 182 (10), 139 (6)
- MS (EI 70 eV):** m/z (%) = 325 (1) [M^{++}], 224 (39), 183 (26), 154 (78), 139 (49), 122 (22), 110 (26), 31 (97), 57 (100)

6.2.30 4a-Methyl-5-pentyloxy-octahydro-[1]-pyrindin (43)



Es werden 0.1 g (0.3 mmol) *N*-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-pentyloxy-octahydro-[1]-pyrindin (**42**) werden in wenig Dichlormethan gelöst und mit 1 ml Trifluoressigsäure 15 min gerührt. Anschließend wird der Ansatz mit gesättigter Natriumhydrogen-carbonatlösung vorsichtig neutralisiert und 3 x mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, getrocknet und einrotiert.

Ausbeute: 0.1 g (98 %)

gelbes Öl

HR-MS: C₁₄H₂₇NO

Ber.: 225.2093

Gef.: 225.2100

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 0.90 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, 14-H), 0.99 (s, 3 H, 8-H), 1.31 (m, 5 H, 4-H, 11-H, 12-H, 13-H), 1.69 – 1.42 (m, 4 H, 3-H, 11-H, 13-H), 2.14 – 1.76 (m, 6 H, 3-H, 4-H, 6-H, 7-H), 2.83 (m, 1 H, 2-H), 3.07 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1 H, 7a-H), 3.18 – 3.10 (m, 1 H, 2-H), 3.26 (dt, *J* = 9.2, *J* = 6.6 Hz, 1 H, 10-H), 3.54 – 3.45 (m, 1 H, 10-H), 6.40 (s, 1 H, N-H)

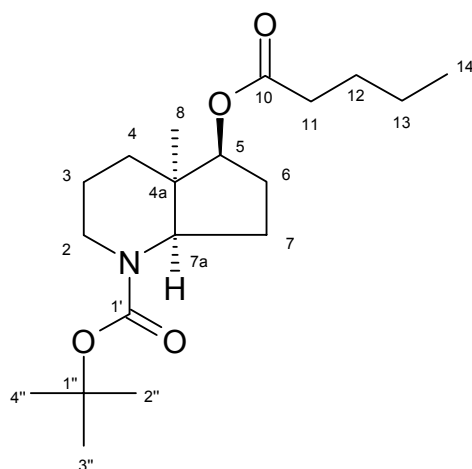
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 14.0 (CH_3 , C-14), 21.2 (CH_2 , C-3), 22.5 (CH_2 , C-13), 24.6 (CH_3 , C-8), 25.3 (CH_2 , C-7), 27.1 (CH_2 , C-6), 28.2 (CH_2 , C-4), 28.4 (CH_2 , C-12), 29.5 (CH_2 , C-11), 42.1 (CH_2 , C-2), 42.7 (quart. CH, C-4a), 62.4 (CH, C-7a), 70.0 (CH_2 , C-10), 89.2 (CH, C-5)

IR: ν (cm^{-1}) = 3421, 2957, 2934, 2871, 1679, 1462, 1381, 1358, 1268, 1201, 1132, 976, 832, 799, 738, 721

MS (APCI): m/z (%) = 226 (100) [M^++1], 138 (12)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 225 (2) [M^+], 154 (100), 139 (50), 110 (47), 96 (87), 82 (42), 69 (51), 56 (77)

6.2.31 *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-pentanoyloxy-octahydro-[1]-pyrindin (44)



0.65 g (2.6 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-5-hydroxy-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (**35**) werden in 5 ml trockenem THF gelöst und mit 90 mg (3.8 mmol) NaH versetzt und kurz bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden über eine Spritze 0.46 g (3.8 mmol, 0.48 ml) Valeriansäurechlorid hinzugegeben. Anschließend wird 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt und dann weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Lösung eingedampft und vorsichtig auf kaltes Wasser gegossen. Anschließend wird 3 x mit je 10 ml EtOAc extrahiert, eingedampft und säulenchromatographisch (Heptan:EtOAc = 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.36 g (41 %)

gelbes Öl

HR-MS: $C_{19}H_{33}N_1O_4$

Ber.: 339.2410

Gef.: 339.2417

1H -NMR ($CDCl_3$): Im 1H -NMR-Spektrum sind bei einigen Signalen zwei in den Signallagen geringfügig verschiedene Rotamere (Verhältnis ca. 3:2) zu erkennen.

δ (ppm) = 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 3 H, 14-H), 0.99 (s, 3 H, 8-H),

1.61 – 1.23 (m, 18 H, 3-H [A], 3-H [B], 4-H [A], 4-H [B], 6-H [A], 6-H [B], 12-H, 13-H, 2''-H', 3''-H, 4''-H), 1.88 – 1.62 (m, 2 H, 7-H [A], 7-H [B]), 2.20 – 2.06 (m, 1 H, 6-H [A], 6-H [B]), 2.25 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, 11-H), 2.82 – 2.63 (m, 1 H, 2-H [A], 2-H [B]), 4.20 – 3.79 (m, 2 H, 2-H [A], 2-H [B], 7a-H [A], 7a-H [B]), 4.73 (t, $J = 8.8$ Hz, 1 H, 5-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum sind bei einigen Signalen zwei in den Signallagen geringfügig verschiedene Rotamere [A und B] mit unterschiedlicher Intensität zu erkennen.

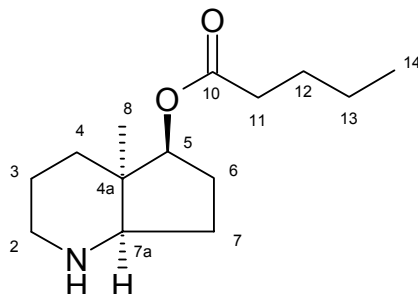
δ (ppm) = 13.6 (CH_3 , C-14), 20.2 (CH_2 , C-3 [A]), 20.6 (CH_2 , C-3 [B]), 21.4 (CH_2 , C-7 [B]), 21.7 (CH_2 , C-7 [A], CH_3 , C-8), 22.1 (CH_2 , C-13), 22.3 (CH_2 , C-4 [A]), 22.4 (CH_2 , C-4 [B]), 26.0 (CH_2 , C-6 [A]), 26.2 (CH_2 , C-6 [B]), 27.1 (CH_2 , C-12), 28.3 (3 CH_3 , C-3', C-3'', C-3'''), 34.1 (CH_2 , C-11), 37.8 (CH_2 , C-2 [A]), 38.9 (CH_2 , C-2 [B]), 40.3 (quart. C, C-4a), 57.0 (CH, C-7a [B]), 58.2 (CH, C-7a [A]), 79.4 (quart. C, C-2'), 80.9 (CH, C-5 [A]), 81.2 (CH, C-5 [B]), 155.2 (C=O, C-1' [B]), 155.5 (C=O, C-1' [A]), 173.6 (C=O, C-10)

IR: ν (cm^{-1}) = 2961, 2871, 1736, 1693, 1456, 1422, 1365, 1283, 1235, 1176, 1146, 1110, 965, 895, 736

MS (APCI): m/z (%) = 340 (2) [M^++1], 284 (100), 240 (15), 182 (68), 138 (13)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 339 (1) [M^+], 282 (3), 239 (5), 182 (11), 166 (13), 154 (41), 138 (18), 96 (12), 57 (100)

6.2.32 4a-Methyl-5-pentanoyloxy-octahydro-[1]-pyrindin (45)



Es werden 0.2 g (0.6 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4a-methyl-5-pentanoyloxy-octahydro-[1]-pyrindin (**44**) in wenig Dichlormethan gelöst und mit 2 ml Trifluoressigsäure 15 Minuten gerührt. Anschließend wird der Ansatz mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung vorsichtig neutralisiert und 3 x mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, getrocknet und einrotiert.

Ausbeute: 0.14 g (97 %)

gelbes Öl

HR-MS: $C_{14}H_{25}NO_2$

Ber.: 239.1885

Gef.: 239.1896

H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 0.88 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, 14-H), 1.07 (s, 3 H, 8-H), 1.31 (m, 2 H, 13-H), 1.49 – 1.40 (m, 1 H, 3-H), 1.56 (m, 2 H, 12-H), 1.80 – 1.65 (m, 4 H, 3-H, 4-H, 6-H), 1.99 (dd, $J = 11.6$ Hz, $J = 7.9$ Hz, 2 H, 7-H), 2.37 – 2.18 (m, 3 H, 6-H, 11-H), 2.92 – 2.86 (m, 1 H, 2-H), 3.08 – 3.02 (m, 1 H, 2-H), 3.12 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H, 7a-H), 4.79 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 6.0$ Hz, 1 H, 5-H), 7.16 (s, 1 H, N-H)

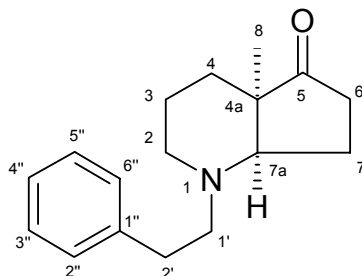
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 13.6 (CH_3 , C-14), 19.8 (CH_2 , C-3), 22.1 (CH_2 , C-13), 23.8 (CH_3 , C-8), 24.0 (CH_2 , C-7), 26.6 (CH_2 , C-4), 27.0 (C-12), 27.7 (CH_2 , C-6), 34.0 (CH_2 , C-11), 40.3 (CH_2 , C-2), 41.4 (quart. C, C-4a), 60.5 (CH, C-7a), 81.5 (CH, C-5), 173.4 (C=O, C-10)

IR: ν (cm^{-1}) = 3435, 3055, 2962, 2873, 1732, 1678, 1464, 1423, 1383, 1265, 1178, 1136, 833, 800, 739

MS (APCI): m/z (%) = 240 (100) [M^++1], 154 (7), 138 (82)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 239 (13) [$\text{M}]^+$, 154 (100), 138 (55), 122 (32), 96 (54), 57 (31)

6.2.33 4a-Methyl-5-oxo-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (46)



1.2 g (7.8 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (**29**) werden mit 1.5 g (11 mmol) Kaliumcarbonat in 30 ml Dichlormethan und 7.5 g (38 mmol) 2-Phenylethylbromid versetzt und 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach 48 Stunden werden nochmals 1.5 g (11 mmol) Kaliumcarbonat zugegeben. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand mit Wasser versetzt und mit 8 N H₂SO₄ auf einen pH-Wert von ca. 1 eingestellt. Die Mischung wird durch Ausschütteln mit wenig Diethylether vom Überschuss 2-Phenylethylbromid befreit. Nach Alkalisieren mit ges. NaOH-Lösung wird die freie Base durch Ausschütteln mit 3 x je 30 ml Ethylacetat abgetrennt, mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.46 g (23%)

rotes Öl

HR-MS: C₁₇H₂₃NO

Ber.: 257.1780

Gef.: 257.1788

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 0.99 (s, 3 H, 8-H), 1.22 – 1.12 (m, 1 H, 4-H), 1.42 – 1.31 (m, 1 H, 3-H), 1.59 (m, 1 H, 3-H), 1.94 – 1.76 (m, 3 H, 4-

H, 7-H), 2.26 – 2.04 (m, 3 H, 6-H, 9-H), 2.60 – 2.50 (m, 1 H, 2-H), 2.89 – 2.64 (m, 5 H, 2-H, 7a-H, 9-H, 10-H), 7.33 – 7.15 (m, 5 H, 2''-H, 6''-H, 3''-H, 5''-H, 4''-H)

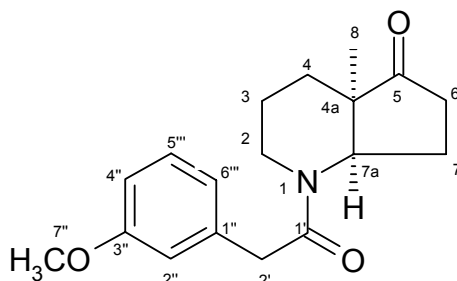
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 20.5 (CH₂, C-3), 22.2 (CH₃ C-8), 22.5 (CH₂, C-7), 29.6 (CH₂, C-4), 33.7 (CH₂, C-6), 33.8 (CH₂, C-2'), 49.5 (quart. C, C-4a), 50.3 (CH₂, C-1'), 56.8 (CH₂, C-2), 67.4 (CH, C-7a), 125.9 (aromat. CH, C-4''), 128.2 (2 aromat. CH, C-2'' & C-6''), 128.9 (2 aromat. CH, C-3'' & C-5''), 140.8 (quart. aromat. C, C-1''), 220.8 (C=O, C-5)

IR: ν (cm⁻¹) = 3456, 3060, 3026, 2932, 2855, 2808, 1738, 1603, 1496, 1453, 1372, 1319, 1256, 1168, 1117, 994, 749, 700

MS (APCI): m/z (%) = 258 (100) [M⁺+1], 225 (12), 166 (24), 105 (33)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 257 (23) [M]⁺, 166 (100), 138 (45), 110 (61), 105 (42), 55 (23)

**6.2.34 1-[2-(3-Methoxyphenyl)-acetyl]-4a-methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin
(47)**



1.0 g (5.4 mmol) 3-Methoxyphenylessigsäurechlorid wird unter starkem Rühren bei 0 °C langsam zu einer Lösung von 0.66 g (4.3 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (**29**) und 0.5 ml 12% Natriumhydroxidlösung getropft. Anschließend rührt man die Lösung bei Raumtemperatur über Nacht weiter. Zur Aufarbeitung wird die Toluolphase abgetrennt und mit 5 % Natriumhydroxidlösung, 2 N HCl und Wasser gewaschen. Dann wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (EtOAc, DC: $R_f = 0.5$) gereinigt.

Ausbeute: 0.60 g (46%)

rotes Öl

HR-MS: $C_{18}H_{23}NO_3$

Ber.: 301.1678

Gef.: 301.1686

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 0.82 (s, 3 H, 8-H), 1.62 – 1.19 (m, 5 H, 3-H, 4-H, 7-H), 2.14 – 2.01 (m, 1 H, 7'-H), 2.28 – 2.18 (m, 1 H, 6-H), 2.53 – 2.44 (m, 1 H, 6-H), 2.62 (dt, $J = 14.1$ Hz, $J = 2.8$ Hz, 1 H, 2-H), 2.95 (pseudo-t, $J = 13.0$ Hz, 1 H, 2'-H), 3.73 – 3.66 (m, 1 H,

2'-H), 3.97 (t, $J = 9.1$ Hz, 1 H, 7a-H), 4.61 (d, $J = 13.9$ Hz, 1 H, 2-H), 4.87 (dd, $J = 9.5$ Hz, $J = 7.3$ Hz, 1 H, 5-H), 6.80 – 6.72 (m, 3 H, 2''-H, 5''-H, 6''-H), 7.23 – 7.15 (m, 1 H, 4''-H)

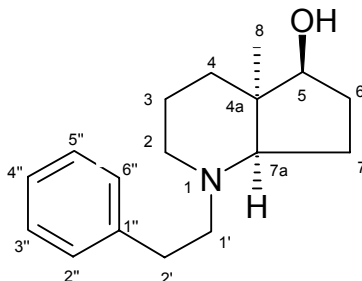
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 17.7 (CH_3 , C-8), 19.8 (CH_2 , C-3), 21.3 (CH_2 , C-7), 27.0 (CH_2 , C-4), 36.3 (CH_2 , C-6), 41.6 (CH_2 , C-2'), 41.9 (CH_2 , C-2), 45.9 (quart. C, C-4a), 55.7 (CH_3 , C-7''), 60.6 (CH, C-7a), 112.3 (aromat. CH, C-5''), 114.0 (aromat. CH, C-6''), 120.7 (aromat. CH, C-2''), 129.7 (aromat. CH, C-4''), 136.6 (quart. aromat. C, C-1''), 159.9 (quart. aromat. C, C-3''), 170.2 (C=O, C-1'), 217.5 (C=O, C-5)

IR: ν (cm^{-1}) = 3458, 3053, 2943, 2866, 2837, 1738, 1637, 1585, 1491, 1439, 1371, 1257, 1149, 1047, 874, 777, 735, 698

MS (APCI): m/z (%) = 302 (100) [$\text{M}^+ + 1$]

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 301 (90) [M^+], 180 (54), 137 (100), 121 (35), 94 (53), 82 (29), 55 (24)

6.2.35 5-Hydroxy-4a-methyl-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (48)



0.5 g (1.9 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (**46**) werden bei Raumtemperatur portionsweise unter Rühren zu einer Lösung von 50 mg (1.2 mmol) Natriumborhydrid in 5 ml Isopropylalkohol gegeben. Durch Stehen lassen über Nacht wird die Reaktion vervollständigt. Dann wird vorsichtig verd. HCl zugesetzt, bis sich kein Wasserstoff mehr entwickelt. Die erhaltene Lösung extrahiert man 5 x mit je 5 ml Ether, trocknet den Extrakt mit Natriumsulfat und destilliert das Lösungsmittel ab. Abschließend wird das Produkt säulenchromatographisch (EtOAc: EDMA = 1:1, DC: EtOAc R_f = 0.4) gereinigt.

Ausbeute: 0.17 g (33 %)

gelbe Kristalle

Schmelzpunkt: 78 °C

HR-MS: $C_{17}H_{25}NO$

Ber.: 259.1936

Gef.: 259.1915

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 0.91 (s, 3 H, 8-H), 1.33 (m, 1 H, 4-H), 1.66 – 1.46 (m, 3 H, 3-H, 6-H, 7-H), 1.70 (m, 1 H, 4-H), 1.93 – 1.76 (m, 2-H, 3-H, 7-H), 2.08 – 1.96 (m, 1 H, 6-H), 2.30 (m, 1 H, 2-H),

2.47 – 2.39 (m, 1 H, 1'-H), 2.53 (dd, $J = 6.7$ Hz, $J = 4.8$, 1 H, 7a-H), 2.81 – 2.64 (m, 4 H, 2-H, 1'-H, 2'-H), 3.65 (dd, $J = 6.8$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 1 H, 5-H), 7.21 – 7.15 (m, 3 H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 7.31 – 7.24 (m, 2 H, 2''-H, 6''-H)

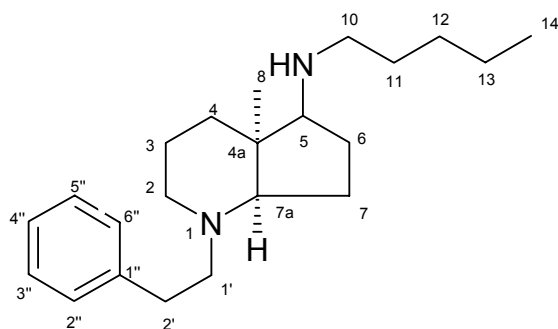
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 20.8 (CH_2 , C-7), 23.0 (CH_2 , C-3), 24.9 (CH_3 , C-8), 28.7 (CH_2 , C-4), 31.1 (CH_2 , C-6), 33.9 (CH_2 , C-2'), 43.8 (quart. C, C-4a), 50.1 (CH_2 , C-2), 56.8 (CH_2 , C-1'), 68.2 (CH, C-7a), 82.1 (CH, C-5), 125.9 (aromat. CH, C-4''), 128.3 (2 aromat. CH, C-2'' & C-6''), 128.7 (2 aromat. CH, C-3'' & C-5''), 140.7 (aromat. CH, C-1'')

IR: ν (cm^{-1}) = 3176, 2941, 2865, 2816, 1602, 1453, 1323, 1213, 1094, 1035, 959, 907, 804, 754, 737, 705

MS (APCI): m/z (%) = 260 (54) [$\text{M}^+ + 1$], 242 (13), 168 (100)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 259 (1) [$\text{M}]^+$, 168 (100), 105 (9), 55 (8)

**6.2.36 4a-Methyl-5-N-pentylamino-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin
(49)**



0.42 g (4.8 mmol) n-Pentylamin werden in 5 ml trockenem Methanol vorgelegt und mit einer methanolischen HCl-Lösung auf pH 6 eingestellt. Zur Lösung werden 0.20 g (0.80 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (**46**) und 35 mg (7.0 mmol) Natriumcyanoborhydrid gegeben. Der Ansatz wird 72 Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wird die Lösung mit konz. HCl auf pH < 2 eingestellt und eingengt. Der Rückstand wird in 2 ml Wasser aufgenommen und 3 x mit je 5 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit festem Kaliumhydroxid auf pH > 10 eingestellt, mit Natriumchlorid gesättigt und 5 x mit je 3 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH = 2:1, DC: $R_f = 0.3$) gereinigt)

Ausbeute: 0.11 g (42 %)

farbloses Öl

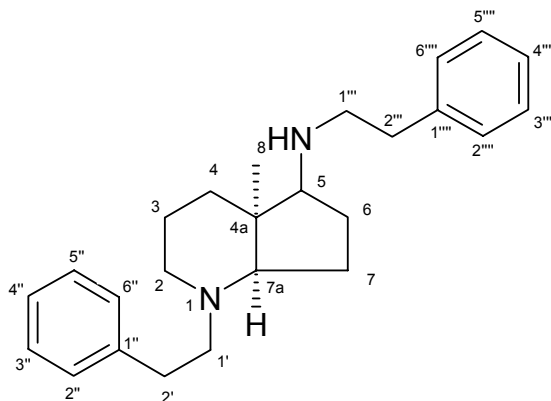
HR-MS: $C_{22}H_{36}N_2$

Ber.: 328.2879

Gef.: 328.2890

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 0.83 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, 14-H), 1.14 (s, 3 H, 8-H), 1.72 – 1.17 (m, 13 H, 3-H, 4-H, 6-H, 7-H, 11-H, 12-H, 13-H, N-H), 1.88 – 1.77 (m, 1 H, 6-H), 2.01 – 1.90 (m, 1 H, 7-H), 2.32 (dt, $J = 10.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1 H, 2-H), 2.60 – 2.50 (m, 4 H, 2-H, 10-H, 1'-H), 2.75 – 2.61 (m, 4 H, 5-H, 10-H, 2'-H), 2.78 (t, $J = 9.3$ Hz, 1 H, 7a-H), 7.14 – 7.06 (m, 3 H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 7.21 – 7.16 (m, 2 H, 3''-H, 5''-H)
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):** Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum werden die Signale von C-7 und C-11 erst bei längerer Wartezeit zwischen den einzelnen Messimpulsen sichtbar.
- δ (ppm) = 14.0 (CH_3 , C-14), 16.0 (CH_2 , C-6), 21.6 (CH_2 , C-3), 22.5 (CH_2 , C-13), 23.4 (CH_3 , C-8), 25.4 (CH_2 , C-4), 26.7 (CH_2 , C-7), 28.6 (CH_2 , C-12), 29.5 (CH_2 , C-11), 34.2 (CH_2 , C-2'), 41.6 (quart. C, C-4a), 46.4 (CH_2 , C-2), 48.5 (CH_2 , C-10), 57.4 (CH_2 , C-1'), 66.5 (CH, C-7a), 67.5 (CH, C-5), 125.9 (aromat. CH, C-4''), 128.2 (2 aromat. CH, C-3'', C-3'''), 128.7 (2 aromat. C, C-2'', C-2'''), 140.9 (quart. aromat. C, C-1'')
- IR:** ν (cm^{-1}) = 3028, 2933, 2970, 2808, 1603, 1587, 1495, 1454, 1373, 1265, 1119, 739, 700
- MS (APCI):** m/z (%) = 329 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 237 (55)
- MS (EI 70 eV):** m/z (%) = 328 (1) [$\text{M}]^{+}$, 237 (100), 152 (17), 105 (11), 70 (23), 56 (9)

6.2.37 4a-Methyl-1-(2-phenylethyl)-5-(N-2-phenylethylamino)-octahydro-[1]-pyrindin (50)



0.58 g (4.8 mmol) 2-Phenylethylamin werden in 5 ml trockenem Methanol vorgelegt und mit einer methanolischen HCl-Lösung auf pH 6 eingestellt. Zur Lösung werden 0.20 g (0.8 mmol) 4a-Methyl-5-oxo-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (**46**) und 35 mg (7.0 mmol) Natriumcyanoborhydrid gegeben. Der Ansatz wird 72 Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wird die Lösung mit konz. HCl auf pH < 2 eingestellt und eingengt. Der Rückstand wird in 2 ml Wasser aufgenommen und 3 x mit je 5 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit festem Kaliumhydroxid auf pH > 10 eingestellt, mit Natriumchlorid gesättigt und 5 x mit je 3 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH = 2:1, DC: R_f = 0.3) gereinigt)

Ausbeute: 98 mg (34 %)

farbloses Öl

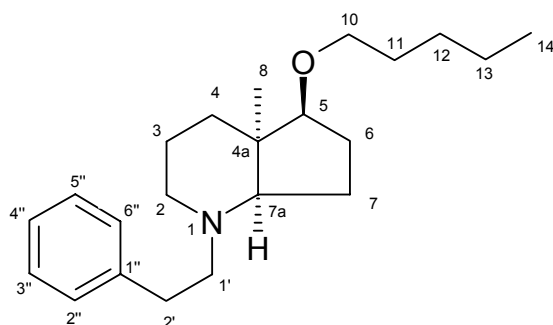
HR-MS: $C_{25}H_{34}N_2$

Ber.: 362.2722

Gef.: 362.2695

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 1.05 (s, 3 H, 8-H), 1.24 – 1.08 (m, 2 H, 4-H), 1.47 – 1.27 (m, 3 H, 3-H, 6-H, 7-H), 1.68 – 1.55 (m, 1 H, 3-H), 1.85 – 1.72 (m, 1 H, 6-H), 2.00 – 1.89 (m, 1 H, 7-H), 2.30 (dt, $J = 12.0$ Hz, $J = 2.8$ Hz, 1 H, 2-H), 2.92 – 2.46 (m, 12 H, 2-H, 5-H, 7a-H, 1'-H, 2'-H, 1'''-H, 2'''-H, N-H), 7.16 – 7.08 (m, 6 H, 2''-H, 4''-H, 6''-H, 2'''-H, 4'''-H, 6'''-H), 7.25 – 7.17 (m, 4 H, 3''-H, 5''-H, 3'''-H, 5'''-H)
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 15.7 (CH_2 , C-6), 21.6 (CH_2 , C-3), 23.5 (CH_3 , C-8), 25.3 (CH_2 , C-4), 27.6 (CH_2 , C-7), 34.1 (CH_2 , C-2'), 36.5 (CH_2 , C-2'''), 41.5 (quart. C, C-4a), 46.6 (CH_2 , C-2), 50.1 (CH_2 , C-1'''), 57.5 (CH_2 , C-1'), 66.3 (CH, C-7a), 67.5 (CH, C-5), 125.8 (aromat. CH, C-4'''), 126.1 (aromat. CH, C-4''), 128.2 (2 aromat. CH, C-3'' & C-5''), 128.4 (2 aromat. CH, C-3''' & C-5'''), 128.6 (2 aromat. CH, C-2''' & C-6'''), 128.7 (2 aromat. C, C-2'' & C-6''), 140.1 (quart. aromat. C, C-1'''), 140.8 (quart. aromat. C, C-1'')
- IR:** ν (cm^{-1}) = 3028, 2939, 2867, 2810, 1603, 1495, 1454, 1371, 1265, 1120, 1030, 964, 739, 700
- MS (APCI):** m/z (%) = 363 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 271 (73)
- MS (EI 70 eV):** m/z (%) = 362 (2) [$\text{M}]^+$, 271 (100), 152 (15), 105 (26), 91 (15), 70 (23)

6.2.38 4a-Methyl-5-pentyloxy-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyridin (51)



0.67 g (2.6 mmol) 5-Hydroxy-4a-methyl-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyridin (**48**) werden in 5 ml trockenem THF gelöst und mit 90 mg (3.8 mmol) NaH versetzt und kurz bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden über eine Spritze 0.58 g (3.8 mmol, 0.48 ml) n-Pentyliodid hinzugetropft. Anschließend wird 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt und dann weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Lösung auf 10 ml eingeeengt und vorsichtig auf kaltes Wasser gegossen. Anschließend wird 3 x mit EtOAc extrahiert, eingeeengt und säulen-chromatographisch (Heptan:EtOAc = 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.67 g (77 %)

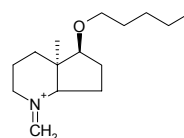
farbloses Öl

HR-MS: $C_{22}H_{35}NO$

gemessen vom Hauptfragment $C_{15}H_{26}NO$

Ber.: 238.2171

Gef.: 238.2168



1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 0.90 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, 14-H), 1.17 (s, 3 H, 8-H), 1.42 – 1.25 (m, 7 H, 4-H, 7-H, 12-H, 13-H), 1.60 – 1.44 (m, 4 H, 3-H, 6-H, 11-H), 1.73 – 1.62 (m, 1 H, 3-H), 2.03 – 1.84 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 2.38 (dt, J = 10.5 Hz, J = 3.0 Hz, 1 H, 2-H), 2.65 – 2.53 (m, 4 H, 2-H, 1'-H, 2'-H), 2.86 – 2.69 (m, 2 H, 2-H, 7a-

H), 3.40 – 3.34 (m, 2 H, 5-H, 10-H), 3.50 – 3.43 (m, 1 H, 10-H), 7.23 – 7.15 (m, 3 H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 7.30 – 7.24 (m, 2 H, 3''-H, 5''-H)

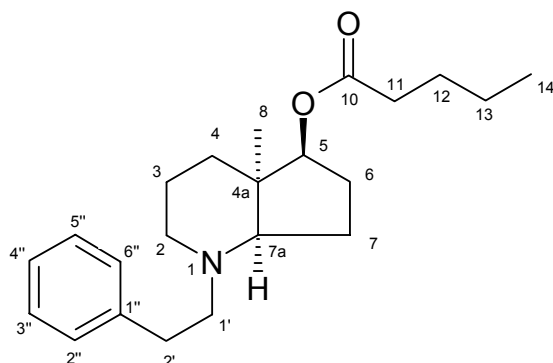
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 14.1 (CH₃, C-14), 15.3 (CH₂, C-7), 21.6 (CH₂, C-3), 22.5 (CH₂, C-13), 23.5 (CH₃, C-8), 25.1 (CH₂, C-4), 26.4 (CH₂, C-6), 28.4 (CH₂, C-12), 29.8 (CH₂, C-11), 34.3 (CH₂, C-2'), 41.6 (quart. C, C-4a), 46.7 (CH₂, C-2), 57.4 (CH₂, C-1'), 64.7 (CH, C-7a), 70.2 (CH₂, C-10), 87.9 (CH, C-5), 125.8 (aromat. CH, C-4''), 128.2 (2 aromat. CH, C-3'', C-5''), 128.7 (2 aromat. CH, C-2'', C-6''), 141.0 (quart. aromat. C, C-1'')

IR: ν (cm⁻¹) = 2952, 2870, 2806, 1603, 1496, 1454, 1354, 1221, 1113, 962, 746, 698

MS (APCI): m/z (%) = 330 (93) [M⁺+1], 238 (100)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 329 (1) [M]⁺, 238 (100), 152 (25), 105 (12), 55 (12)

6.2.39 4a-Methyl-5-pentanoyloxy-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (52)



0.67 g (2.6 mmol) 5-Hydroxy-4a-methyl-1-(2-phenylethyl)-octahydro-[1]-pyrindin (**48**) werden in 5 ml trockenem THF gelöst und mit 90 mg (3.8 mmol) NaH versetzt und kurz bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden über eine Spritze 0.46 g (3.8 mmol, 0.48 ml) Valeriansäurechlorid hinzugetropft. Anschließend wird 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt und dann weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Lösung eingeeengt und vorsichtig auf kaltes Wasser gegossen. Anschließend wird 3 x mit EtOAc extrahiert, eingeeengt und säulenchromatographisch (Heptan:EtOAc 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.57 g (64 %)

farbloses Öl

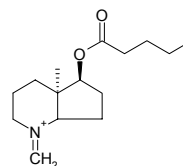
HR-MS:

$C_{22}H_{33}NO_2$

gemessen vom Hauptfragment $C_{15}H_{28}NO$

Ber.: 253.2042

Gef.: 253.1997

 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):

δ (ppm) = 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H, 14-H), 1.10 (s, 3 H, 8-H), 1.63 – 1.30 (m, 9 H, 3-H, 4-H, 6-H, 7-H, 12-H, 13-H), 1.74 – 1.64 (m, 1 H, 3-H), 1.98 – 1.88 (m, 1 H, 7-H), 2.20 – 2.10 (m, 1 H, 6-H), 2.32 – 2.25 (m, 2 H, 2'-H), 2.39 (dt, $J = 10.5$ Hz, 3.0

Hz, 2 H, 2-H), 2.60 (t, $J = 7.7$ Hz, 2 H, 1'-H), 2.66 (pseudo-d, $J = 11.5$ Hz, 1 H, 2-H), 2.81 – 2.69 (m, 2 H, 11-H), 2.90 (t, $J = 9.4$ Hz, 1 H, 7a-H), 4.72 (t, $J = 8.5$ Hz, 1 H, 5-H), 7.21 – 7.14 (m, 3 H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 7.28 – 7.22 (m, 2 H, 2''-H, 6''-H)

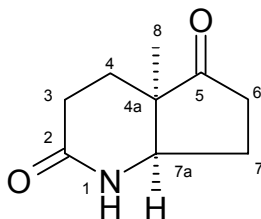
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 13.7 (CH_3 , C-14), 16.0 (CH_2 , C-7), 21.3 (CH_2 , C-3), 22.2 (CH_2 , C-13), 22.7 (CH_3 , C-8), 25.5 (CH_2 , C-4), 26.0 (CH_2 , C-6), 27.2 (CH_2 , C-12), 34.0 (CH_2 , C-11), 34.3 (CH_2 , C-2'), 41.3 (quart. C, C-4a), 46.4 (CH_2 , C-2), 57.3 (CH_2 , C-1'), 64.4 (CH, C-7a), 81.7 (CH, C-5), 125.9 (aromat. CH, C-4''), 128.2 (2 aromat. CH, C-2'', C-6''), 128.7 (2 aromat. CH, C-3'', C-5''), 140.6 (quart. aromat. C, C-1''), 173.8 (CH_2 , C-10)

IR: ν (cm^{-1}) = 3060, 3028, 2956, 2871, 2810, 1734, 1603, 1454, 1375, 1263, 1180, 1095, 1053, 964, 910, 739, 700

MS (APCI): m/z (%) = 344 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 242 (84)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 343 (1) [$\text{M}]^{+}$, 252 (100), 168 (12), 150 (17), 137 (6), 110 (9), 105 (13)

6.2.40 2,5-Dioxo-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (53)



Eine Lösung bestehend aus 274 mg (1.66 mmol) 2,5-Dioxo-4a-methyl-2,3,4,4a,5,7a-hexahydro-1*H*-[1]-pyrindin (**55**) und 30.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) in 20 ml Ethanol wird über Nacht im Autoklaven unter Wasserstoffatmosphäre (50 bar) hydriert. Anschließend wird der Katalysator abfiltriert, die Lösung eingeeengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH = 5:1, DC: $R_f = 0.5$) gereinigt.

Ausbeute: 150 mg (54 %)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 131 °C

Elementaranalyse: C₉H₁₃NO₂ (167.21)

Ber.: C: 64.65 H: 7.84 N: 8.38

Gef.: C: 64.58 H: 7.96 N: 8.39

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1.01 (s, 3 H, 8-H), 1.56 (ddd, $J = 13.7$ Hz, $J = 8.6$ Hz, $J = 6.0$ Hz, 1 H, 4-H), 1.89 – 1.80 (m, 1 H, 4-H), 1.99 – 1.92 (m, 1 H, 3-H), 2.10 – 2.00 (m, 1 H, 3-H), 2.19 – 2.10 (m, 2 H, 7-H), 2.31 – 2.24 (m, 2 H, 6-H), 3.66 (dt, $J = 4.3$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1 H, 7a-H), 7.95 (s, 1 H, N–H)

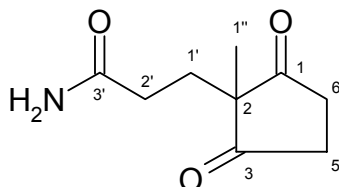
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 21.3 (CH_3 , C-8), 26.7 (CH_2 C-7), 27.5 (CH_2 , C-4), 28.0 (CH_2 , C-3), 34.4 (CH_2 , C-6), 47.0 (quart. C, C-4a), 59.7 (CH , C-7a), 172.7 ($\text{C}=\text{O}$, C-2), 219.2 ($\text{C}=\text{O}$, C-5)

IR: ν (cm^{-1}) = 3448, 3194, 3073, 2931, 2901, 1734, 1658, 1495, 1416, 1313, 1243, 1069, 976, 856

MS (APCI): m/z (%) = 168 (100) [$\text{M}^+ + 1$]

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 167 (78) [$\text{M}]^{+}$, 138 (100), 126 (21), 111 (88), 96 (56), 84 (66), 68 (37), 55 (57)

6.2.41 2-Methyl-2-(2-carbamoylethyl)-cyclopentan-1,3-dion (54)



0.64 g (0.016 mol) Natriumhydroxid werden in 50 ml Wasser gelöst, 11 g (0.10 mol) 2-Methyl-1,3-cyclopentadion zugegeben und bei 80 °C 10 min unter Rühren erhitzt. Anschließend werden 34 g (0.48 mol) Acrylamid in 30 ml Dioxan zugegeben und 25 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der entstandene Feststoff abfiltriert und mit einer 1:1 Dioxan-Wasser-Mischung gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 8 ml 2 N HCl versetzt und zum Öl eingengt. Dieses wird in 30 ml Ethylacetat aufgenommen, 30 min unter Rückfluß erhitzt und nach dem Abkühlen filtriert. Das Filtrat wird mit 50 ml Chloroform versetzt, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (EtOAc, DC: $R_f = 0.7$) gereinigt.

Ausbeute: 11 g (59%)

blaßgelber Feststoff

Schmelzpunkt: 166 °C

HR-MS: $C_9H_{13}NO_3$

Ber.: 183.0895

Gef.: 183.0892

1H -NMR (CD_3OD): δ (ppm) = 1.10 (s, 3 H, 1''-H), 1.85 – 1.77 (m, 1 H, 1'-H), 2.03 –

1.97 (m, 1 H, 1'-H), 2.18 – 2.09 (m, 1 H, 2'-H), 2.35 – 2.19 (m, 4 H, 5-H oder 6-H, 2'-H), 2.58 – 2.53 (m, 1 H, 5-H oder 6-H)

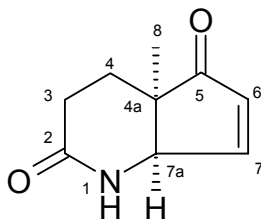
¹³C-NMR (CD₃OD): δ (ppm) = 19.4 (CH₃, C-1''), 25.5 (CH₂, C-1'), 29.2 (CH₂, C-2'), 34.2 (CH₂, C-5 oder C-6), 35.8 (CH₂, C-5 oder C-6), 52.5 (quart. C, C-2), 174.5 (C=O, C-3'), 219.7 (2 C=O, C-1 und C-3)

IR: ν (cm⁻¹) = 3323, 3257, 2964, 2935, 2470, 1739, 1653, 1576, 1458, 1398, 1346, 1228, 1188, 1159, 1059, 989, 795, 658

MS (APCI): m/z (%) = 184 (100) [M⁺+1], 166 (59), 113 (67)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 183 (14) [M]⁺, 166 (42), 138 (54), 126 (32), 112 (65), 83 (40), 69 (51), 55 (100)

6.2.42 2,5-Dioxo-4a-methyl-1,3,4,4a,5,7a-hexahydro-2H-[1]-pyridin (55)



A. 1.0 g (0.60 mmol) 2-Methyl-2-(2-cyanoethyl)-cyclopentan-1,3-dion (**28**) und 20 g (200 mol) Polyphosphorsäure werden 30 min unter Rühren bei einer Ölbadtemperatur von 100 °C erhitzt. Anschließend wird die Lösung auf zerstoßenes Eis gegeben und 3 x mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH = 5:1, DC: $R_f = 0.5$) gereinigt.

Ausbeute: 0.31 g (31%)

blaßgelber Feststoff

B. 0.30 g (1.8 mmol) 2-Methyl-2-(2-carbamoylethyl)-cyclopentan-1,3-dion (**54**) und 6.0 g (60 mol) Polyphosphorsäure werden 30 min. unter Rühren bei einer Ölbadtemperatur von 100 °C erhitzt. Anschließend wird die Lösung auf zerstoßenes Eis gegeben und mit 3 x mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Das Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch (EtOAc:EtOH = 5:1, DC: $R_f = 0.5$) gereinigt.

Ausbeute: 0.16 g (59 %)

Schmelzpunkt: 165 °C

HR-MS: $C_9H_{11}NO_2$

Ber.: 165.0790

Gef.: 165.0788

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1.27 (s, 3 H, 8-H), 1.72 (ddd, $J = 13.5$ Hz, $J = 9.7$ Hz, $J = 3.9$ Hz, 1 H, 4-H), 1.91 (m, 1 H, 4-H), 2.06 (m, 1 H, 3-H), 2.26 (m, 1 H, 3-H), 4.23 (m, 1 H, 7a-H), 6.33 (dd, $J = 5.7$ Hz, $J = 1.4$ Hz, 1 H, 6-H), 7.42 (s, 1 H, N-H), 7.46 (dd, $J = 5.7$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1 H, 7-H)

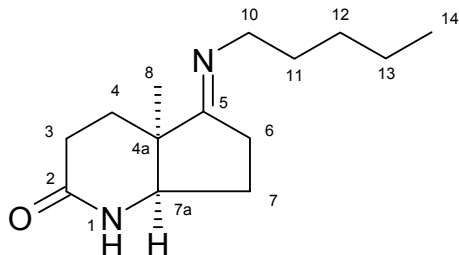
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 22.7 (CH₃, C-8), 29.2 (CH₂ C-4), 30.2 (CH₂, C-3), 45.4 (quart. C, C-4a), 62.4 (CH, C-7a), 133.5 (olefin. CH, C-6), 160.4 (olefin. CH, C-7), 174.1 (C=O, C-2), 210.5 (C=O, C-5)

IR: ν (cm⁻¹) = 3325, 3256, 2964, 2935, 2630, 1739, 1659, 1585, 1458, 1425, 1398, 1349, 1258, 1227, 1189, 1159, 1095, 1058

MS (APCI): m/z (%) = 166 (100) [M⁺+1]

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 165 (100) [M]⁺, 150 (39), 137 (21), 122 (24), 109 (94), 94 (42), 81 (36), 68 (19), 55 (47)

6.2.43 4a-Methyl-2-oxo-5-pentylimino-octahydro-[1]-pyrindin (56)



Zu einer Lösung von 0.84 g (9.6 mmol) n-Pentylamin und 0.40 g (2.4 mmol) 2,5-Dioxo-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (**53**) in 10 ml Methanol wird eine Lösung von 0.15 g (2.4 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 0.16 g (1.2 mmol) Zinkchlorid in 5 ml Methanol gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt, wobei jede Stunde die Umsetzungsrate per DC kontrolliert wird. Nach erfolgter Umsetzung wird das Gemisch in 20 ml 0.1 N Natronlauge aufgenommen. Danach wird das Methanol abrotiert und der wäßrige Rest 3 x mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und säulenchromatographisch (EtOAc:EDMA = 10:1, DC: $R_f = 0.10$) gereinigt.

Ausbeute: 0.43 g (76 %)

gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 91 °C

HR-MS: $C_{14}H_{24}NO_2$

Ber.: 236.1889

Gef.: 236.1908

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 0.90 (t, J = 6.7 Hz, 3 H, 14-H), 1.12 (s, 3 H, 8-H), 1.37 – 1.24 (m, 4 H, 12-H, 13-H), 1.65 – 1.56 (m, 2 H, 11-H), 1.85 – 1.67 (m, 2 H, 4-H, 7-H), 2.48 – 2.04 (m, 6 H, 3-H, 4-H, 6-H, 7-H), 3.26 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, 10-H), 3.64 (m, 1 H, 7a-H), 6.74 (s, 1 H, N-H)

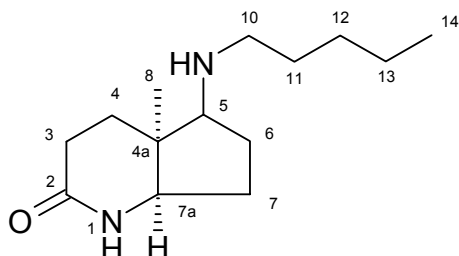
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 14.1 (CH₃, C-14), 22.6 (CH₂, C-13), 24.5 (CH₃, C-8), 25.9 (CH₂, C-6), 28.1 (CH₂, C-3), 28.5 (CH₂, C-4), 29.4 (CH₂, C-7), 29.8 (CH₂, C-12), 30.2 (CH₂, C-11), 44.8 (quart. C, C-4a), 54.0 (CH₂, C-10), 61.2 (CH, C-7a), 173.0 (C=O, C-2), 178.2 (C=N, C-5)

IR: ν (cm⁻¹) = 3190, 3052, 2956, 2925, 2330, 1745, 1685, 1455, 1412, 1361, 1333, 1251, 1224, 1109, 843, 728

MS (APCI): m/z (%) = 237 (100) [M⁺+1], 166 (42)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 236 (29) [M]⁺, 193 (30), 180 (34), 165 (50), 151 (45), 136 (37), 124 (48), 110 (24), 96 (27), 71 (53), 55 (100)

6.2.44 4a-Methyl-2-oxo-5-pentylamino-octahydro-[1]-pyrindin (57)



Zu einer Lösung von 0.84 g (9.6 mmol) n-Pentylamin und 0.40 g (2.4 mmol) 2,5-Dioxo-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (**53**) in 10 ml Methanol wird eine Lösung von 0.15 g (2.4 mmol) Natriumcyanoborhydrid und 0.16 g (1.2 mmol) Zinkchlorid in 5 ml Methanol gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt, wobei jede Stunde die Umsetzungsrate per DC kontrolliert wird. Nach erfolgter Umsetzung wird das Gemisch in 20 ml 0.1 N Natronlauge aufgenommen. Danach wird das Methanol abrotiert und der wäßrige Rest 3 x mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeeengt und säulenchromatographisch (EtOAc:EDMA = 10:1, DC: R_f = 0.10) gereinigt.

Ausbeute: 17 mg (3 %)

gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 61 °C

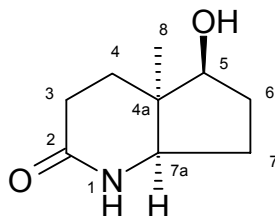
HR-MS: $C_{14}H_{26}NO_2$

Ber.: 238.2045

Gef.: 238.2052

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 14-H), 1.17 (s, 3 H, 8-H), 1.37 – 1.23 (m, 4 H, 12-H, 13-H), 1.80 – 1.41 (m, 6 H, 4-H, 6-H, 7-H, 11-H), 2.08 – 1.96 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 2.38 – 2.30 (m, 2 H, 3-H), 2.58 – 2.50 (m, 1 H, 10-H), 2.69 – 2.60 (m, 1 H, 10-H), 2.78 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J = 7.9$ Hz, 1 H, 5-H), 3.34 – 3.22 (m, 1 H, 7a-H), 6.51 (s, 1 H, N-H)
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 14.1 (CH_3 , C-14), 22.6 (CH_2 , C-13), 23.0 (CH_3 , C-8), 23.1 (CH_2 , C-4), 27.6 (CH_2 , C-3), 28.7 (CH_2 , C-7 *), 29.5 (CH_2 , C-12), 30.1 (CH_2 , C-11), 31.0 (CH_2 , C-6 *), 40.7 (quart. C, C-4a), 49.2 (CH_2 , C-10), 61.3 (CH, C-7a), 67.5 (NCH, C-5), 172.3 (C=O, C-2)
- IR:** ν (cm^{-1}) = 3204, 3078, 2949, 2924, 2869, 1654, 1466, 1406, 1377, 1316, 1245, 1180, 1074, 1000, 936, 811, 775
- MS (APCI):** m/z (%) = 239 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 166 (5), 151 (16)
- MS (EI 70 eV):** m/z (%) = 238 (6) [$\text{M}]^{++}$, 182 (12), 151 (100), 136 (57), 126 (54), 98 (34), 84 (18), 70 (53), 56 (31)

6.2.45 5-Hydroxy-4a-methyl-2-oxo-octahydro-[1]-pyrindin (58)



1.30 g (7.77 mmol) 2,5-Dioxo-4a-methyl-octahydro-[1]-pyrindin (**53**) werden bei Zimmertemperatur portionsweise unter Rühren zu einer Lösung von 120 mg (3.17 mmol) Natriumborhydrid in 12 ml Isopropylalkohol gegeben. Durch Stehen über Nacht wird die Reaktion vervollständigt. Dann wird vorsichtig verd. HCl zugesetzt, bis sich kein Wasserstoff mehr entwickelt. Die erhaltene Lösung extrahiert man 5 x mit je 20 ml Ether, trocknet den Extrakt mit Natriumsulfat und destilliert das Lösungsmittel ab.

Ausbeute: 93.0 mg (72 %)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 190 °C

HR-MS: C₉H₁₅NO₂

Ber.: 169.1103

Gef.: 169.1103

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 0.99 (s, 3 H, 8-H), 1.43 – 1.37 (m, 1 H, 7-H), 1.53 – 1.45 (m, 1 H, 3-H), 1.65 – 1.55 (m, 1 H, 6-H), 1.76 – 1.68 (m, 1 H, 7-H), 1.92 – 1.80 (m, 2 H, 3-H, 6-H), 2.25 – 2.12 (m, 2 H, 4-H), 3.14 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H, 7a-H), 3.73 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H, 5-

H)

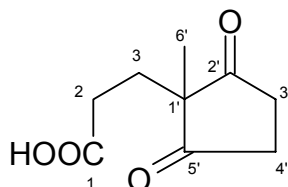
¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 23.5 (CH₃, C-8), 24.4 (CH₂, C-7), 28.5 (CH₂, C-4), 30.7 (CH₂, C-6), 31.1 (CH₂, C-3), 42.1 (quart. C, C-4a), 61.3 (CH, C-7a), 80.8 (CH, C-5), 175.1 (C=O, C-2)

IR: ν (cm⁻¹) = 3383, 2968, 2879, 2508, 2343, 1625, 1473, 1359, 1220

MS (APCI): m/z (%) = 170 (100) [M⁺+1], 65 (47)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 169 (6) [M]⁺, 151 (48), 136 (21), 126 (86), 112 (100), 96 (64), 83 (53), 70 (63), 59 (64), 55 (69)

6.2.46 3-(1-Methyl-2,5-dioxo-cyclopentyl)-propionsäure (59)



2.3 g (14 mmol) 2-Methyl-2-(2-cyanoethyl)-cyclopentan-1,3-dion (**28**) werden in 20 ml trockenem Methanol gelöst und die Lösung mit trockenem HCl-Gas gesättigt. Das Reaktionsgemisch wird 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Bei einer Wasserbadtemperatur unter 30 °C wird die Lösung eingedunstet, der braune Feststoff in 25 ml 1 N HCl aufgenommen, 30 min zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen filtriert. Das Filtrat wird mit Natriumchlorid gesättigt und 3 x mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedunstet. Das Rohprodukt wird aus Toluol umkristallisiert.

Ausbeute: 2.0 g (77 %)

weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 124 °C

Elementaranalyse: C₉H₁₂O₄ (184.17)

Ber.: C: 58.69 H: 6.57

Gef.: C: 58.60 H: 6.52

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1.11 (s, 3 H, 6'-H), 1.94 (t, J = 7.6 Hz, 2 H, 3-H), 2.32 (t, J = 7.6 Hz, 2 H, 2-H), 2.83 – 2.72 (m, 4 H, 3'-H, 4'-H)

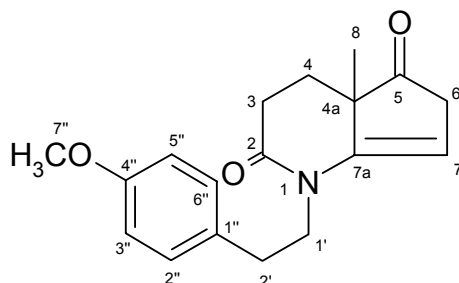
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 19.9 (CH_3 , C-6'), 28.2 (CH_2 C-3), 28.5 (CH_2 C-2), 34.7 (2 CH_2 C-3', C-4'), 55.2 (quart. C, C-1'), 178.3 (COO , C-1), 215.6 (2 CO , C-2', C-5')

IR: ν (cm^{-1}) = 3115, 1727, 1408, 1288, 1197, 1083, 1042, 995

MS (APCI): m/z (%) = 185 (48) [M^++1], 167 (100), 125 (35), 113 (6)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 184 (8) [M^{++}], 166 (24), 138 (84), 125 (44), 112 (23), 97 (66), 69 (100), 55 (98)

6.2.47 2,5-Dioxo-1-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-4a-methyl-1,2,4,4a,5,6-hexahydro-3H-[1]-pyrindin (60)



0.37 g (2.0 mmol) 3-(1-Methyl-2,5-dioxo-cyclopentyl)-propionsäure (**59**) werden in 15 ml Xylol 10 min unter Rückfluß erhitzt. Eine Lösung von 0.30 g (2.0 mmol) 2-(4-Methoxyphenyl)-ethylamin in 2 ml Xylol wird langsam zugetropft. Die Lösung wird 48 Stunden am Wasserabscheider bei 150 °C Ölbadtemperatur erhitzt und anschließend einrotiert. Nach Abrotieren des Lösungsmittels wird der Rückstand in Wasser und Diethylether aufgenommen und extrahiert. Die wässrige Phase wird zusätzlich 2 x mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EtOAc:Hexan = 2:1, DC: $R_f = 0.3$) gereinigt.

Ausbeute: 0.22 g (36 %)

braunes Öl

HR-MS: $C_{18}H_{21}NO_3$

Ber.: 299.1521

Gef.: 299.1528

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 1.16 (s, 3 H, 8-H), 1.73 – 1.62 (m, 1 H, 4-H), 1.91 – 1.83 (m, 1 H, 4-H), 2.86 – 2.57 (m, 4 H, 3-H, 2'-H), 2.90 (dd, $J = 22.4$ Hz, $J = 2.8$ Hz, 1 H, 6-H), 3.22 (dd, $J = 22.5$ Hz, $J = 1.8$

Hz, 1 H, 6-H), 3.79 – 3.67 (m, 4 H, 1'-H, 7''-H), 3.98 – 3.89 (m, 1 H, 1'-H), 5.06 (t, $J = 2.2$ Hz, 1 H, 7-H), 6.85 – 6.76 (m, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.19 – 7.01 (m, 2 H, 2''-H, 6''-H)

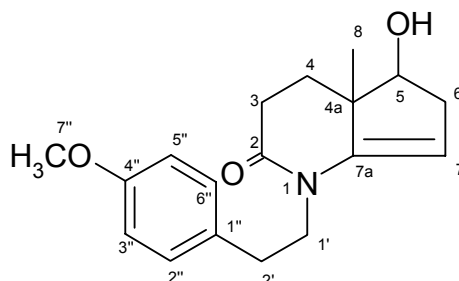
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 19.9 (CH_3 , C-8), 25.0 (CH_2 , C-4), 28.5 (CH_2 , C-3), 32.2 (CH_2 , C-2'), 40.5 (CH_2 , C-6), 44.1 (CH_2 , C-1'), 47.6 (quart. C, C-4a), 55.3 (CH_3 , C-7''), 96.6 (olefin. CH, C-7), 113.8 (2 aromat. CH, C-3'', C-5''), 129.7 (2 aromat. CH, C-2'', C-6''), 130.4 (quart. aromat. C, C-1''), 144.7 (quart. olefin. C, C-7a), 158.3 (quart. aromat. C, C-4''), 167.9 (C=O, C-2), 215.4 (C=O, C-5)

IR: ν (cm^{-1}) = 3354, 2934, 2837, 1750, 1703, 1670, 1630, 1513, 1376, 1248, 1179, 1034, 823, 736

MS (APCI): m/z (%) = 300 (100) [$\text{M}^+ + 1$], 197 (13), 134 (37)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 299 (3) [$\text{M}]^+$, 134 (100), 121 (20), 95 (8), 81 (19), 69 (10), 55 (18)

6.2.48 5-Hydroxy-1-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-4a-methyl-2-oxo-1,2,4,4a,5,6-hexahydro-3H-[1]-pyrindin (61)



0.37 g (2.0 mmol) 3-(1-Methyl-2,5-dioxo-cyclopentyl)-propionsäure (**59**) werden in 15 ml Xylol 10 min unter Rückfluß erhitzt. Eine Lösung von 0.30 g (2.0 mmol) 2-(4-Methoxyphenyl)-ethylamin in 2 ml Xylol wird langsam zugetropft. Die Lösung wird 3 Stunden am Wasserabscheider bei 150 °C Ölbadtemperatur erhitzt und anschließend einrotiert. Der Rückstand wird in 5 ml Methanol aufgenommen und bei 15 °C mit 0.13 g (2.4 mmol) Kaliumborhydrid während 30 min versetzt. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abrotieren des Methanols wird der Rückstand in Wasser und Diethylether aufgenommen und extrahiert. Die wässrige Phase wird zusätzlich 2 x mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Ethanol, DC: $R_f = 0.8$) gereinigt.

Ausbeute: 0.52 g (86 %)

rotes Öl

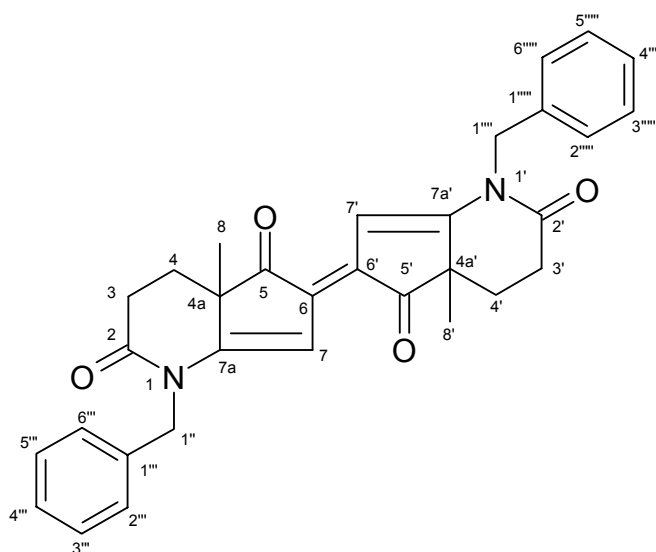
HR-MS: $C_{18}H_{23}NO_3$

Ber.: 301.1678

Gef.: 301.1687

- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 1.04 (s, 3 H, 8-H), 1.65 – 1.54 (m, 1 H, 3-H), 1.94 – 1.72 (m, 2 H, 3-H, 4-H), 2.38 – 2.24 (m, 1 H, 6-H), 2.65 – 2.52 (m, 2 H, 4-H, 6-H), 2.85 – 2.69 (m, 2 H, 2'-H), 3.70 – 3.61 (m, 1 H, 1'-H), 3.92 – 3.71 (m, 1 H, 1'-H), 3.76 (s, 3 H, 7''-H), 4.04 (t, $J = 8.0$ Hz, 1 H, 5-H), 4.64 (dd, $J = 4.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1 H, 7-H), 6.85 – 6.71 (m, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.16 – 7.02 (m, 2 H, 2''-H, 6''-H),
- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):** δ (ppm) = 14.6 (CH_3 , C-8), 29.1 (CH_2 , C-3), 31.1 (CH_2 , C-4), 32.1 (CH_2 , C-2'), 36.5 (CH_2 , C-6), 44.2 (CH_2 , C-1'), 44.2 (quart. C, C-4a), 55.3 (OCH_3 , C-7''), 97.3 (olefin. CH, C-7), 113.9 (2 aromat. CH, C-3'', C-5''), 129.8 (2 aromat. CH, C-2'', C-6''), 130.8 (quart. aromat. C, C-1''), 145.4 (quart. olefin. C, C-7a), 158.2 (quart. aromat. C, C-4''), 168.2 (C=O, C-2)
- IR:** ν (cm^{-1}) = 3382, 2931, 2866, 1621, 1512, 1246, 1177, 1089, 822
- MS (APCI):** m/z (%) = 302 (100) [M^++1], 284 (12), 246 (12), 134 (30)
- MS (EI 70 eV):** m/z (%) = 301 (4) [M^{++}], 167 (8), 134 (100)

6.2.49 1,1',2,2',4,4',4a,4a',5,5',6,6',6,6'-Hexyhydro-2,2',5,5'-tetraoxo-[3H,3'H]-[6,6']bi-[1]-pyridinyliden (64)



0.37 g (2.0 mmol) 3-(1-Methyl-2,5-dioxo-cyclopentyl)-propionsäure (**59**) werden in 15 ml Xylol 10 min unter Rückfluß erhitzt. Eine Lösung von 0.21 g (2.0 mmol) Benzylamin in 2 ml Xylol wird langsam zugetropft. Die Lösung wird 48 Stunden am Wasserabscheider bei 150 °C Ölbadtemperatur erhitzt und anschließend einrotiert. Nach Abrotieren des Lösungsmittels wird der Rückstand in Wasser und Diethylether aufgenommen und extrahiert. Die wässrige Phase wird 2 x mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (EtOAc:Hexan = 1:1, DC: $R_f = 0.36$) gereinigt. Die Substanz kristallisiert nach Stehen lassen direkt aus dem Elutionsmittel.

Ausbeute: 10 mg (1 %)

orange Kristalle

Schmelzpunkt: 297 °C

HR-MS: $C_{32}H_{30}N_2O_4$

Ber.: 506.2206

Gef.: 506.2235

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ (ppm) = 1.20 (s, 6 H, 8-H, 8'-H), 1.75 (dt, $J = 15.9$ Hz, $J = 7.3$ Hz, 2 H, 4-H, 4'-H), 2.03 – 1.95 (m, 2 H, 4-H, 4'-H), 2.88 – 2.72 (m, 4 H, 3-H, 3'-H), 4.77 (d, $J = 15.1$ Hz, 2 H, benzyl. CH_2), 5.16 (d, $J = 15.1$ Hz, 2 H, benzyl. CH_2), 7.08 (s, 2 H, 7-H, 7'-H), 7.33 – 7.20 (m, 10 arom. H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ (ppm) = 20.3 (2 CH_3 , C-8, C-8'), 24.6 (2 CH_2 , C-4, C-4'), 29.0 (2 CH_2 , C-3, C-3'), 46.3 (2 quart. C, C-4a, C-4a'), 46.4 (2 CH_2 , benzyl. CH_2), 107.9 (2 olefin. CH, C-7, C-7'), 127.4 (4 arom. CH), 127.6 (2 arom. CH), 128.7 (4 arom. CH), 129.3 (2 quart. olefin. C, C-6, C-6'), 136.0 (2 quart. arom. C), 153.4 (2 quart. olefin. C, C-7a, C-7a'), 168.4 (2 $\text{C}=\text{O}$, C-2, C-2'), 206.9 (2 $\text{C}=\text{O}$, C-5, C-5')

IR: ν (cm^{-1}) = 3086, 2958, 2918, 2360, 1707, 1684, 1568, 1375, 1190, 1126, 1005, 864, 735

MS (APCI): m/z (%) = 507 (28) $[\text{M}]^{+1}$, 256 (5), 142 (100)

MS (EI 70 eV): m/z (%) = 506 (6) $[\text{M}]^{+*}$, 251 (100), 149 (18), 91 (20), 44 (79)

6.3 Testung auf SBI-Aktivität

Im Folgenden werden die Standard Operating Procedures (SOPs) beschrieben, nach welchen die in Kapitel 4.1 beschriebene Screening-Methode reproduzierbar durchgeführt werden kann. Alle Parameter wurden unverändert aus der Dissertationsschrift von Müller³⁷ übernommen, da die Versuchsparameter 1:1 fortgeführt werden sollten und auch wurden.

Die Kürzel der getesteten Substanzen aus unserer Arbeitsgruppe sind folgenden Personen bzw. Arbeiten zuzuordnen:

„JCB“ = Joachim Burbiel³⁴

„APU“ = Andreas Puzik⁷³

„NS“ = Nouha Salman³⁵

„OK“ = Oliver Kast⁷⁴

„MG“ = Markus Gans²⁴

„FD“ = Frank Dombeck⁷⁵

„DR“ = Delphine Renard⁷²

„EK“ = Elisabeth Kirchisner⁷⁸

„SL“ = Stefanie Lange¹⁵

6.3.1 SOP – Kultivierung des Testorganismus *Yarrowia lipolytica* in Stammkultur

Prinzip: Aufrechterhaltung der vitalen Funktionen der Hefe durch regelmäßiges Überimpfen

Geräte: Mikrobiologische Werkbank (Laminar Flow)
Brutschrank (Temperatur 28°C)

Material: Eppendorf-Pipette mit sterilen Spitzen
Petrischale (steril)
Yarrowia lipolytica Stammkultur, DSMZ Nr. 1345

Lösungen: *Yarrowia lipolytica* Nährmedium (nach Vorgabe der DSMZ), autoklaviert bestehend aus:

Yeast Extract	10,0 g
Peptone	20,0 g
Glucose	20,0 g
H ₂ O dest.	ad 1000,0 ml

1. Die **regelmäßige Überimpfung** in frisches Medium stellt sicher, daß sich die Hefe permanent in der log-Phase befindet und damit eine gleich bleibende Qualität für die Testung gewährleistet ist. Die Prozedur wird **einmal wöchentlich** durchgeführt.
2. 30 – 35 ml Nährmedium werden unter keimarmen Bedingungen (Laminar Flow) in eine neue Petrischale gegeben. Aus der Kultur der vorangegangenen Wochen werden 100 µl mit einer Eppendorf-Pipette überimpft und die frische Kultur bei 28°C bebrütet.
3. Eine gesunde Kultur von *Yarrowia lipolytica* bildet (in Ruhekultur) eine schwimmende, geflochtene wirkende Haut, die beim Schwenken der Petrischale schnell zerbricht und flockig absinkt.

6.3.2 SOP – Kultivierung von *Yarrowia lipolytica* unter Zusatz von Testsubstanzen

Prinzip: Vorbereitung der Testsubstanzen, Präparation der Kulturschalen

Geräte: Mikrobiologische Werkbank (Laminar Flow)
Brutschrank (Temperatur 28°C), bzw. Schüttelinkubator

Material: Eppendorf-Pipette(n),
Kulturflaschen 100 ml mit *Capsenbergkappen*-Verschluß

Lösungen: 1. *Yarrowia lipolytica* Nährmedium (nach Vorgabe der DSMZ),
autoklaviert, bestehend aus:

Yeast Extract	10,0 g
Peptone	20,0 g
Glucose	20,0 g
H ₂ O dest.	ad 1000,0 ml

2. Ethanol
3. Ethanolische Standardlösungen der zu testenden Substanzen

1. Zu testende Substanzen werden eingewogen und in Ethanol gelöst. Aus der resultierenden Stammlösung werden eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung hergestellt.
2. Für eine Testreihe werden zwei Kontrollen (ohne Wirkstoffzugabe) und zehn Ansätze mit Wirkstoffzugabe eingesetzt.
3. Die Kulturflaschen werden mit je 40 ml Nährmedium befüllt. Aus der Stammkultur in der Petrischale werden je 100 µl überimpft.
4. Um Wachstumsbeeinträchtigungen durch zuviel Ethanol zu verhindern, werden maximal 0,2% Ethanolgehalt (= 80 µl) zugelassen. Durch geeignetes Pipettieren* aus der Stammlösung bzw. den Verdünnungen werden die Testsubstanzen ins Medium gegeben.
5. Nach der Probenaufnahme wird jeder Ansatz ad 80 µl Ethanol aufgefüllt und geschüttelt.

* Beispiel siehe „Musterpipettierschema“ auf der nächsten Seite

6. Die Ansätze und Kontrollen werden drei Tage bei 28 °C im Brutschrank bebrütet (Ruhekultur). Alternativ können sie im Schüttelinkubator bei 240 UPM und 28°C bebrütet werden (Schüttelkultur).

Pipettierschema

Datum:

Substanz:

Strukturformel:

① Stammlösung der Testsubstanz:
(20 mg Substanz in 10 ml Ethanol)

② Verdünnung 1:10 von ① mit Ethanol

③ Verdünnung 1:100 von ① mit Ethanol

Nr.		Zugabe Testsubstanz	Zugabe Ethanol	Konzentration im Medium (40 ml)	Trockenbiomasse nach Kultivierung [mg]	Auswahl für die Aufarbeitung
	Kontrolle 1	---	80 µl	0 µg/ml		
	Kontrolle 2	---	80 µl	0 µg/ml		
	Ansatz 1	40 µl ③	40 µl	0,02 µg/ml		
	Ansatz 2	80 µl ③	---	0,04 µg/ml		
	Ansatz 3	20 µl ②	60 µl	0,1 µg/ml		
	Ansatz 4	60 µl ②	20 µl	0,3 µg/ml		
	Ansatz 5	10 µl ①	70 µl	0,5 µg/ml		
	Ansatz 6	20 µl ①	60 µl	1,0 µg/ml		
	Ansatz 7	30 µl ①	50 µl	1,5 µg/ml		
	Ansatz 8	40 µl ①	40 µl	2,0 µg/ml		
	Ansatz 9	60 µl ①	20 µl	3,0 µg/ml		
	Ansatz 10	80 µl ①	---	4,0 µg/ml		

Abb. 120: Musterpipettierschema

6.3.3 SOP – Gewinnung der Trockenbiomasse aus der Flüssigkultur und Bestimmung von EC_{50}

Prinzip: Gewinnung der Hefebiomasse nach Filtration, Bestimmung der Trockenbiomasse und graphische Ermittlung von EC_{50} aus dem Dosis–Wachstum–Diagramm unter Zuhilfenahme von *Microsoft Excel*[®].

Geräte: Vakuumfiltrationsvorrichtung (*Schleicher&Schuell GV 050/3*) mit Vakuumpumpe
Trockenschrank (Temperatur 90°C)
Analysenwaage

Material: Membranfilter (*Schleicher&Schuell RC-L 60*, Porenweite 1 µm, Ø 50 mm)
Pinzette
Becherglas
Pasteurpipette

Chemikalien: H₂O dest.

1. Die Membranfilter werden exakt gewogen.
2. Die Flüssigkultur wird an der Filtrationsapparatur mit dem vorher gewogenen Filter abgesaugt. Die Kulturflasche und der Trichter werden mit Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wird verworfen.
3. Der feuchte Filter mit dem Hefekuchen wird 90 min in den Trockenschrank bei 90°C gestellt.
4. Der getrocknete Hefekuchen wird gegen das Leergewicht ausgewogen und gegebenenfalls für die spätere Hydrolyse aufbewahrt.
5. Die gesammelten Auswaagen werden im Tabellenkalkulationsprogramm gegen ihre jeweils zugrunde liegende Dosis aufgetragen und graphisch dargestellt. Zur Bestimmung von EC_{50} wird graphisch die Konzentration an Wirkstoff ermittelt, die eine ungefähr 50%ige Reduktion des Wachstums gegenüber der Kontrolle ohne Wirkstoff aufweist.

6.3.4 SOP – Aufarbeitung der Trockenbiomasse zum Hefehydrolysat

Prinzip: Saure und alkalische Hydrolyse der Hefe als Vorbereitungsschritt zur Extraktion der lipophilen, unverseifbaren Anteile mit SPE

Geräte: Sandbad (Temperatur: 105-115°C)
Ultra-Turrax (11.000 UPM)

Material: je Ansatz 1x 50 ml Rundkolben NS29
Meßzylinder 100 ml Siedesteinchen
Steigrohr NS 29, Länge ca. 100 cm
Einwegspritze oder Pasteurpipette
lange Pinzette

Chemikalien: 1. 0.1 N HCl
2. EtOH / 1N KOH (7:3)
3. Standardlösung Cholesterol (~ 0,01% in Ethanol)

*Bei der gesamten Prozedur, muß darauf geachtet werden, daß die Proben nicht dem Tageslicht ausgesetzt sind und auch nur in **abgedunkelten Räumen** gearbeitet wird. Andernfalls muß damit gerechnet werden, daß das Ergosterol der Hefe unter Lichteinfluß zerstört wird (vgl. Kapitel 4.3.1).*

1. **Saure Hydrolyse (1. + 2.):** Der trockene (evtl. gewogene) Cellulosefilter mit der Hefebiomasse wird in einen Rundkolben gegeben, der zudem 1 ml Cholesterol-Standardlösung und 10 ml 0,1 N HCl-Lösung, sowie ein Siedesteinchen enthält.
2. Mit aufgesetztem Steigrohr wird 30 min auf dem Sandbad erhitzt.
3. **Homogenisierung + alkalische Hydrolyse (3. – 6.):** Pro Ansatz werden 40 ml ethanolische KOH im Meßzylinder bereitgestellt. Sie werden nach eigenem Ermessen zur Ausführung der Schritte 4. und 5. eingeteilt und aufgebraucht.
4. Der Kolben wird vom Sandbad genommen, das Steigrohr entfernt. Es wird ein Teil ethanolische KOH zugegeben und der Hefekuchen vom Filter abgeschwemmt. Mit der Pinzette wird der Filter herausgenommen, darauf anhaftende Hefereste werden mit ethanolischer KOH zurück in den Kolben gespült. Der Filter wird entsorgt. Das Siedesteinchen wird ebenso entnommen, gewaschen und für Schritt 6. aufgehoben.
5. Der Inhalt des Rundkolbens wird etwa 20 Sekunden mit dem Ultra-Turrax

homogenisiert. Verbleibende Reste am Scherkopf werden mit der übrigen ethanolischen KOH zurück in den Rundkolben gespült.

6. Das Siedesteinchen wird wieder in den Kolben gegeben. Das Steigrohr wird aufgesetzt und es wird weitere 60 min auf dem Sandbad rückfließend erhitzt.

6.3.5 SOP – Extraktion der Sterolfraktion aus Hefehydrolysat

Prinzip: Festphasenextraktion (SPE) der lipophilen, unverseifbaren Anteile

Geräte: Zentrifuge (4000 UPM / 35°C / 7 min)
SPE-Vakuumkammer

Material: SPE: Merck® LiChrolut EN (Polymerphase) 3 ml / 200 mg
je SPE 1x 20 ml Einwegspritze + Kanüle
Eppendorf-Pipette (1 ml)
100 ml Zentrifugengläser
Reagenzgläser zum Einsatz in die Vakuumkammer

Lösungen:

1. MeOH	Konditionieren 1
2. H ₂ O / EtOH = 60 / 40	Konditionieren 2
3. 1 N KOH / EtOH = 90 / 10	Waschen
4. EtOAc	Elution

*Bei der gesamten Prozedur, insbesondere der SPE, muß darauf geachtet werden, daß die Proben nicht dem Tageslicht ausgesetzt sind und auch nur in **abgedunkelten Räumen** gearbeitet wird. Andernfalls muß damit gerechnet werden, daß das Ergosterol der Hefe unter Lichteinfluß zerstört wird.*

1. Das frisch bereitete Hydrolysat (ca. 51 ml) wird in ein Zentrifugenglas überführt und 7 min bei 4000 UPM zentrifugiert. Die Zentrifuge ist auf 35°C temperiert.
2. **Konditionierung:** Die SPE-Kartuschen werden zunächst mit **2 ml Lösung 1** konditioniert. Die Tropfgeschwindigkeit sollte bei 5-7 ml/min liegen. Kurz vor dem Trockenlaufen wird gestoppt und **2 ml Lösung 2** aufgegeben und bis kurz vor dem Trockenlaufen abgesaugt.
3. **Probenaufgabe:** Man entnimmt das noch warme Zentrifugat vorsichtig mit der Spritze und gibt die gesamte Probe nach und nach auf die SPE-Kartusche

(5-7 ml/min). Das Zentrifugat kann bei vorsichtiger Entnahme fast vollständig entnommen und aufgetragen werden. Der Niederschlag wird verworfen.

4. **Waschen:** Kurz vor dem Trockenlaufen wird gestoppt und insgesamt **5 ml Lösung 3** aufgegeben und abgesaugt. Nach dem Trockenlaufen wird das Vakuum für etwa 20 Sekunden auf unter 500 mbar gesenkt, um letzte Tropfen abzusaugen. Anschließend wird belüftet und das bisher angefallene Eluat verworfen.
5. **Elution:** Nach Einsatz der Reagenzgläser wird mit **2 x 2 ml Lösung 4** eluiert. Vor dem Anlegen des Vakuums läßt man einen Teil des EtOAc in die Phase einziehen und etwa 1 min einwirken. Die Elution wird langsam durchgeführt. Nach erfolgter Elution wird erneut kurz ein höheres Vakuum angelegt, um die SPE-Kartusche vollständig trocken zu saugen.

Der gewonnene Sterolextrakt steht direkt zur chromatographischen Analyse zur Verfügung.

6.4 Datenblätter der Testsubstanzen

Auf den nachfolgenden Datenblättern sind zunächst Name bzw. interne Bezeichnung der Testsubstanzen angegeben. Außerdem ist neben dem Hinweis auf den Testkeim zusätzlich die jeweilige Strukturformel dargestellt.

Die Tabelle gibt Auskunft über die Dosis–Wachstum–Beziehung. Bei einigen Substanzen wurde die Konzentrationsspanne über den Maximalwert hinaus erweitert bzw. zwischen zwei Konzentrationen eine feinere Abstufung durchgeführt.

Aus dem resultierendem Diagramm wird anschließend graphisch die entsprechende Halbwachstumskonzentration EC_{50} ermittelt. Es sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, daß dieser Wert das Ergebnis von Einzelreihen darstellt und ihm daher eine gewisse Fehlertoleranz nachzusehen ist. Er ist in keinerlei Weise ein Parameter bei der Übertragung auf einen anderen Pilzstamm. Dennoch gibt er innerhalb einer Substanzklasse einen groben Aufschluß über quantitative Struktur–Wirkungs–Beziehungen.

Bei positiver Hemmwirkung lassen sich jedoch anhand der jeweiligen qualitativen Auswirkungen auf das Sterolmuster eindeutig Aussagen über den Inhibitionstyp machen. Diese Aussage wiederum läßt sich auf andere humanpathogene Keime übertragen.

Bei einigen Testsubstanzen, die das Pilzwachstum signifikant hemmen konnten, sind exemplarisch jeweils die zugehörigen Sterolpattern, die bei der in der Tabelle rot umrahmten Wirkstoffkonzentration erhalten wurden, dargestellt. Sie geben Aufschluß darüber, ob eine Substanz selektiv in die Ergosterol-Biosynthese eingreift bzw. es sich um einen anderen Hemmechanismus handelt. Sofern möglich, wurde ein Chromatogramm nahe der EC_{50} ausgewählt.

Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Sterole wurden alle Spektren als XIC (*Extracted Ion Chromatogram*) dargestellt. Wie Tabelle 9 verdeutlicht, eluieren viele Verbindungen sehr nahe beieinander. Im XIC soll die unterschiedliche Farbgebung neben der Nummerierung eine bessere optische Unterscheidung ermöglichen.

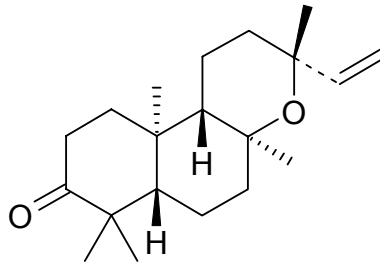
	Sterol	Retentionszeit [min]
1	Squalen	~ 15.9
2	Lanosterol	~ 22.2
7	Fecosterol	~ 20.9
9	24(28)-Dehydroergosterol	~ 20.8
10	Ergosterol	~ 20.5
65	Cholesterol (IS)	~ 19.3
66	Lichesterol	~ 20.0
67	Ergosta-8-enol	~ 21.0
68	Erogsta-7-enol	~ 21.4
69	Cholesta-5,7,24-trienol	~ 20.3

Tabelle 9: Sterole und ihre Retentionszeiten

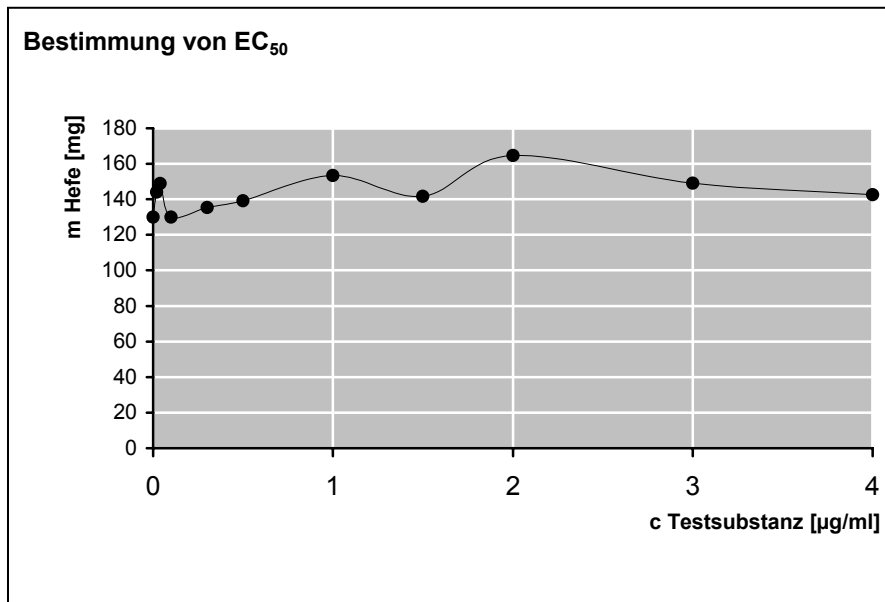
Soweit nicht anders angegeben, wurde *Yarrowia lipolytica* in Ruhekultur inkubiert.

6.4.1 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit AM 684

Strukturformel:

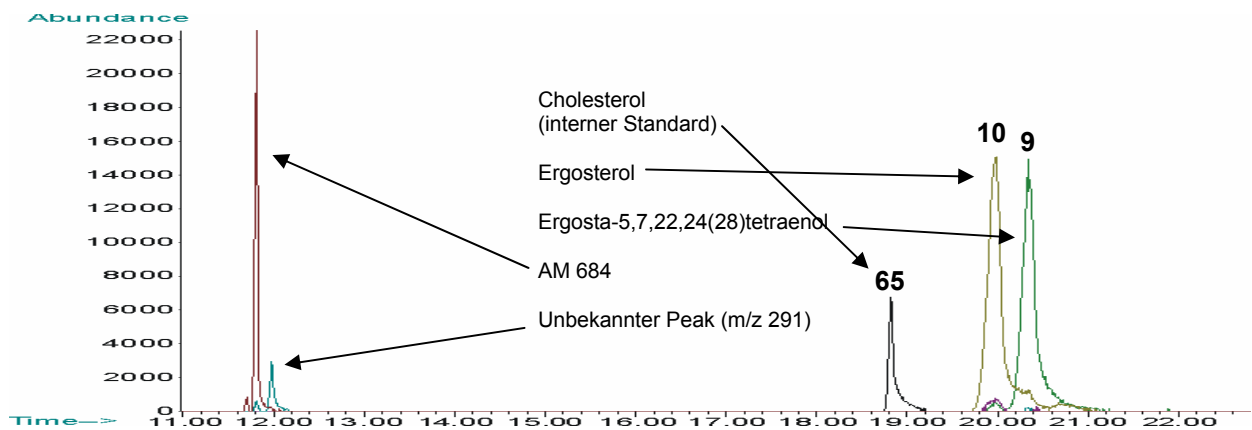


Y.I.	Ø 2066K1 2067K2	2098	2099	2100	2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107
AM 684 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	129.9	144.0	148.8	130.0	135.4	139.1	153.4	141.7	164.7	149.0	142.6



EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich



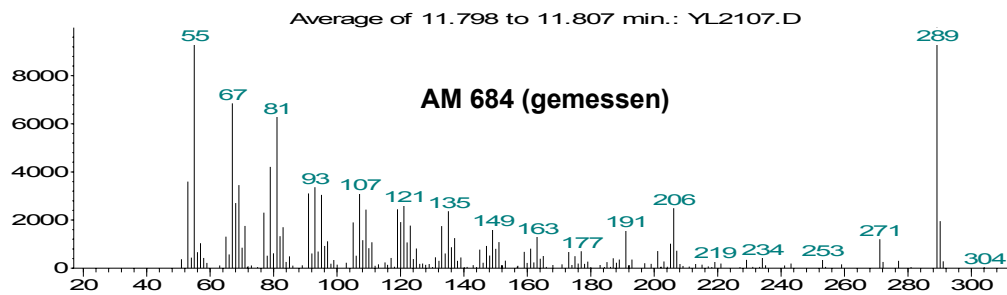
6 Experimenteller Teil

Einer der zusätzlich auftretenden Peaks konnte anhand der Datenbank mit einer Wahrscheinlichkeit von 93 % als die eingesetzte Testsubstanz identifiziert werden.

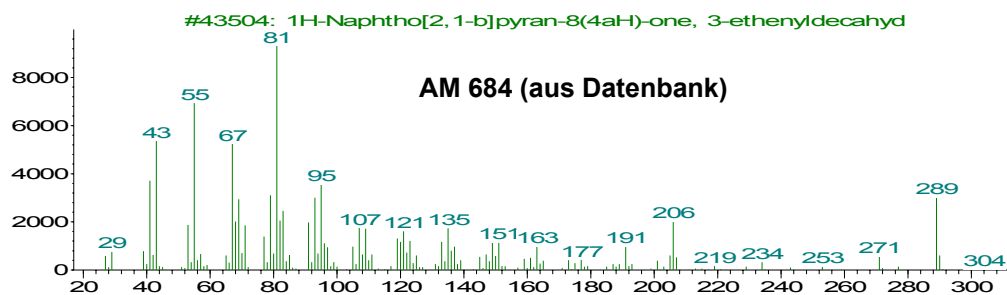
Bei dem anderen Peak handelt es sich aufgrund ähnlicher Masse und ähnlicher Elutionszeit höchstwahrscheinlich um ein Artefakt der Testsubstanz.

Unter abgebildet sind neben den entsprechenden Massenspektren beider Substanzen außerdem das Datenbankreferenzspektrum der Testsubstanz.

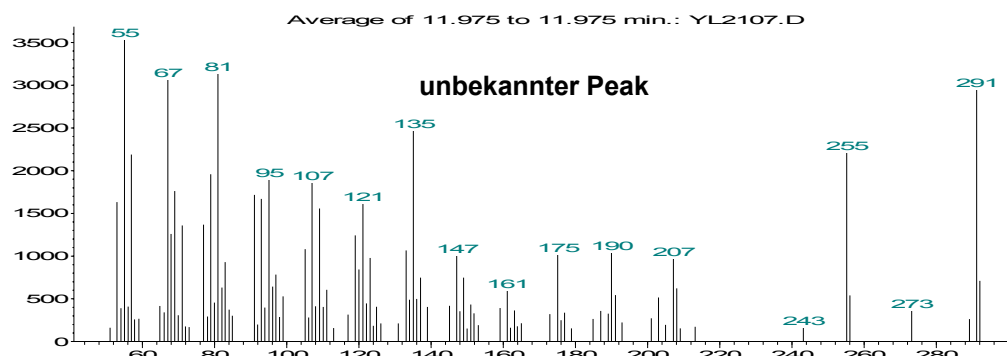
Abundance



Abundance

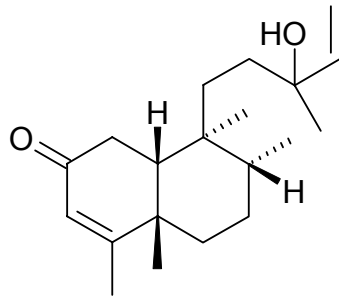


Abundance

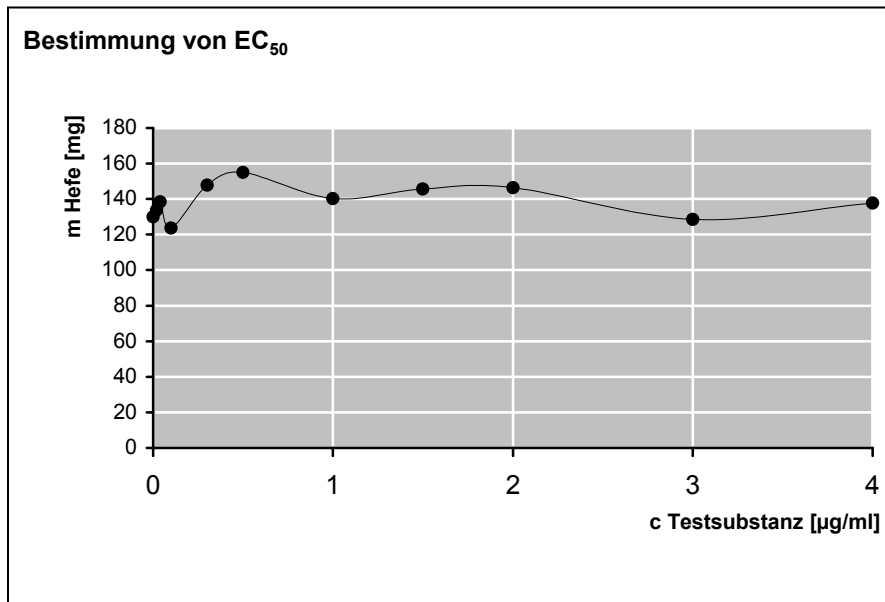


6.4.2 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit AM 686

Strukturformel:

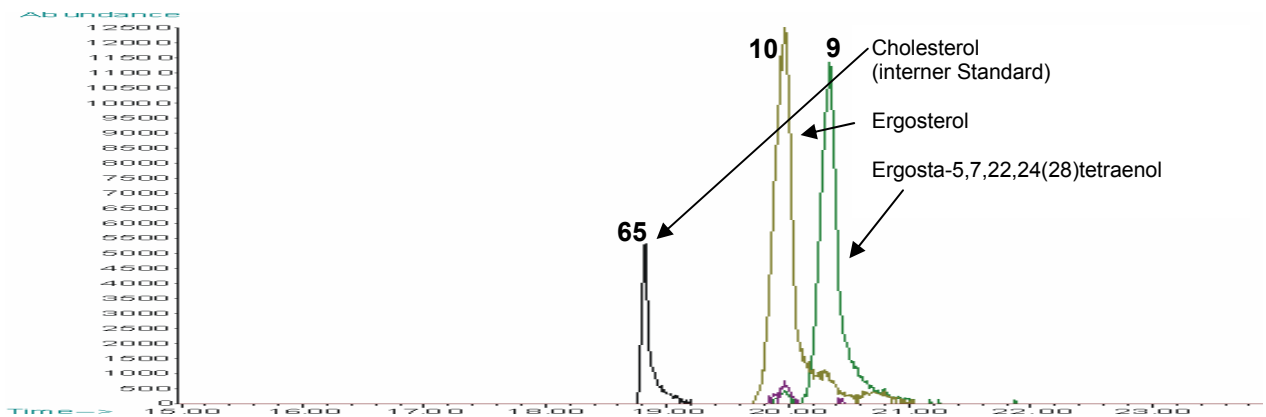


Y.l.	∅ 2066K1 2067K2	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087
AM 686 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	129.9	133.7	138.5	123.6	147.7	155.0	140.3	145.7	146.4	128.5	137.7



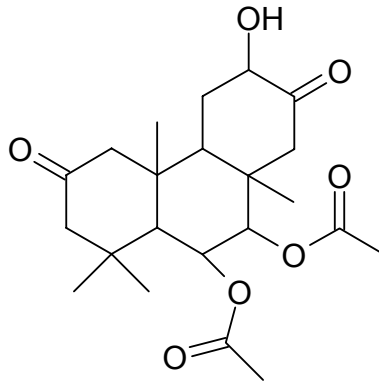
EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

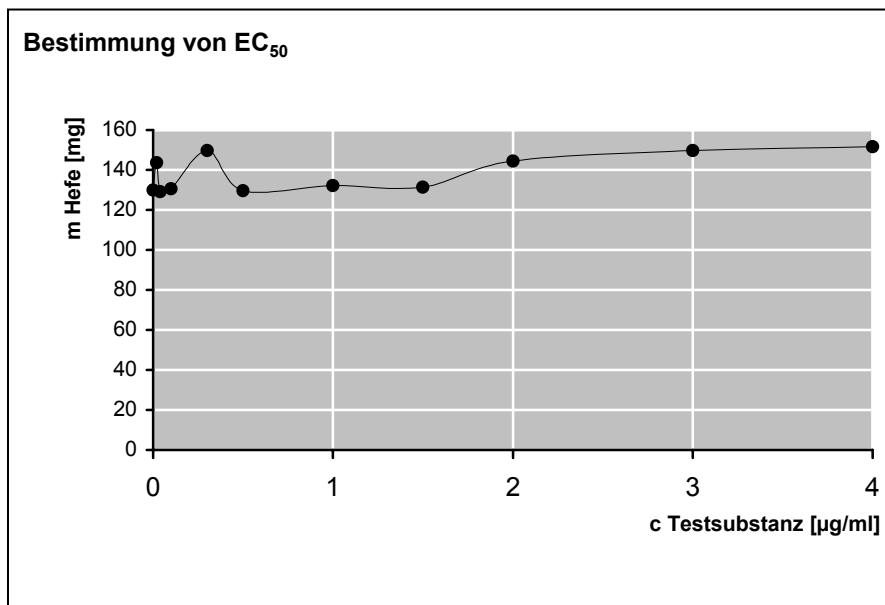


6.4.3 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit AM 693

Strukturformel:

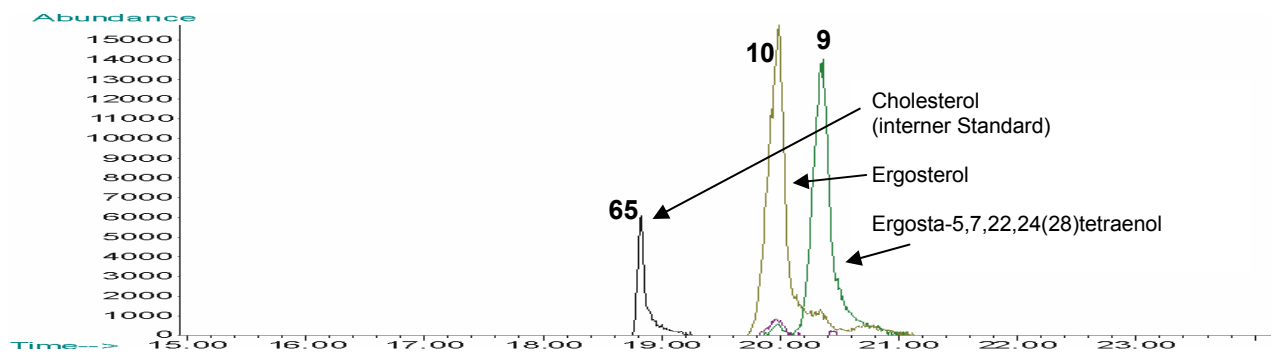


Y.l.	∅ 2066K1 2067K2	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097
AM 693 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	129.9	143.7	129.2	130.6	149.7	129.6	132.1	131.3	144.5	149.8	151.7



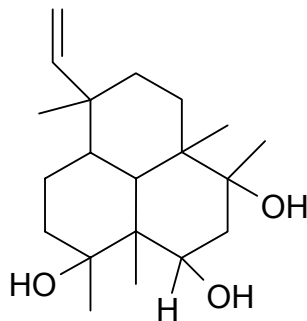
EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

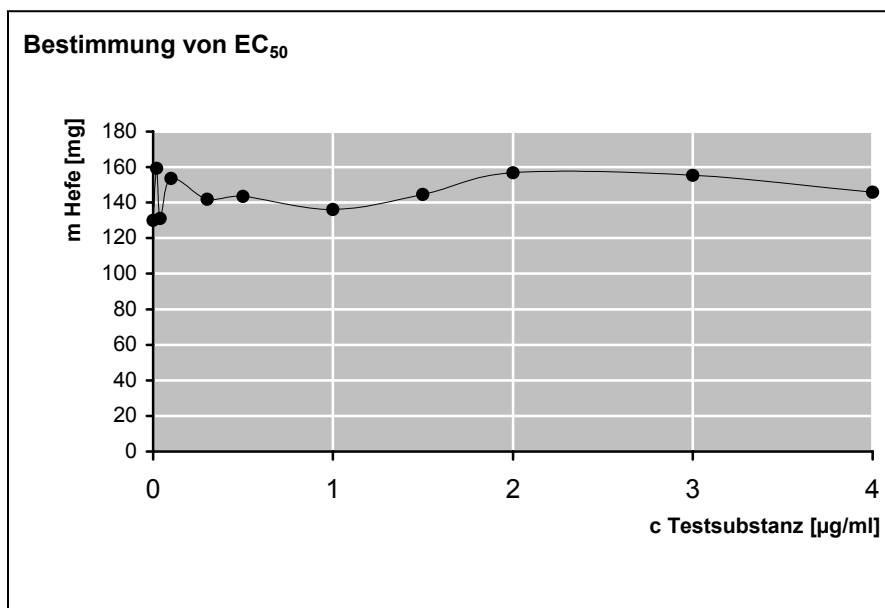


6.4.4 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit AM 694

Strukturformel:

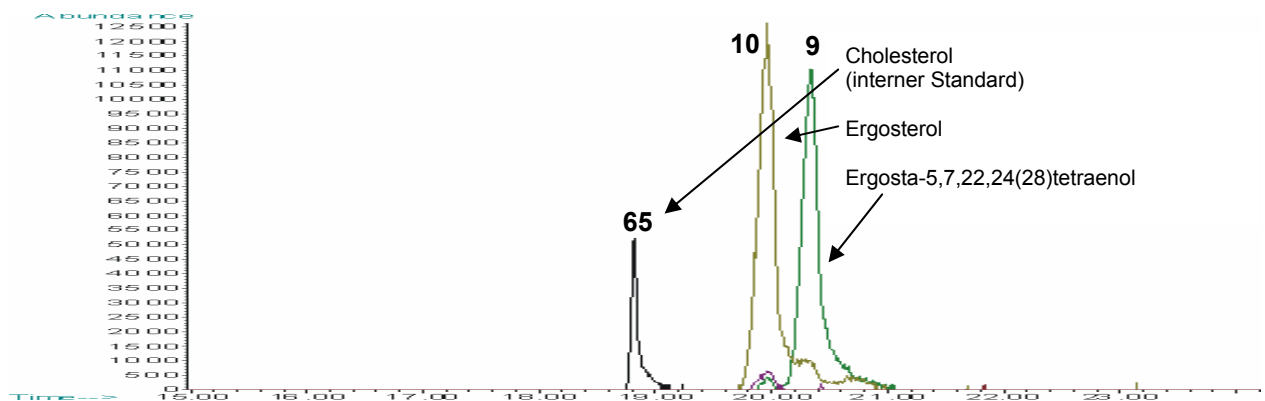


Y.l.	∅ 2066K1 2067K2	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077
AM 694 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	129.9	159.3	131.0	153.6	141.8	143.5	136.0	144.5	156.7	155.4	145.8



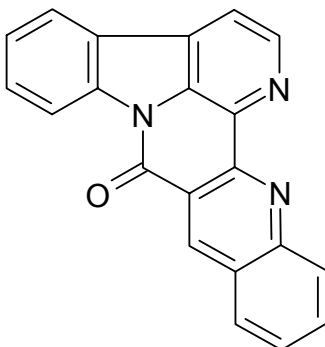
EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich



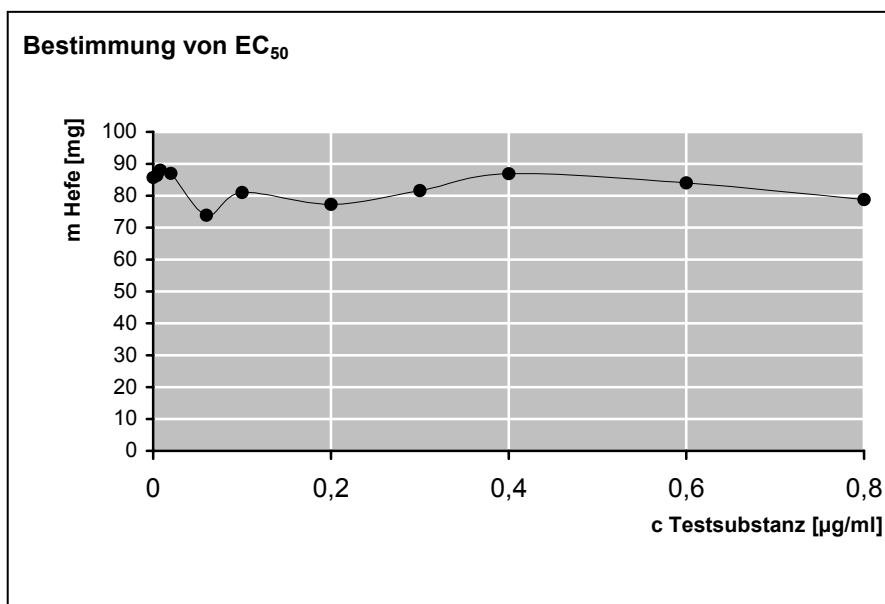
6.4.5 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit APU-131

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1308K1 1309K2	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308
APU-131 [$\mu\text{g/ml}$]*	0.00	0.004	0.008	0.020	0.060	0.100	0.200	0.300	0.400	0.600	0.800
Trockengewicht [mg]	85.7	86.3	88.0	87.0	73.9	81.0	77.3	81.6	86.9	84.0	78.8

* durch eine zu starke Verdünnung der Substanz kamen folgende Substanzkonzentrationen zustande. Auf eine Wiederholung der Messung im herkömmlichen Messbereich wurde verzichtet.

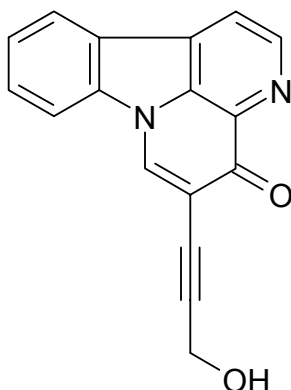


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

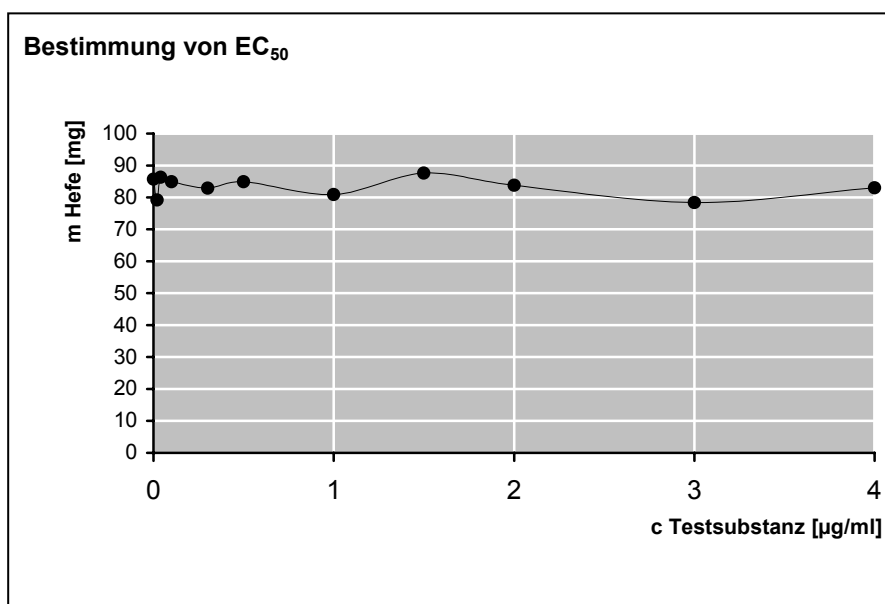
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.6 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit APU-133

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1308K1 1309K2	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329
APU-133 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	85.7	79.2	86.3	84.9	82.9	84.9	80.9	87.6	83.8	78.4	83.0

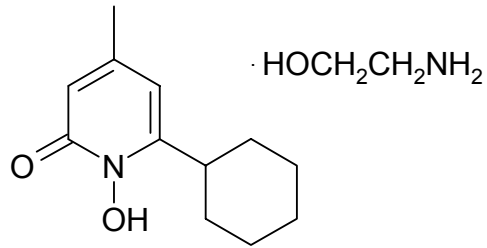


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

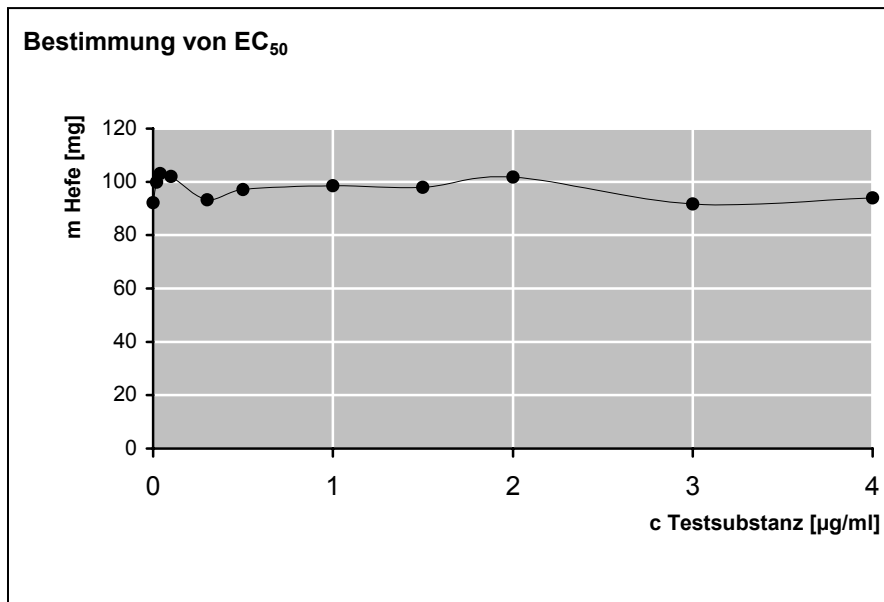
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.7 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Ciclopiroxolamin

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1428K1 1429K2	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439
Ciclopiroxolamin [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	92.2	99.8	103.1	102.0	93.3	97.1	98.5	97.9	101.7	91.7	93.9

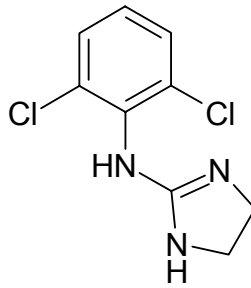


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

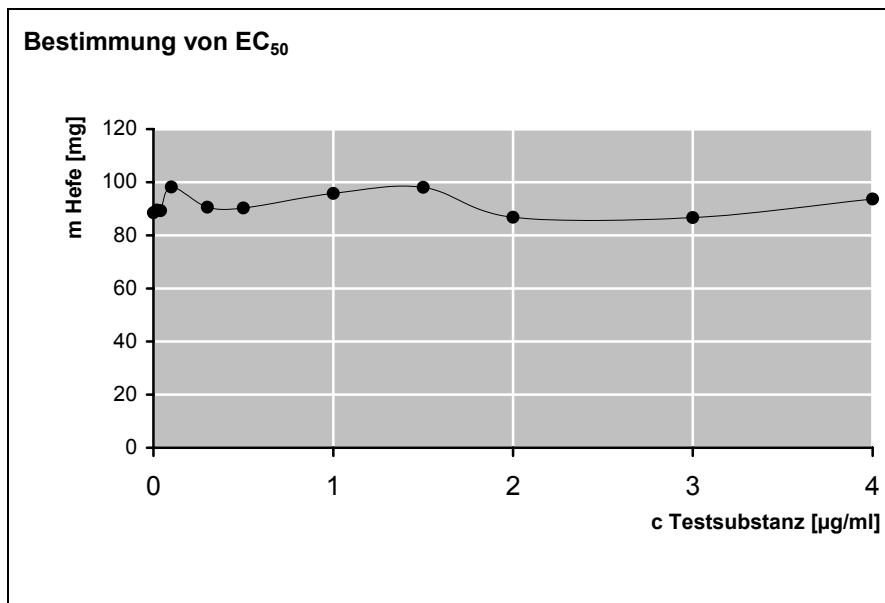
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.8 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Clonidin

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1177K1 1178K2	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188
Clonidin [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	88.5	89.5	89.3	98.2	90.6	90.3	95.8	98.1	86.8	86.7	93.7

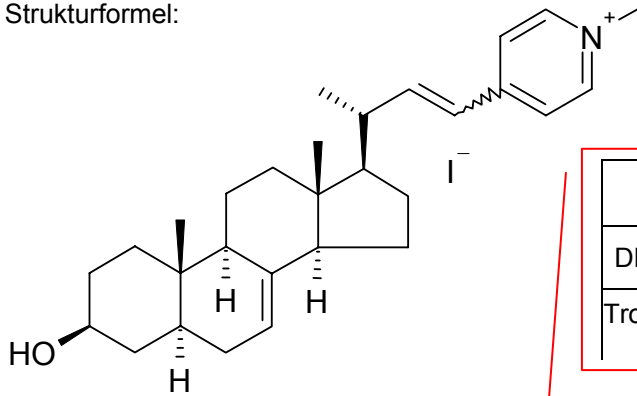


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

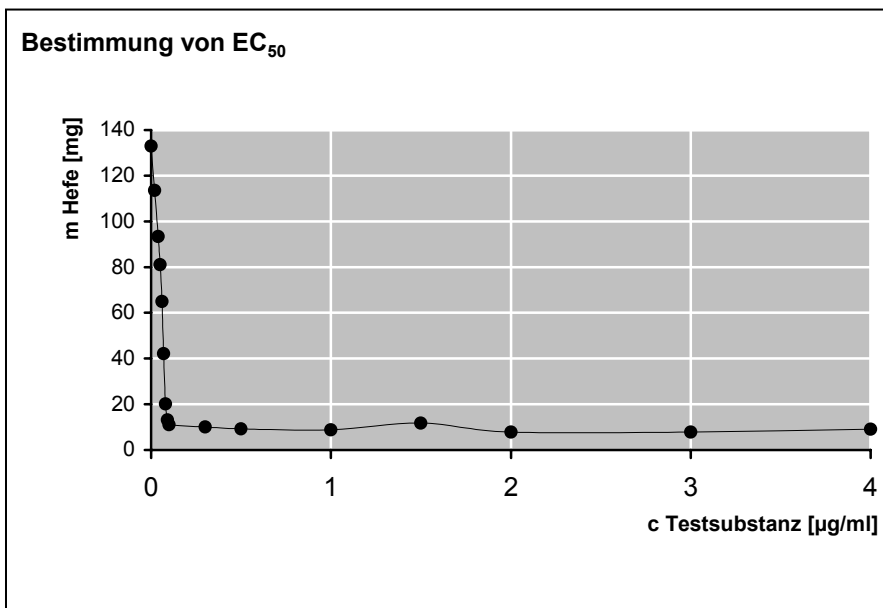
6.4.9 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit DR-97

Strukturformel:



Y.l.	2019	2020	2021	2022	2023
DR-97 [$\mu\text{g/ml}$]	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
Trockengewicht [mg]	81.0	65.0	42.2	20.1	13.2

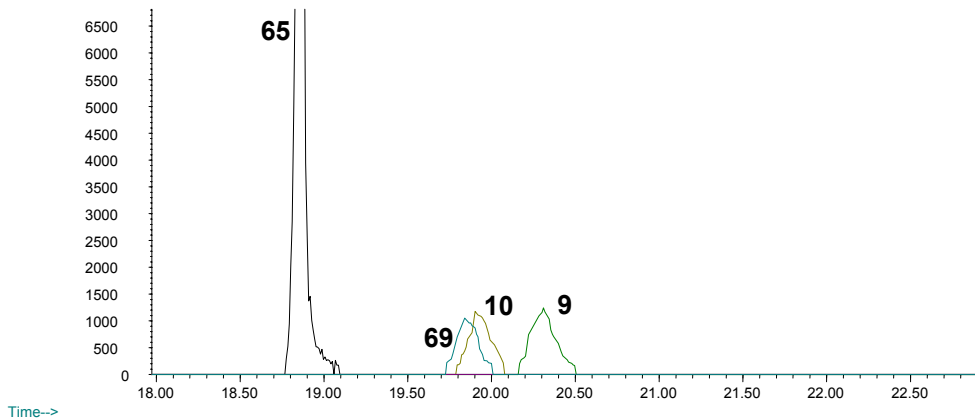
Y.l.	Ø 1970K1 1971K2	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
DR-97 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	133.0	113.5	93.4	11.1	10.1	9.2	8.8	11.8	7.8	7.8	9.1



EC₅₀: ~ 0.06 $\mu\text{g/ml}$

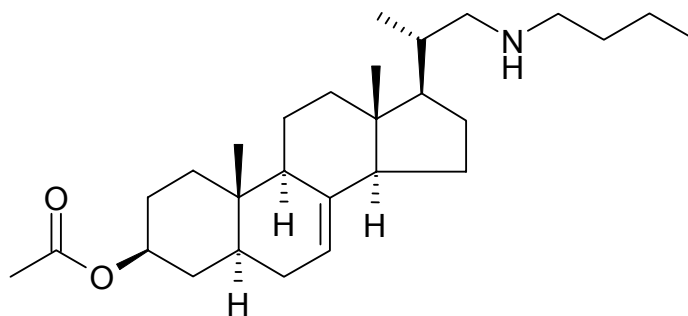
Inhibitionstyp: C-24-Methyltransferase

Abundance

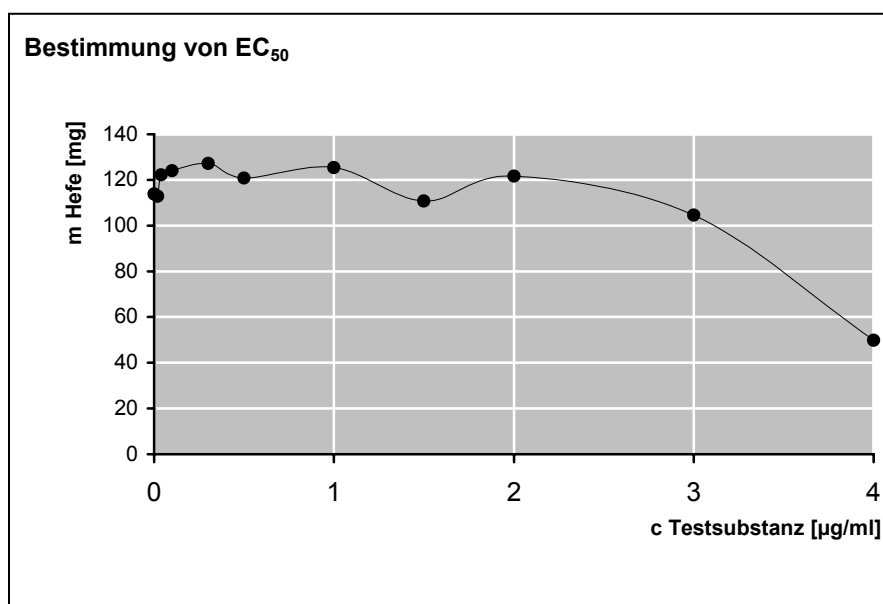


6.4.10 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit DR-113

Strukturformel:



Y.I.	Ø 1938K1 1939K2	1940	1941	1942	1943	1944	1945	1946	1947	1948	1949
DR-113 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	113.8	112.8	122.2	124.1	127.2	120.8	125.5	110.8	121.6	104.6	49.9

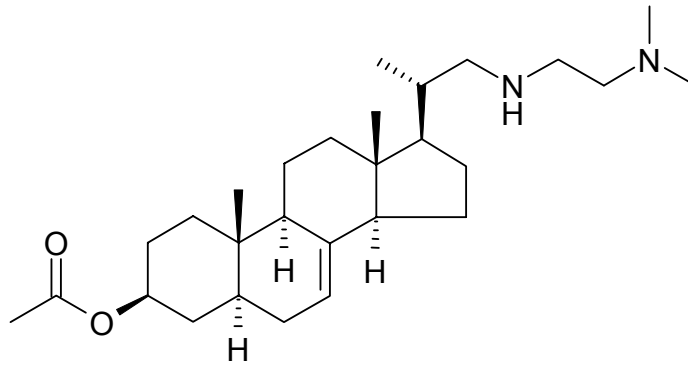


EC_{50} : ~ 3.9 $\mu\text{g/ml}$

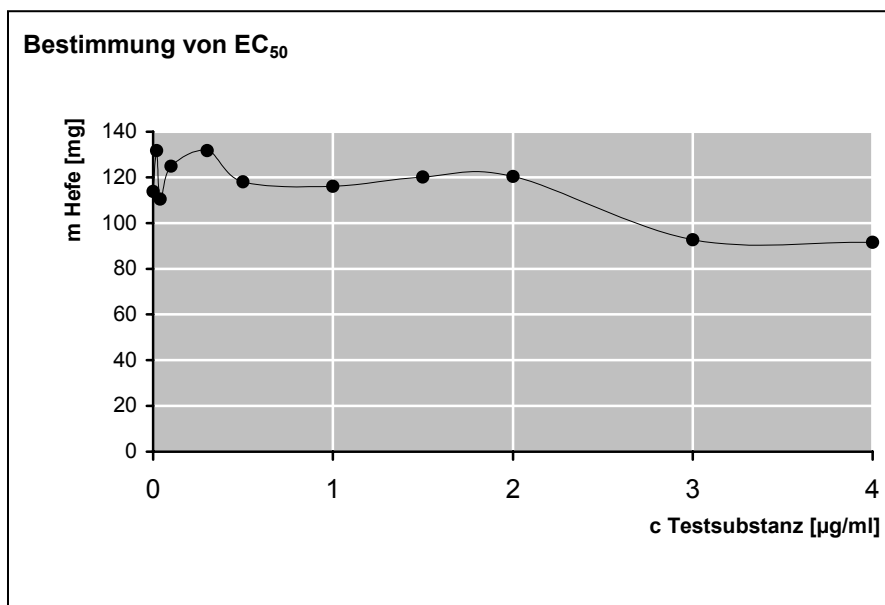
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.11 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit DR-114

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1938K1 1939K2	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959
DR-114 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	113.8	131.8	110.4	124.9	131.7	118.0	116.1	120.1	120.4	92.7	91.6

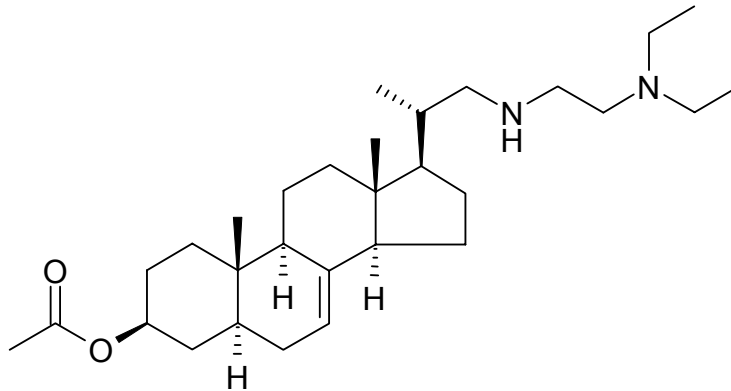


EC₅₀: > 4.0 µg/ml

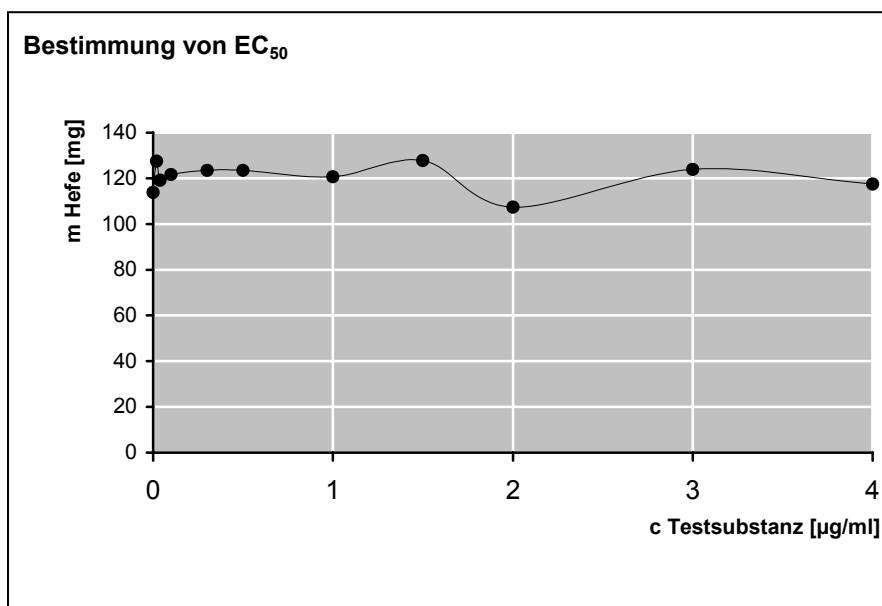
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.12 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit DR-116

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1938K1 1939K2	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969
DR-116 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	113.8	127.5	119.1	121.7	123.5	123.5	120.7	127.8	107.4	123.9	117.5

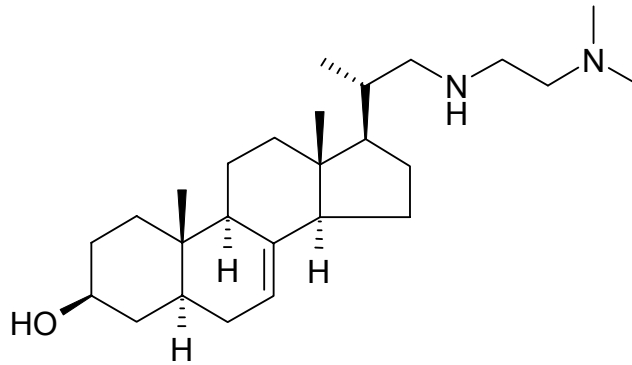


EC₅₀: > 4.0 µg/ml

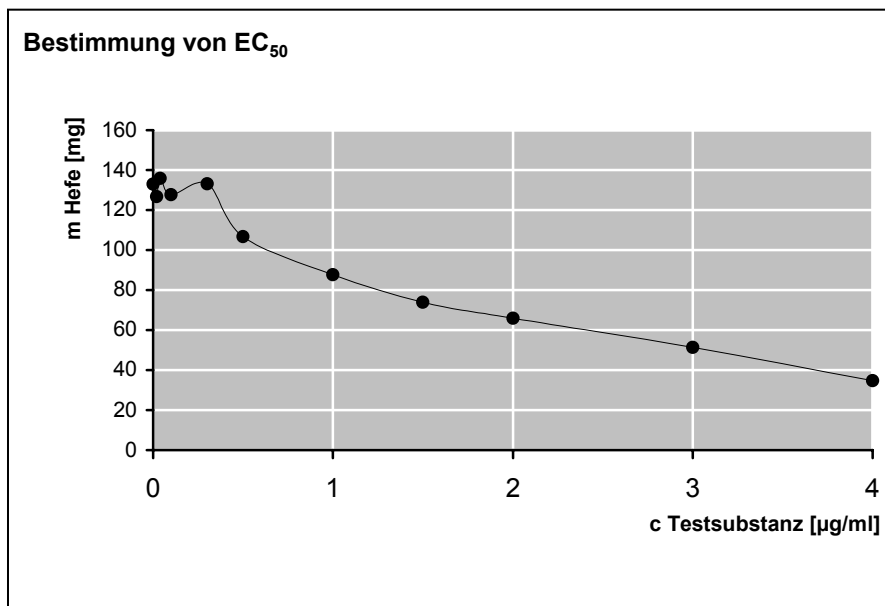
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.13 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit DR-132

Strukturformel:

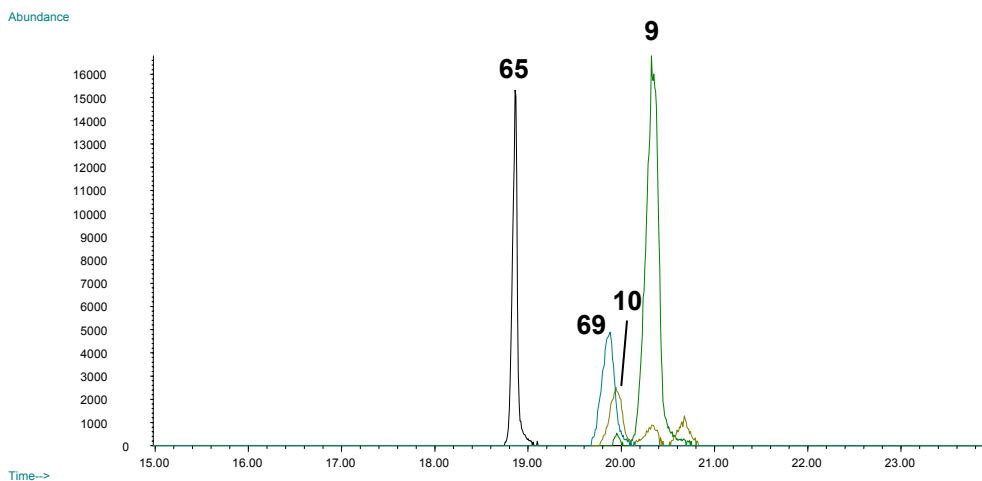


Y.l.	Ø 1970K1 1971K2	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991
DR-132 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	133.0	126.8	135.8	127.7	133.1	106.7	87.7	74.0	66.0	51.4	34.8



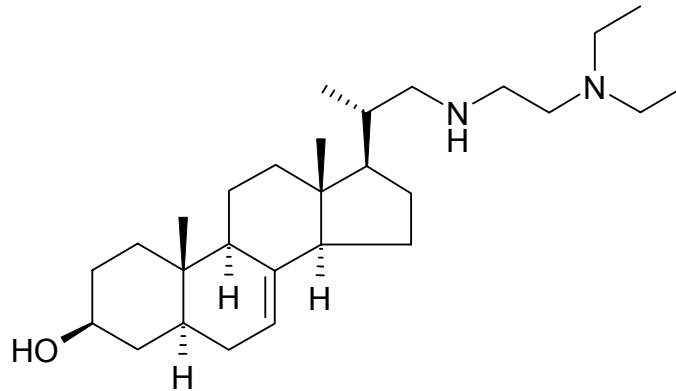
EC₅₀: ~ 1.8 µg/ml

Inhibitionstyp: C-24-Methyl-transferase

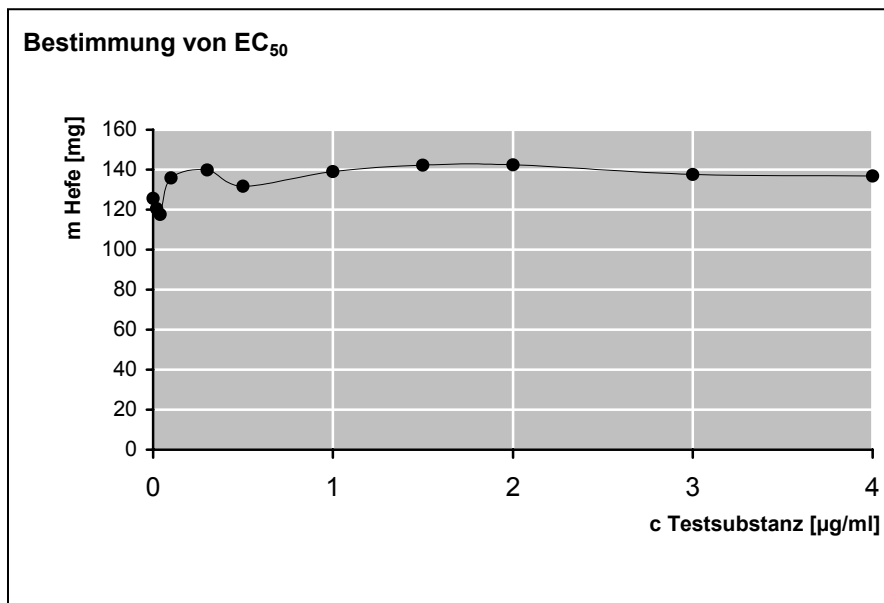


6.4.14 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit DR-133

Strukturformel:



Y.l.	∅ 2002K1 2003K2	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033
DR-133 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	125.6	120.5	117.6	135.8	139.8	131.7	139.1	142.2	142.4	137.6	136.8

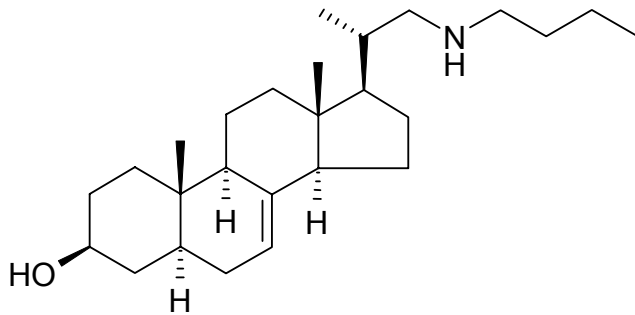


EC₅₀: > 4.0 µg/ml

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

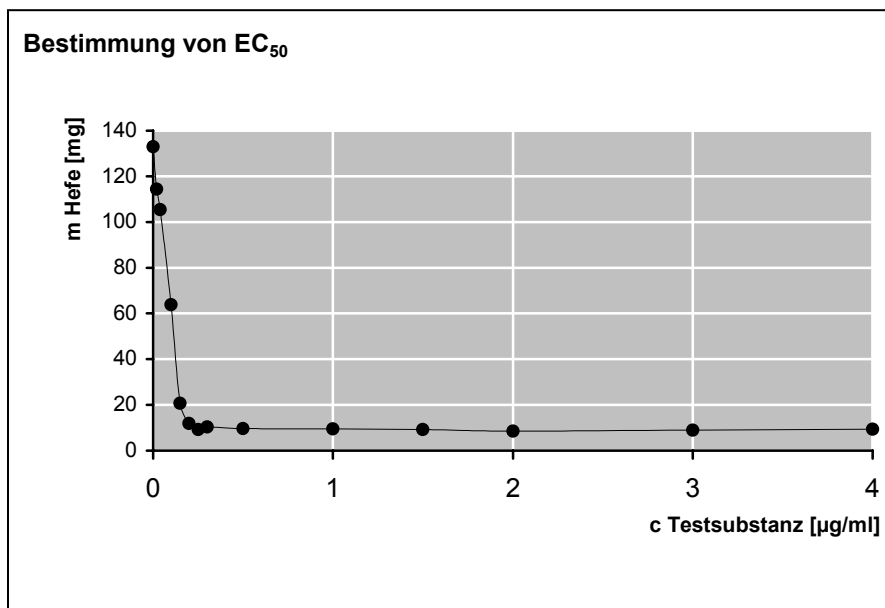
6.4.15 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit DR-137

Strukturformel:

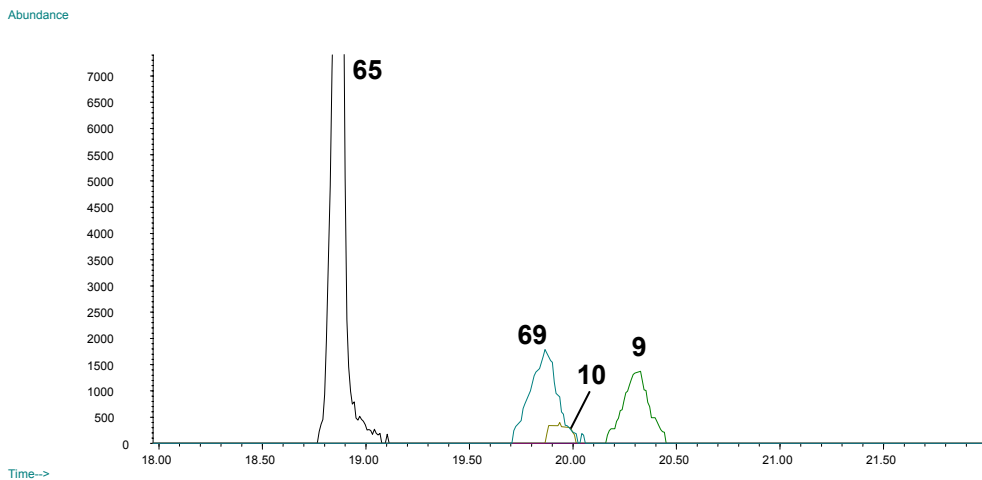


Y.I.	2015	2016	2017
DR 137 [$\mu\text{g/ml}$]	0.15	0.20	0.25
Trockengewicht [mg]	20.7	11.9	9.2

Y.I.	\emptyset 1970K1 1971K2	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981
DR-137 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	133.0	114.4	105.4	63.8	10.3	9.6	9.5	9.3	8.5	9.0	9.4

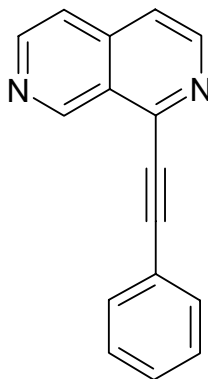


EC₅₀: ~ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ Inhibitionstyp: C-24-Methyl-transferase

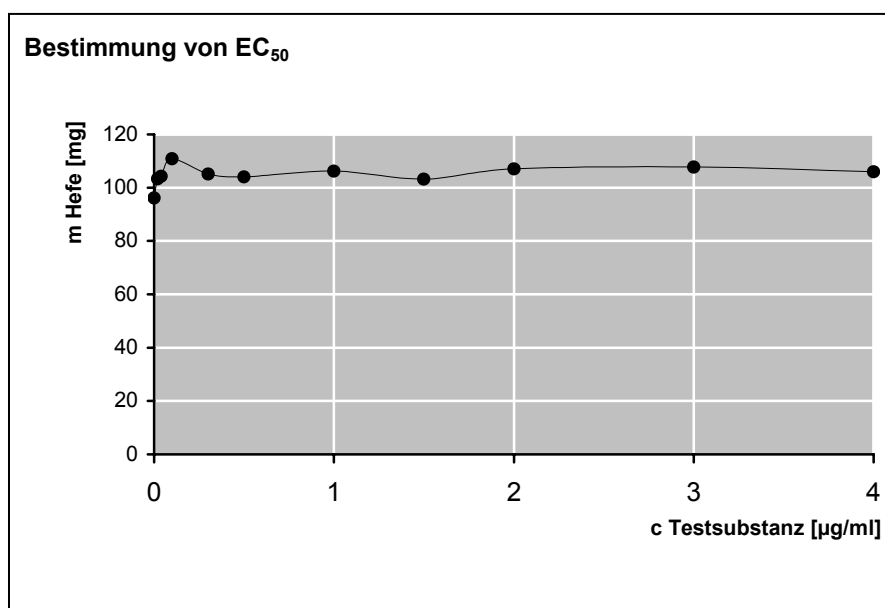


6.4.16 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit EK-12

Strukturformel:



Y.l.	∅ 815K1 816K2	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846
EK-12 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	96.1	103.3	104.3	110.9	105.1	104.0	106.2	103.2	107.1	107.7	105.9

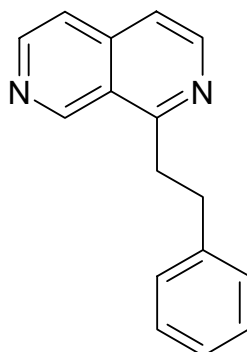


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

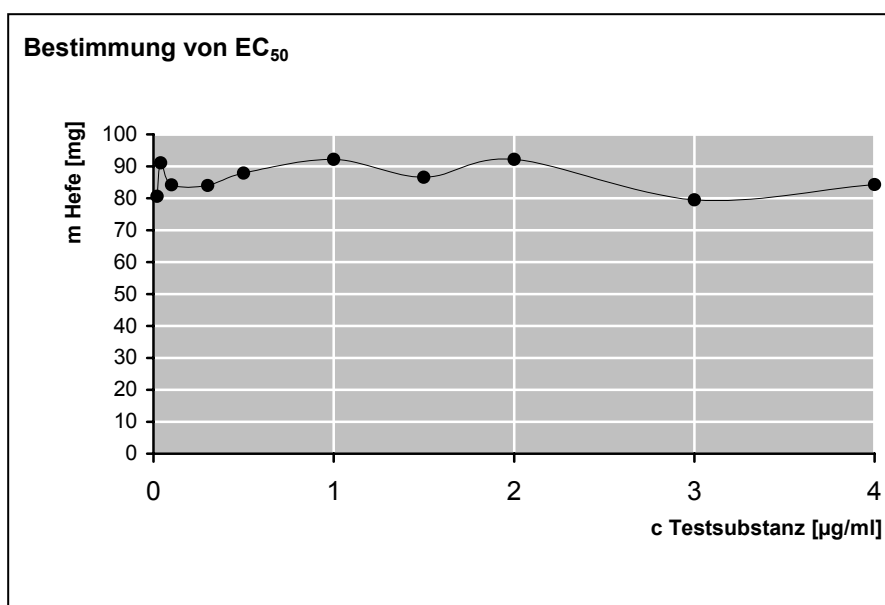
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.17 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit EK-13

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1287K1 1288K2	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298
EK-13 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		80.6	91.1	84.2	84.0	87.9	92.2	86.6	92.2	79.5	84.3

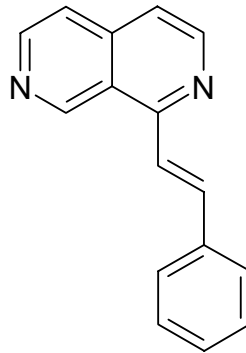


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

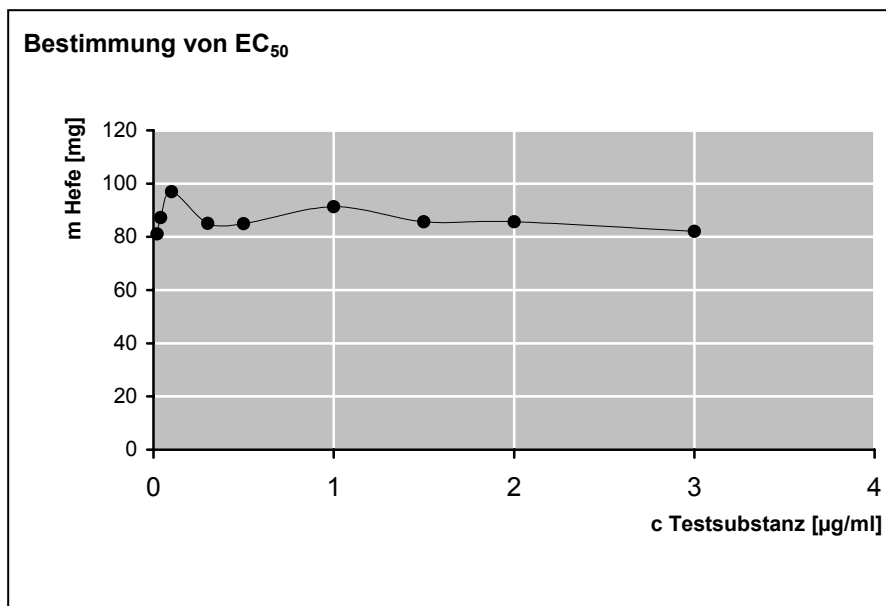
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.18 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit EK-14E

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1287K1 1288K2	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308
EK-14E [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		81.1	87.3	97.0	85.1	85.0	91.3	85.7	85.7	82.1	

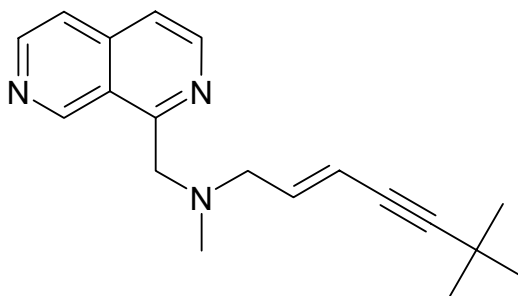


EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

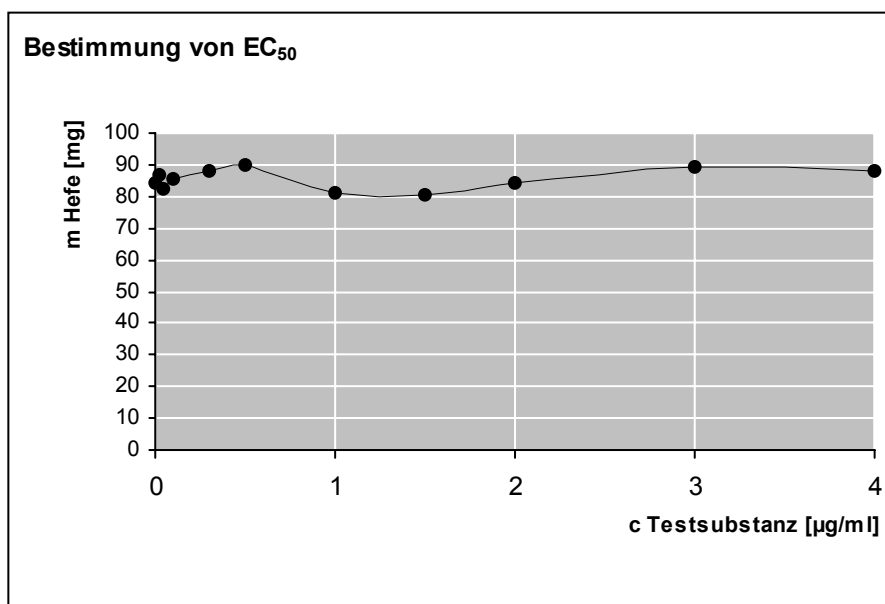
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.19 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit EK-49

Strukturformel:



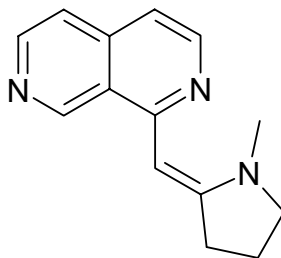
Y.l.	∅ 1342K1 1343K2	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353
EK-49 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	84.5	86.6	82.4	85.3	88.2	89.9	81.0	80.2	84.0	89.3	87.9

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

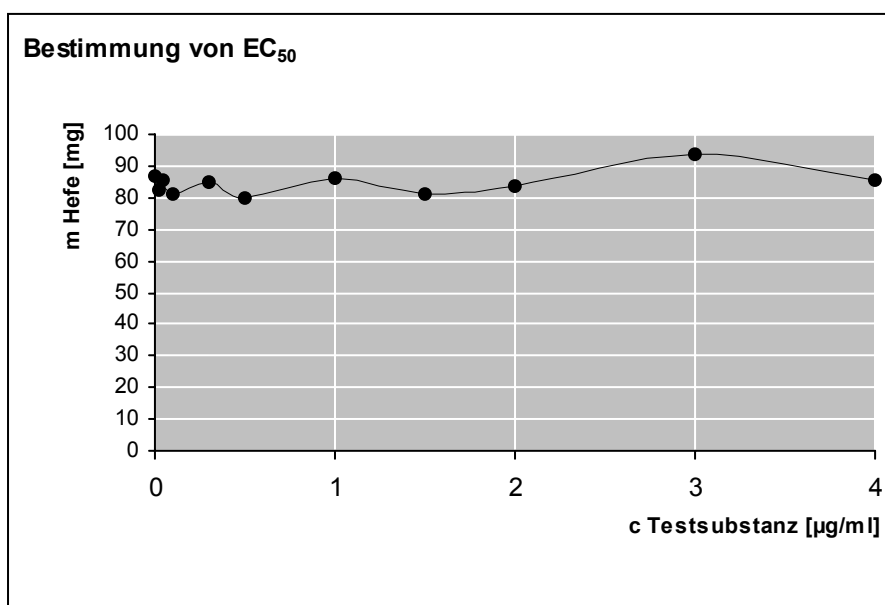
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.20 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit EK-53

Strukturformel:



Y.I.	∅ 1374K1 1375K2	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395
EK-53 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	86.6	82.1	85.8	81.1	84.9	80.1	86.2	81.0	83.9	94.0	85.8

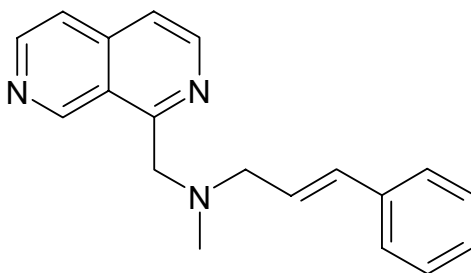


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

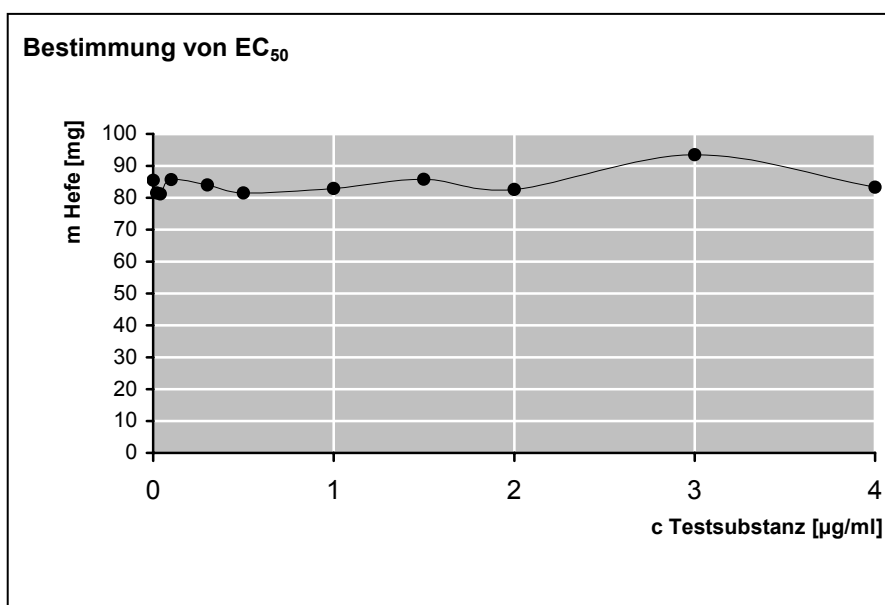
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.21 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit EK-62

Strukturformel:



Y.I.	∅ 1342K1 1343K2	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353
EK-62 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	84.5	81.5	81.2	85.7	84.0	81.5	82.9	85.8	82.6	93.5	83.3

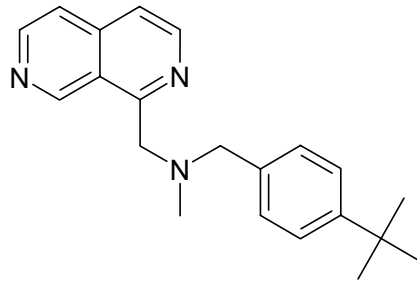


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

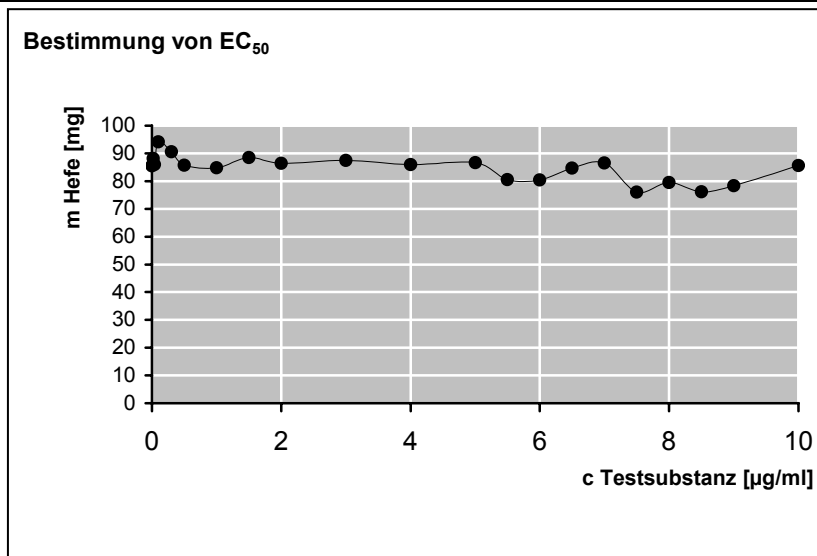
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.22 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit EK-65

Strukturformel:

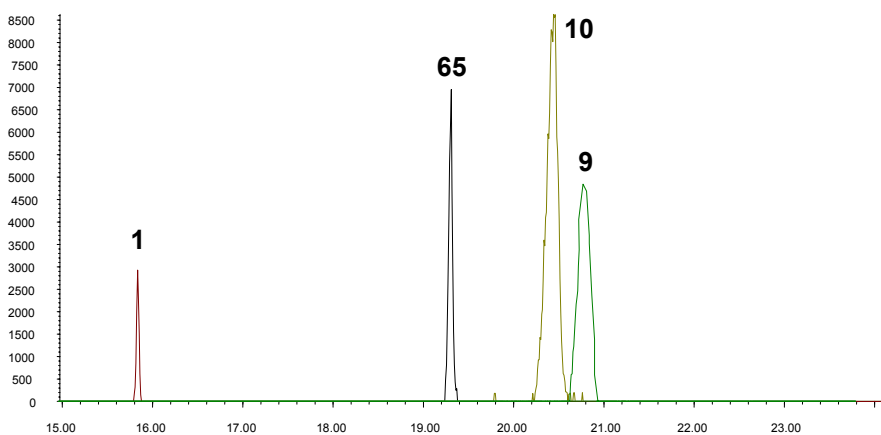


Y.l.	∅ 1342K1 1343K2	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363
EK-65 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	84.5	88.2	86.0	94.1	90.6	85.7	84.8	88.5	86.4	87.5	86.0
Y.l.	∅ 1374K1 1375K2	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385
EK-65 [µg/ml]	0.00	5.00	5.50	6.00	6.50	7.00	7.50	8.00	8.50	9.00	10.00
Trockengewicht [mg]	86.6	86.6	80.5	80.4	84.7	86.5	76.1	79.5	76.2	78.4	85.6

EC₅₀: > 4.0 µg/ml

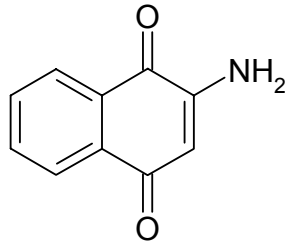
Inhibitionstyp: Squalenepoxidase-Inhibitor

Abundance

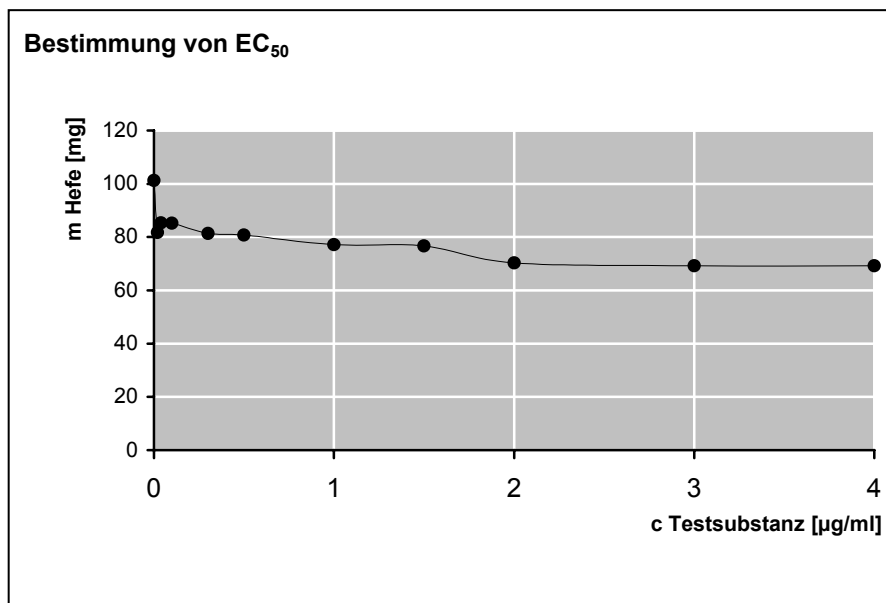


6.4.23 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit FD-8

Strukturformel:



Y.l.	∅	K1 K2	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002
FD-8 [µg/ml]		0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		97.9	81.7	85.3	85.2	81.4	80.8	77.2	76.7	70.3	69.3	69.3

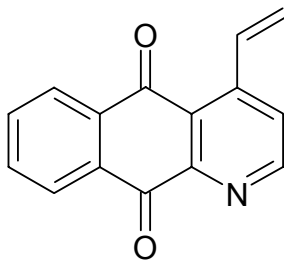


EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

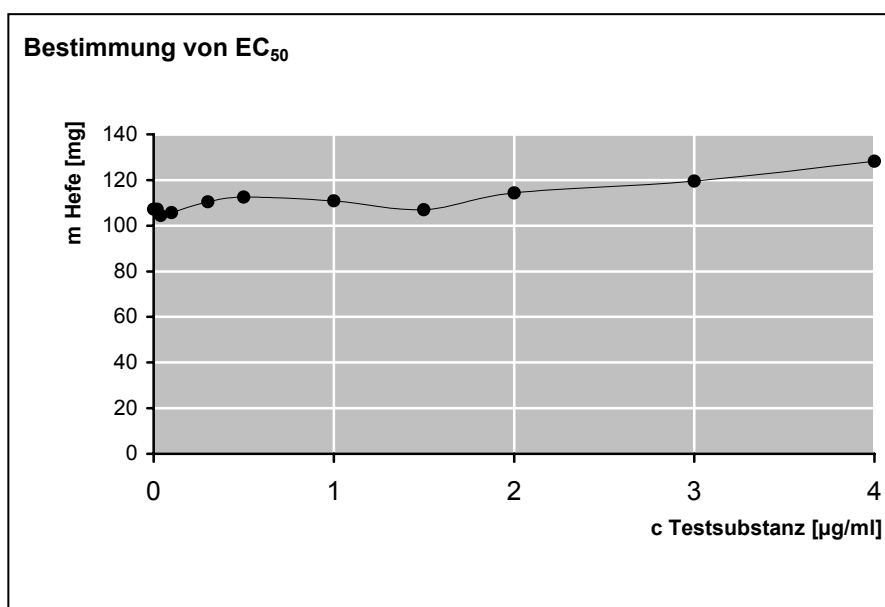
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.24 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit FD-36

Strukturformel:



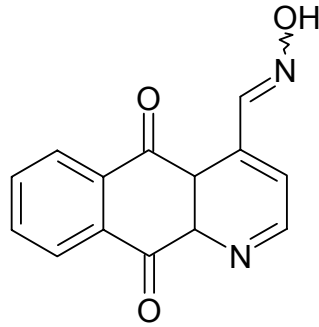
Y.l.	∅ 847K1 848K2	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878
FD-36 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	107.3	107.3	104.5	105.7	110.5	112.6	110.9	107.0	114.4	119.5	128.2

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

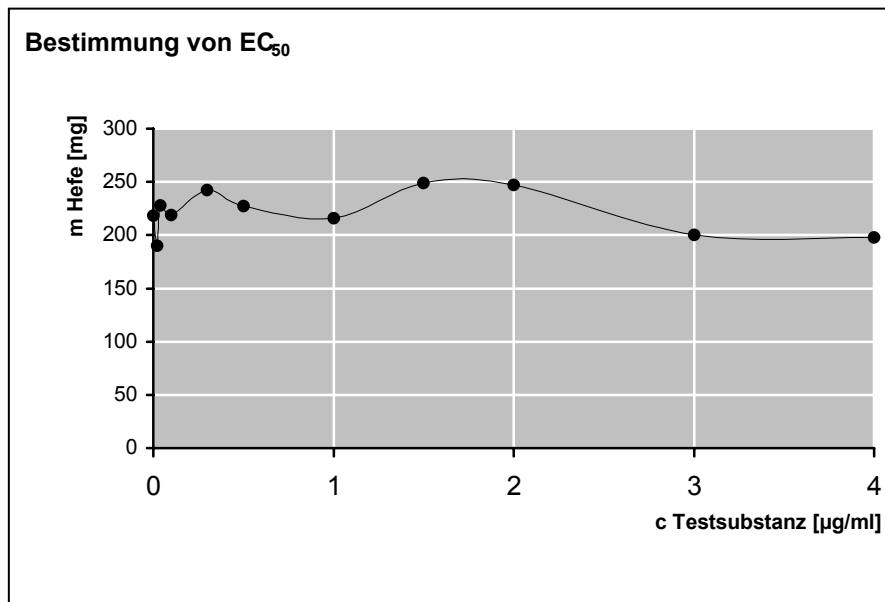
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.25 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit FD-52

Strukturformel:



Y.l.	Ø 783K1 784K2	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804
FD-52 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	218.5	190.0	228.0	219.0	242.0	227.0	216.0	249.0	247.0	200.0	198.0

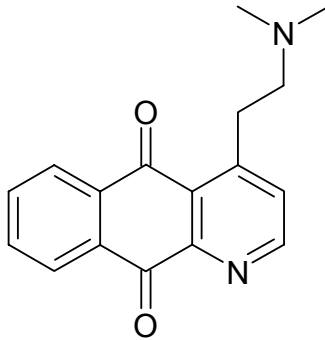


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

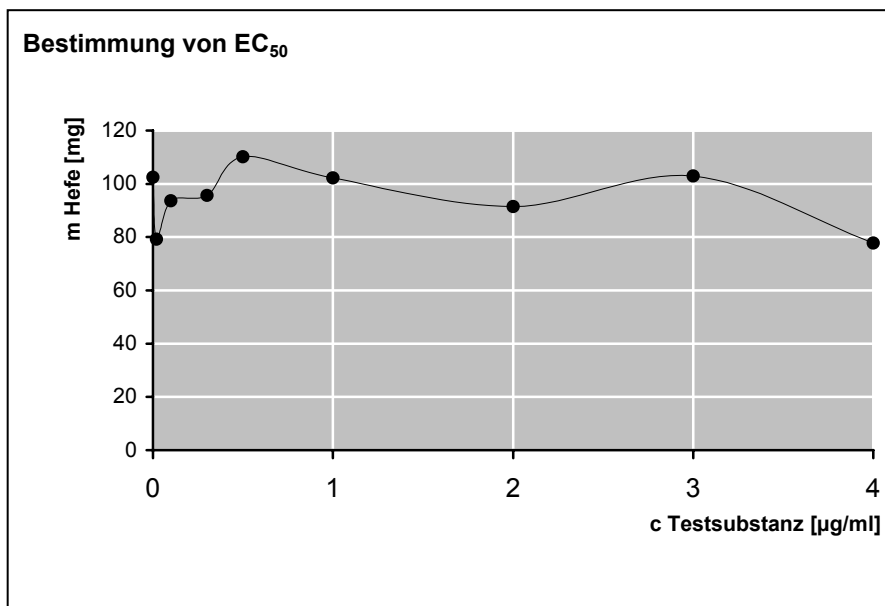
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.26 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit FD-68

Strukturformel:



Y.l.	∅	K1										
		K2										
FD-68 [µg/ml]		0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		102.5	79.2	17.5	93.6	95.6	110.2	102.2	41.7	91.5	103.0	77.7

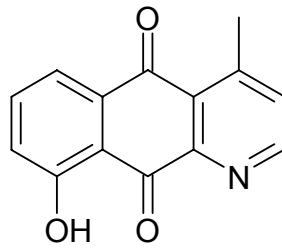


EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

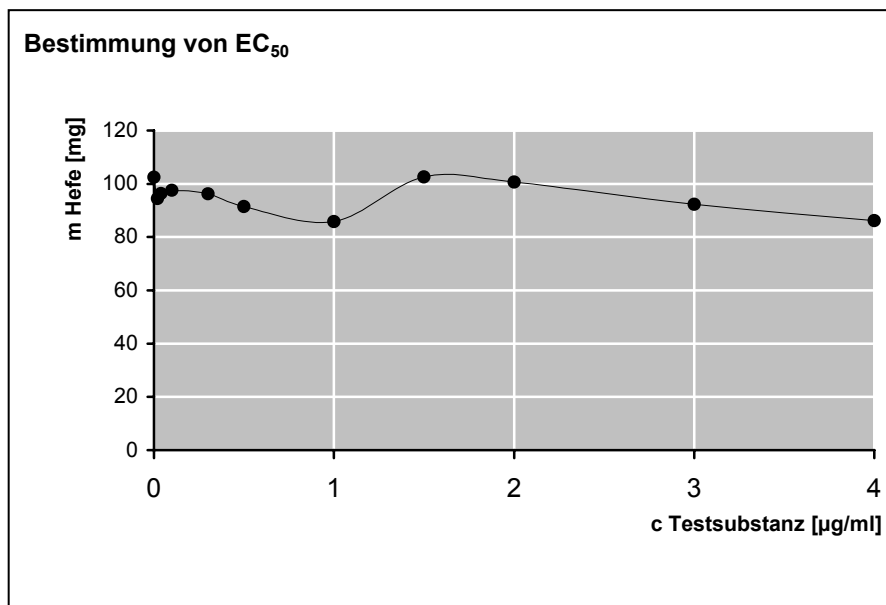
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.27 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit FD-69

Strukturformel:



Y.l.	∅	K1										
		K2										
FD-69 [µg/ml]		0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		102.5	94.5	96.4	97.5	96.2	91.4	85.8	102.6	100.7	92.3	86.2

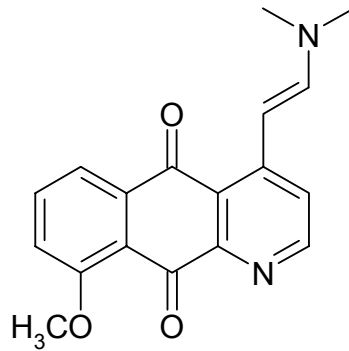


EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

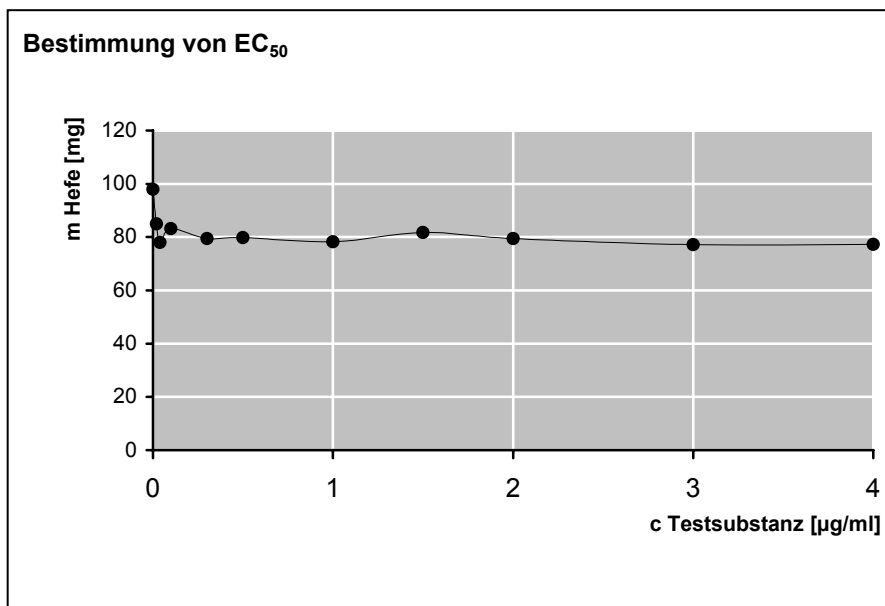
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.28 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit FD-72

Strukturformel:



Y.l.	∅	K1										
		K2										
FD-72 [µg/ml]		0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		97.9	84.9	78.0	83.2	79.4	79.8	78.2	81.7	79.4	77.2	77.3

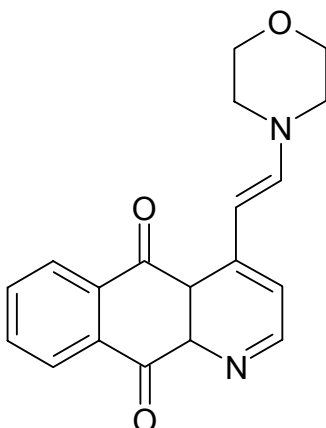


EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

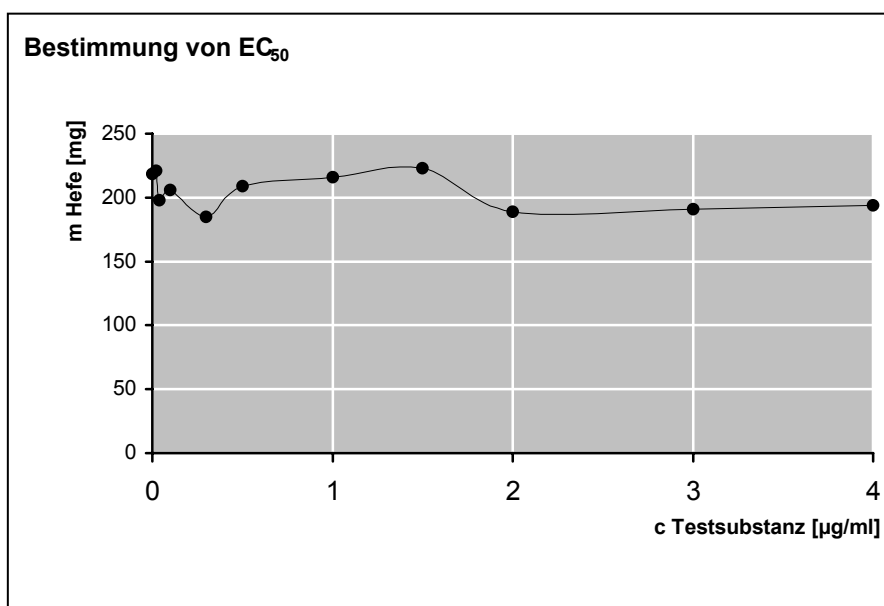
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.29 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit FD-74

Strukturformel:



Y.I.	∅ 783K1 784K2	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814
FD-74 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	218.5	221.0	198.0	206.0	185.0	209.0	216.0	223.0	189.0	191.0	194.0

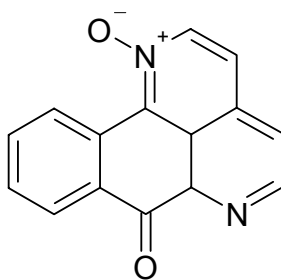


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

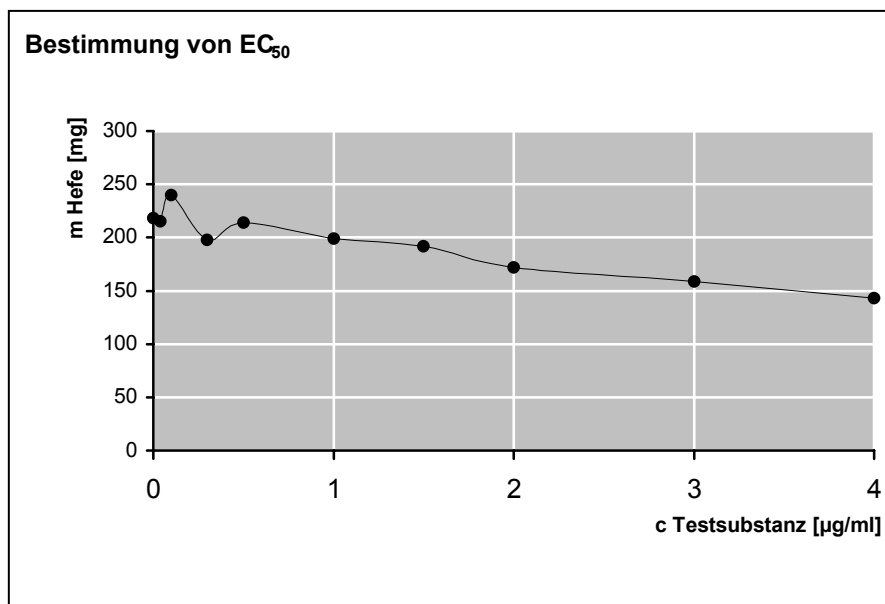
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.30 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit FD-78

Strukturformel:



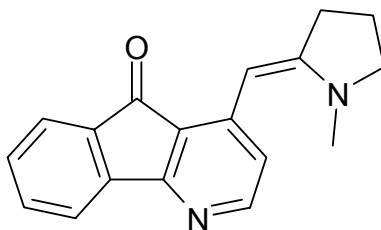
Y.l.	∅ 783K1 784K2	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794
FD-78 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	218.5	106.0	215.0	240.0	198.0	214.0	199.0	192.0	172.0	159.0	143.0

EC₅₀: > 4.0 µg/ml

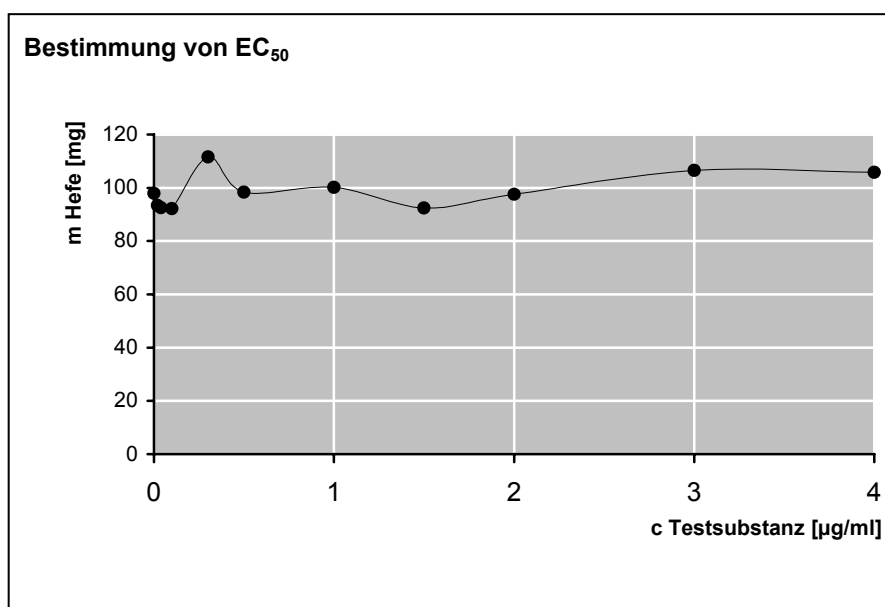
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.31 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit FD-103

Strukturformel:



Y.l.	∅	K1 K2	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012
FD-103 [$\mu\text{g/ml}$]		0.00	0.02	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00
Trockengewicht [mg]		97.9	93.4	92.5	92.2	111.6	98.4	100.2	92.4	97.6	106.6	105.8

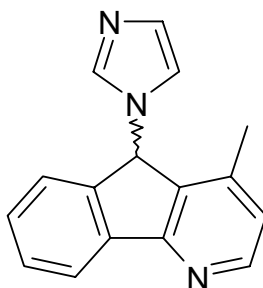


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

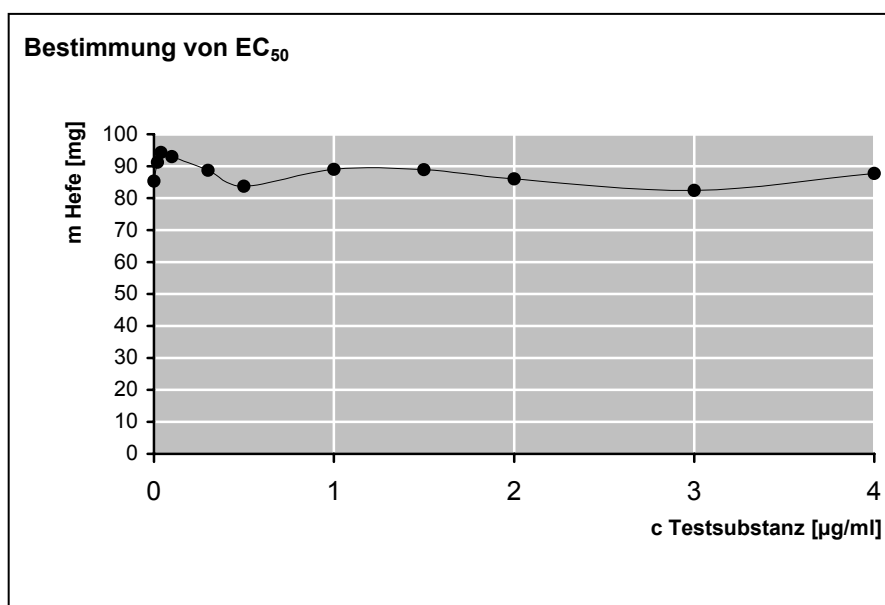
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.32 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit FD-109

Strukturformel:



Y.I.	∅ 1165K1 1166K2	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176
FD-109 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	87.3	88.8	89.7	88.8	90.0	84.0	84.1	84.9	86.2	93.8	87.2

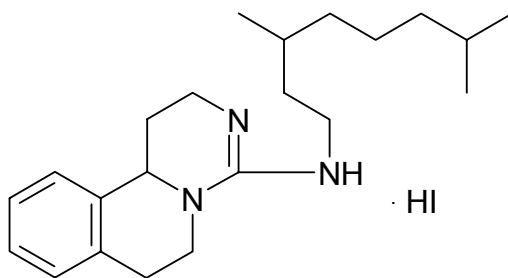


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

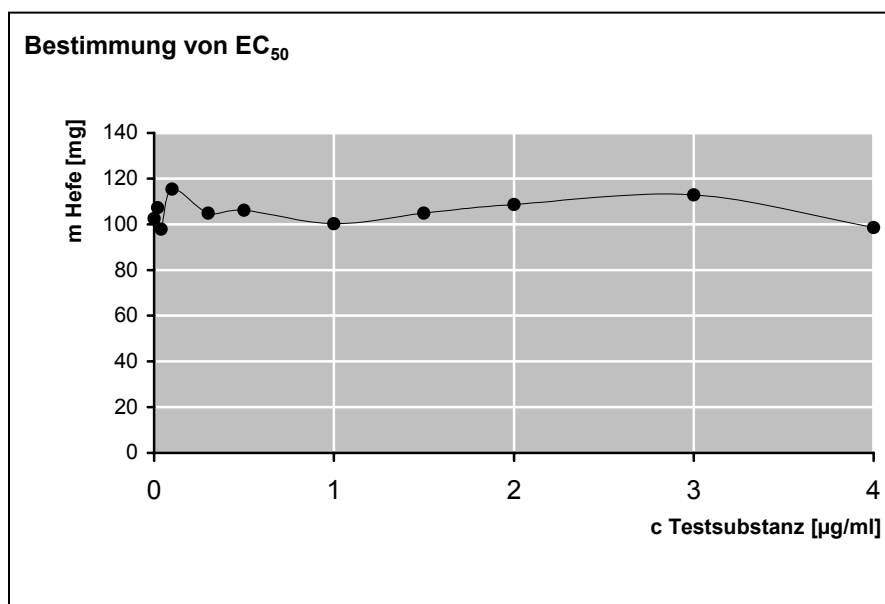
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.33 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GEP 159

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1753K1 1754K2	1743	1744	1745	1746	1747	1748	1749	1750	1751	1752
GEP 159 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	102.5	107.2	97.8	115.3	104.9	106.1	100.3	104.8	108.7	112.8	98.5

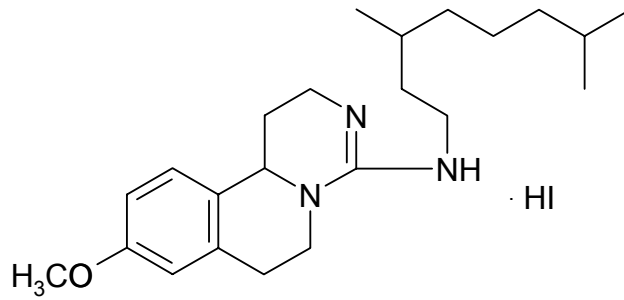


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

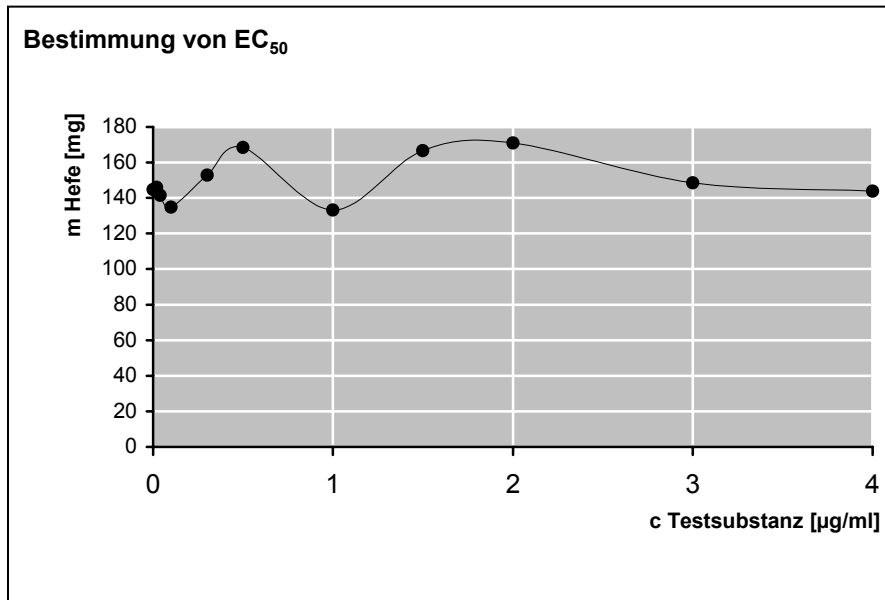
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.34 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GEP 330

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1755K1 1756K2	1757	1758	1759	1760	1761	1762	1763	1764	1765	1766
GEP 330 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	144.8	146.0	141.4	134.9	152.9	168.4	133.2	166.6	171.0	148.5	143.8

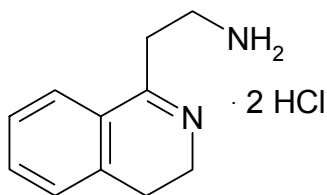


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

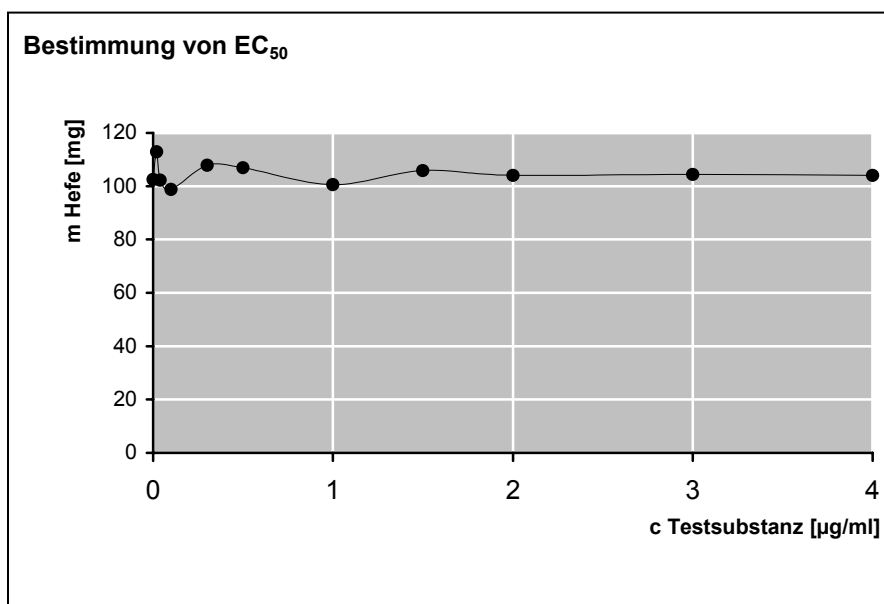
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.35 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GEP 425

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1753K1 1754K2	1733	1734	1735	1736	1737	1738	1739	1740	1741	1742
GEP 425 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	102.5	112.9	102.2	98.7	107.9	106.9	100.6	105.8	104.0	104.4	104.1

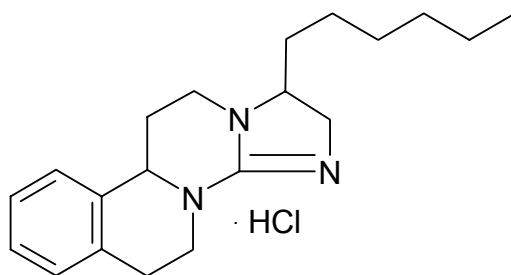


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

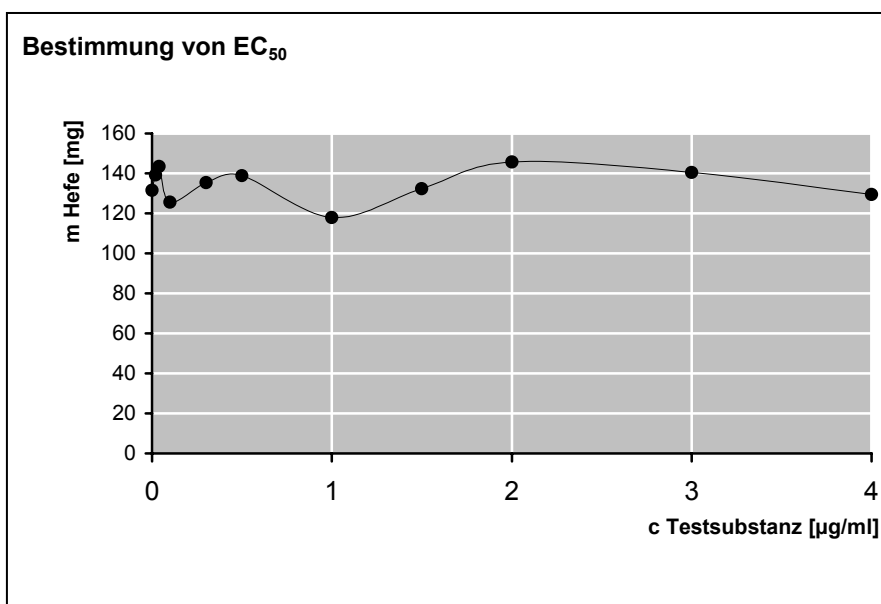
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.36 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GEP 469

Strukturformel:



Y.I.	∅ 1789K1 1790K2	1791	1792	1793	1794	1795	1796	1797	1798	1799	1800
GEP 469 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	131.6	139.2	143.6	125.6	135.4	138.8	118.0	132.3	145.7	140.5	129.4

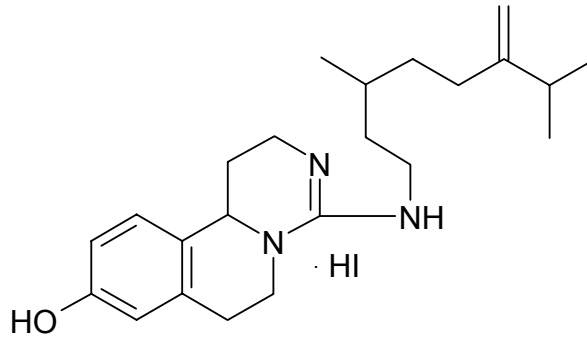


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

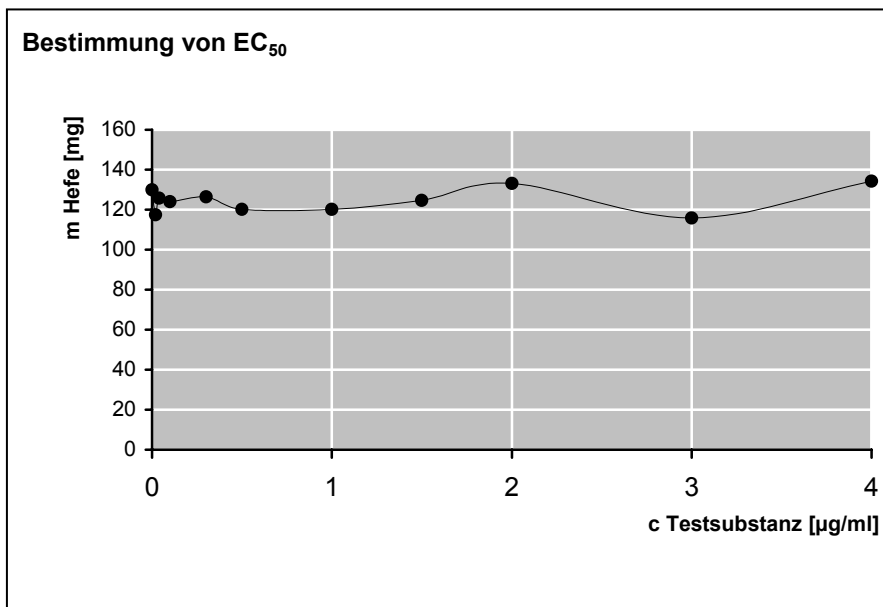
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.37 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GEP 489

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1777K1 1778K2	1779	1780	1781	1782	1783	1784	1785	1786	1787	1788
GEP 489 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	130.0	117.4	125.8	124.0	126.4	120.2	120.1	124.7	133.2	115.8	134.2

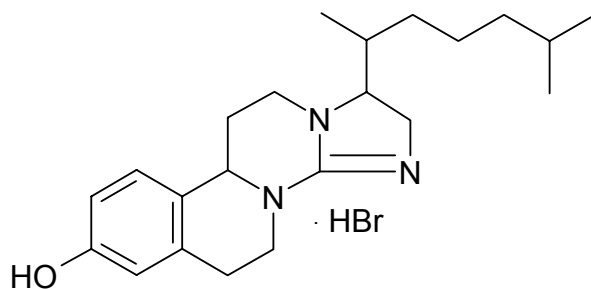


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

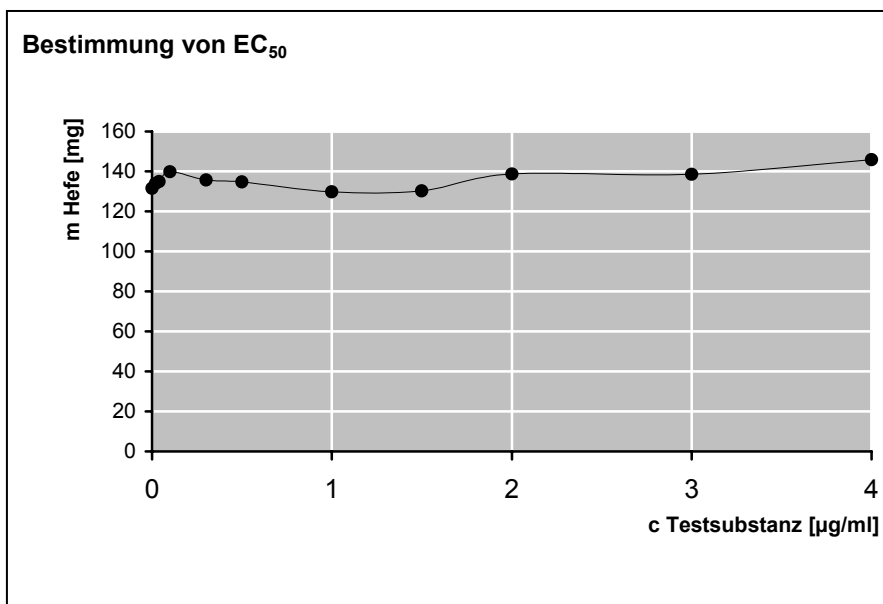
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.38 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GEP 500

Strukturformel:



Y.I.	∅ 1789K1 1790K2	1811	1812	1813	1814	1815	1816	1817	1818	1819	1820
GEP 500 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	131.6	134.0	134.9	139.9	135.7	134.7	129.7	130.2	138.7	138.6	146.0

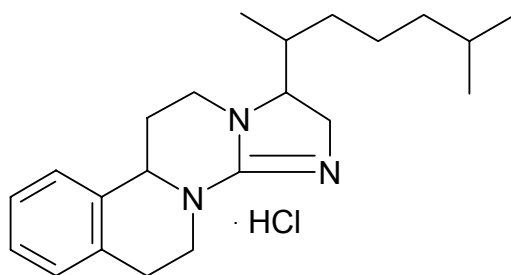


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

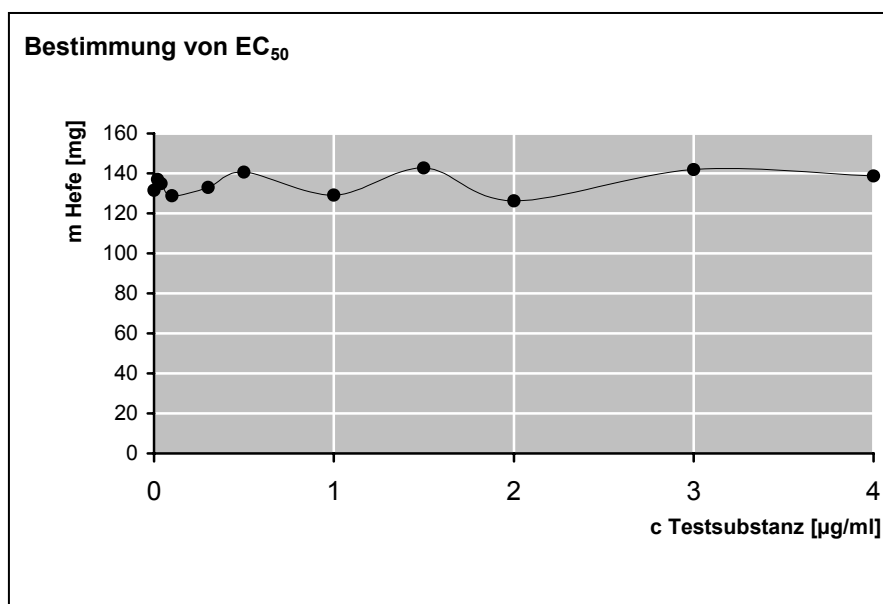
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.39 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GEP 501

Strukturformel:



Y.I.	∅ 1789K1 1790K2	1801	1802	1803	1804	1805	1806	1807	1808	1809	1810
GEP 501 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	131.6	137.2	134.8	128.8	132.9	140.7	129.1	142.7	126.2	142.0	138.7

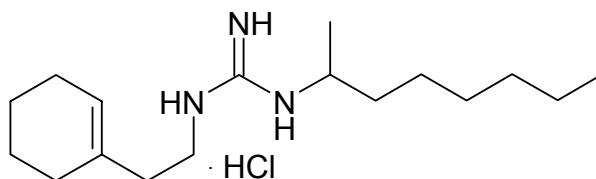


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

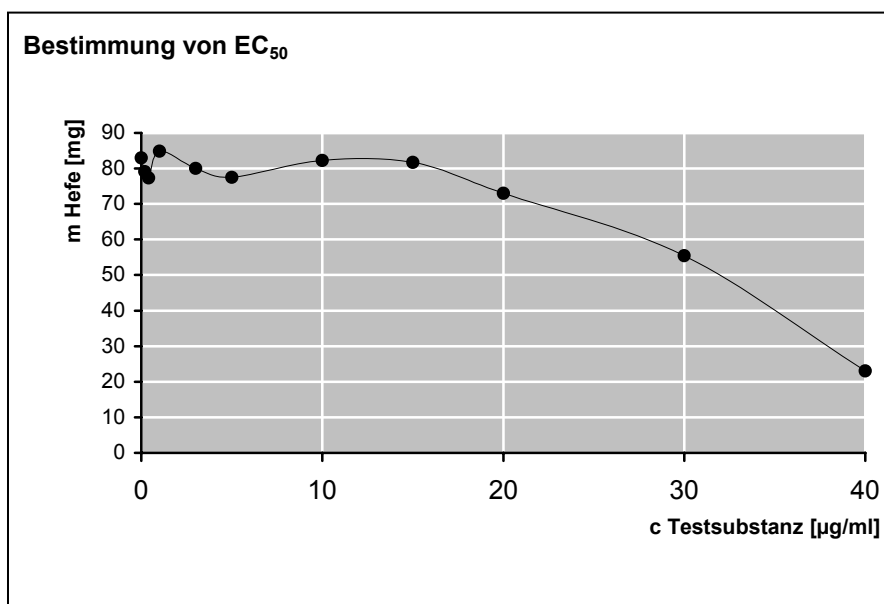
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.40 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GES 12

Strukturformel:



Y.I.	∅ 1625K1 1626K2	1637	1638	1639	1640	1641	1642	1643	1644	1645	1646
GES 12 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.20	0.40	1.00	3.00	5.00	10.00	15.00	20.00	30.00	40.00
Trockengewicht [mg]	83.0	79.1	77.3	84.9	80.0	77.5	82.3	81.7	73.0	55.4	23.0

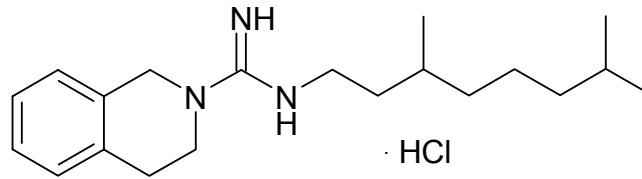


EC_{50} : ~ 35.0 $\mu\text{g/ml}$

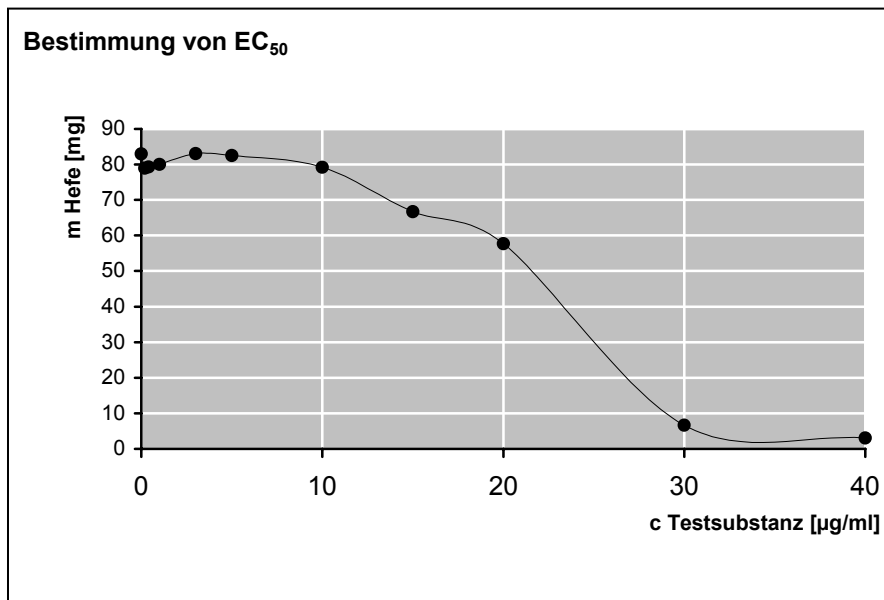
Inhibitionstyp: Kein SBI

6.4.41 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GES 16

Strukturformel:



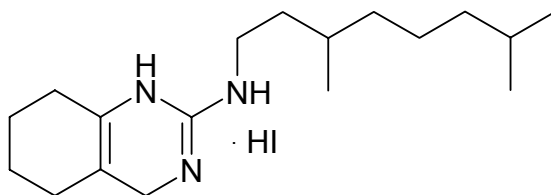
Y.l.	∅ 1625K1 1626K2	1647	1648	1649	1650	1651	1652	1653	1654	1655	1656
GES 16 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.20	0.40	1.00	3.00	5.00	10.00	15.00	20.00	30.00	40.00
Trockengewicht [mg]	83.0	78.9	79.3	80.0	83.1	82.5	79.2	66.7	57.7	6.7	3.1

 EC_{50} : ~ 23.0 $\mu\text{g/ml}$

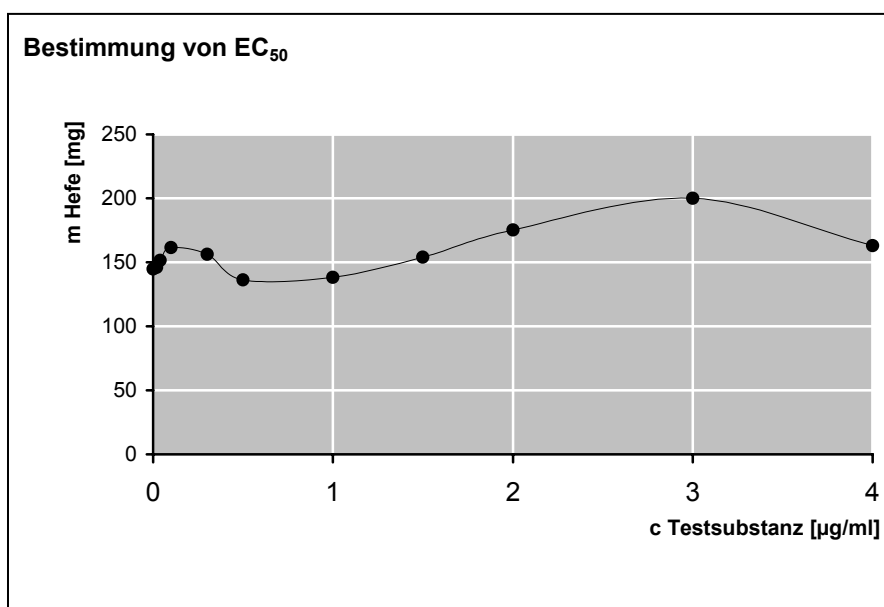
Inhibitionstyp: Kein SBI

6.4.42 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GET 19

Strukturformel:



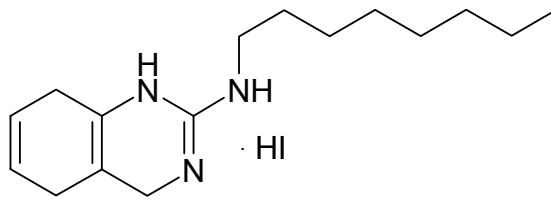
Y.l.	∅ 1755K1 1756K2	1767	1768	1769	1770	1771	1772	1773	1774	1775	1776
GET 19 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	144.8	146.0	151.4	161.5	156.2	136.2	138.3	154.0	175.3	200.1	163.1

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

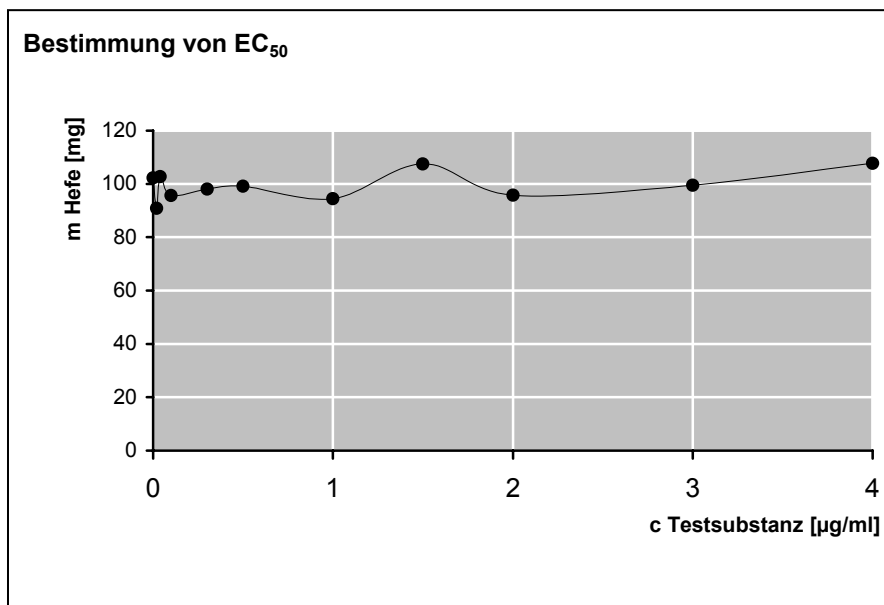
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.43 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GET 123

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1657K1 1658K2	1679	1680	1681	1682	1683	1684	1685	1686	1687	1688
GET 123 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	102.3	90.8	102.7	95.6	98.1	99.1	94.5	107.5	95.7	99.5	107.8

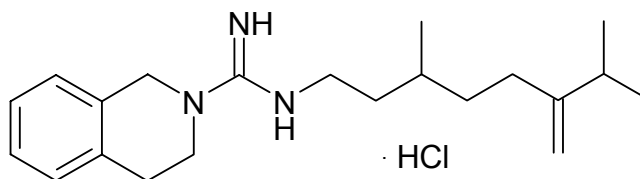


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

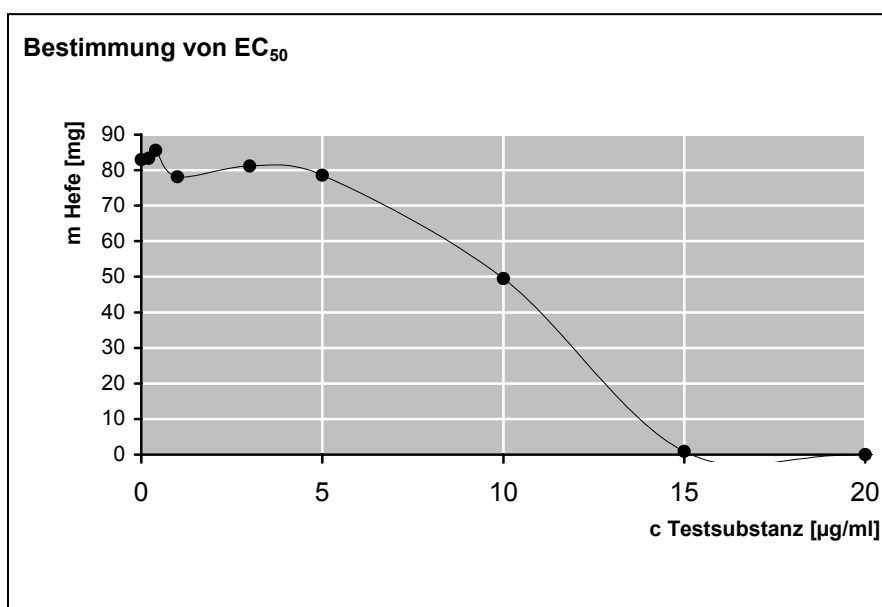
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.44 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GET 182

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1625K1 1626K2	1627	1628	1629	1630	1631	1632	1633	1634	1635	1636
GET 182 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.20	0.40	1.00	3.00	5.00	10.00	15.00	20.00	30.00	40.00
Trockengewicht [mg]	83.0	83.3	85.6	78.1	81.2	78.6	49.5	0.9	0.0	0.0	0.0

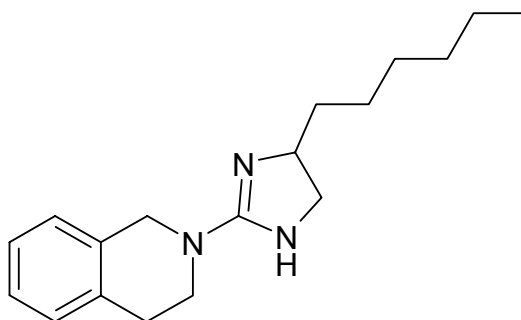


EC_{50} : ~ 11.0 $\mu\text{g/ml}$

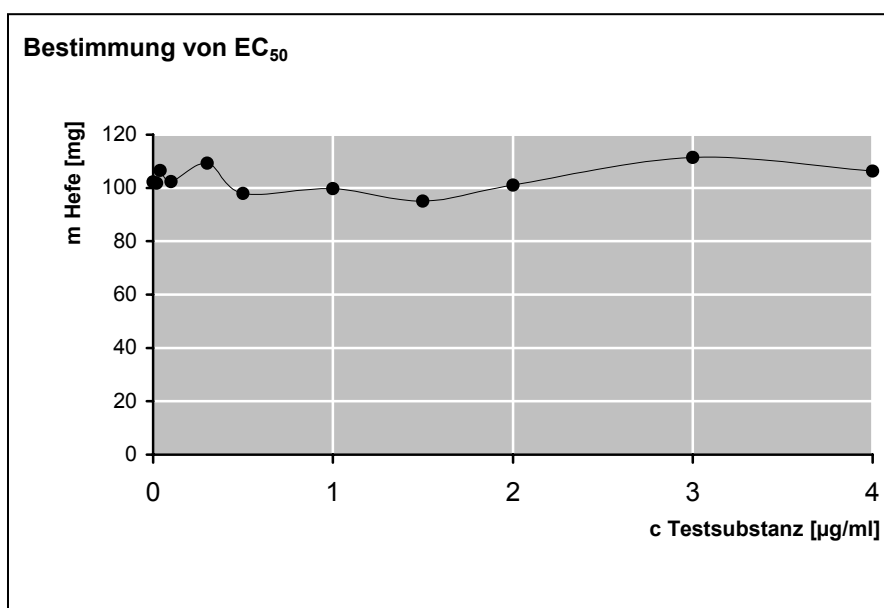
Inhibitionstyp: Kein SBI

6.4.45 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit GET 220

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1657K1 1658K2	1669	1670	1671	1672	1673	1674	1675	1676	1677	1678
GET 220 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	102.3	101.7	106.5	102.4	109.3	97.9	99.7	95.1	101.1	111.5	106.3

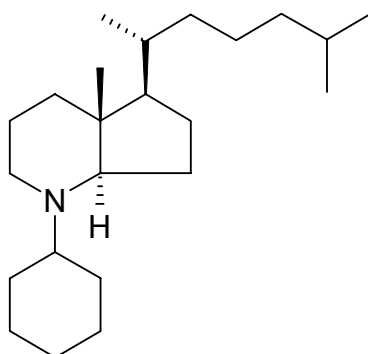


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

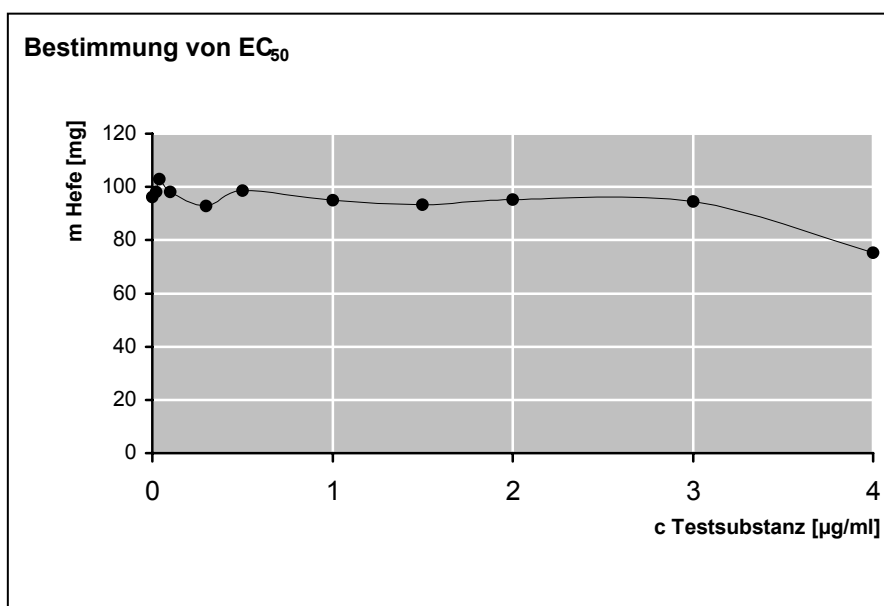
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.46 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit JCB-35

Strukturformel:



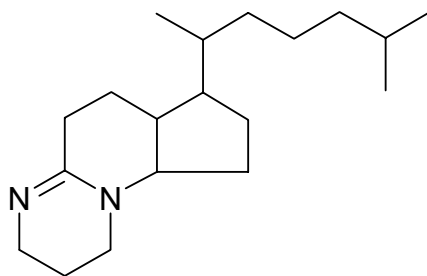
Y.l.	∅ 815K1 816K2	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836
JCB-35 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	96.1	98.1	103.0	98.1	92.8	98.6	95.1	93.3	95.2	94.4	75.3

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

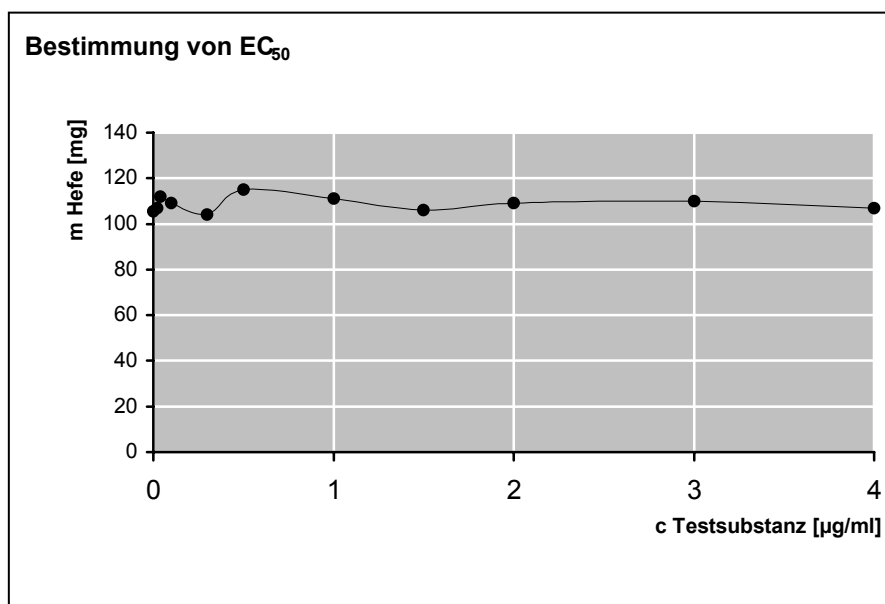
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.47 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit JCB-37

Strukturformel:



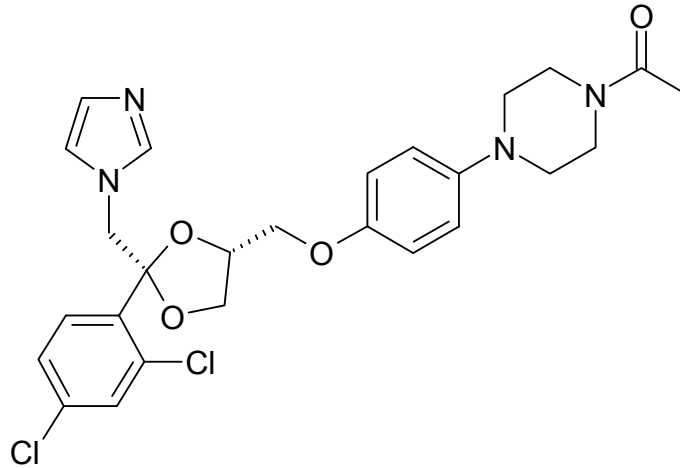
Y.l.	∅ 751K1 752K2	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782
JCB-37 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	105.5	111.0	116.0	107.0	108.0	114.0	115.0	107.0	114.0	100.0	81.0

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

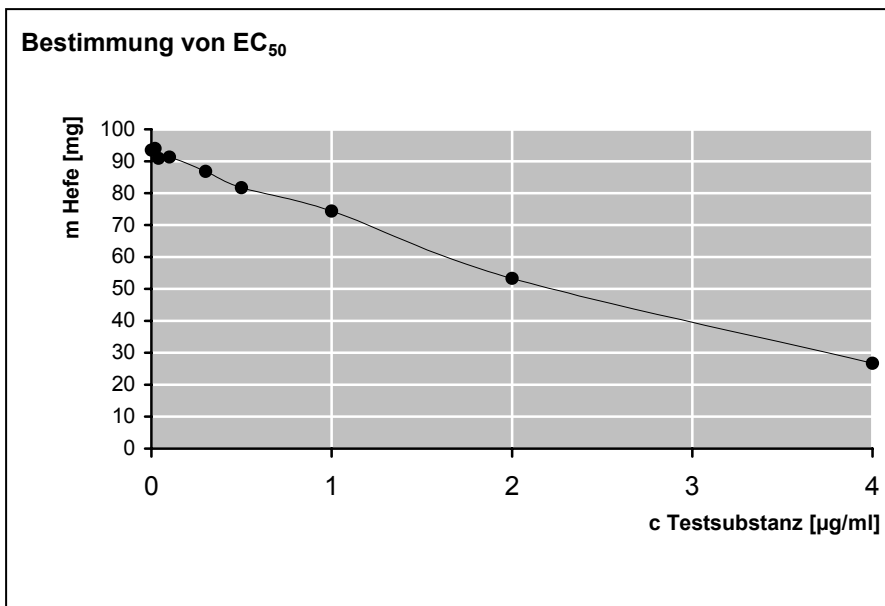
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.48 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit (-)-Ketoconazol

Strukturformel:

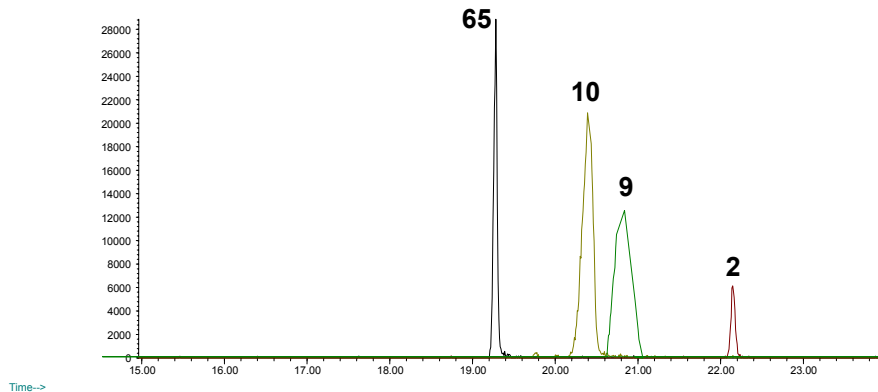


Y.l.	∅	1243K1 1244K2	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264
(-)-Ketoconazol [µg/ml]		0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		93.5	94.0	90.9	91.3	86.8	81.7	74.4	21.5	53.3	8.0	26.7



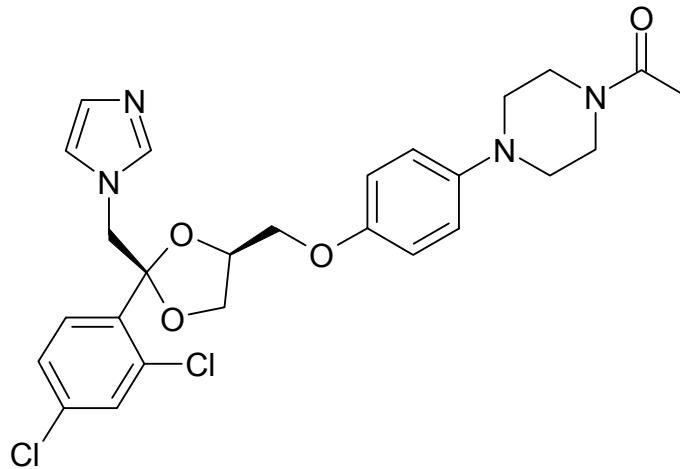
EC₅₀: ~ 2.6 µg/ml

Inhibitionstyp: Lanosterol-14 α -demethylase-Inhibitor

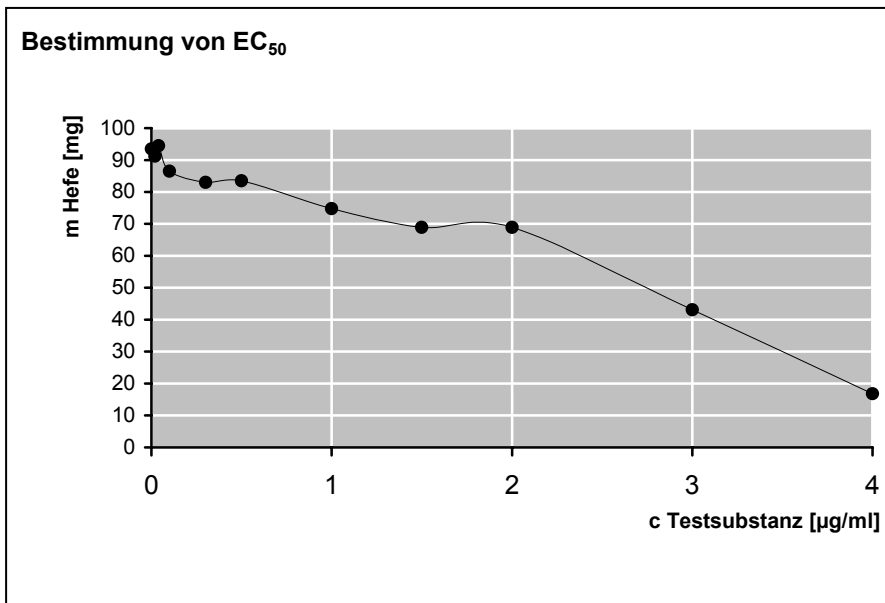


6.4.49 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit (+)-Ketoconazol

Strukturformel:

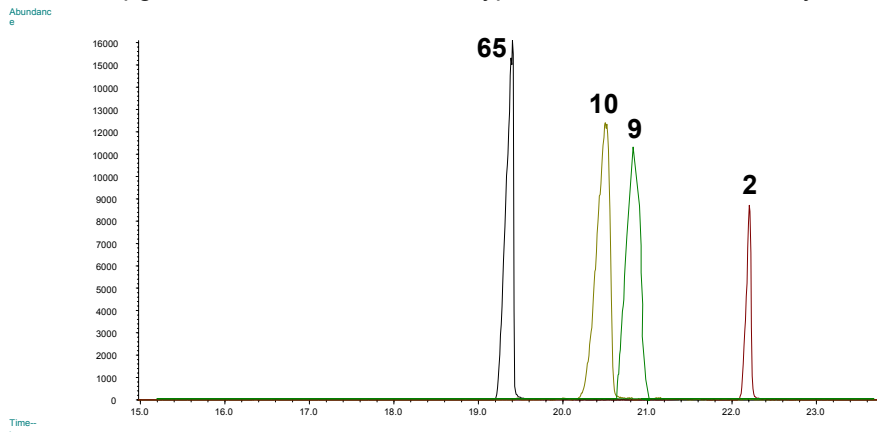


Y.I.	∅ 1243K1 1244K2	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254
(+)-Ketoconazol [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	93.5	91.2	94.5	86.5	83.0	83.5	74.8	68.9	68.9	43.1	16.8



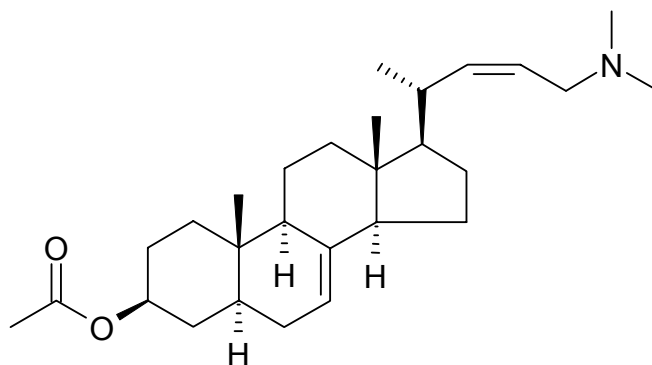
EC₅₀: ~ 2.9 µg/ml

Inhibitionstyp: Lanosterol-14α-demethylase-Inhibitor

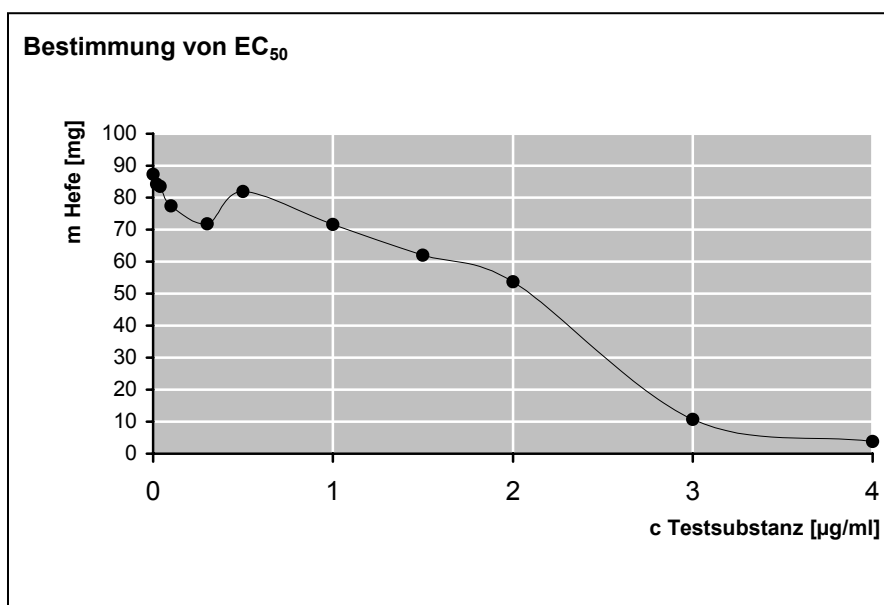


6.4.50 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-18

Strukturformel:

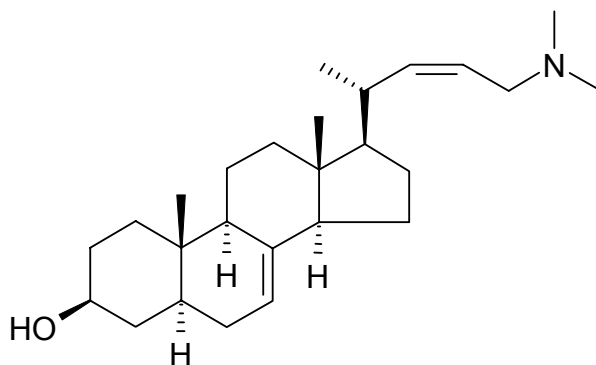


Y.l.	Ø 1539K1 1540K2	1541	1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550
MG-18 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	87.3	84.2	83.5	77.4	71.8	81.9	71.6	62.0	53.7	10.7	3.8

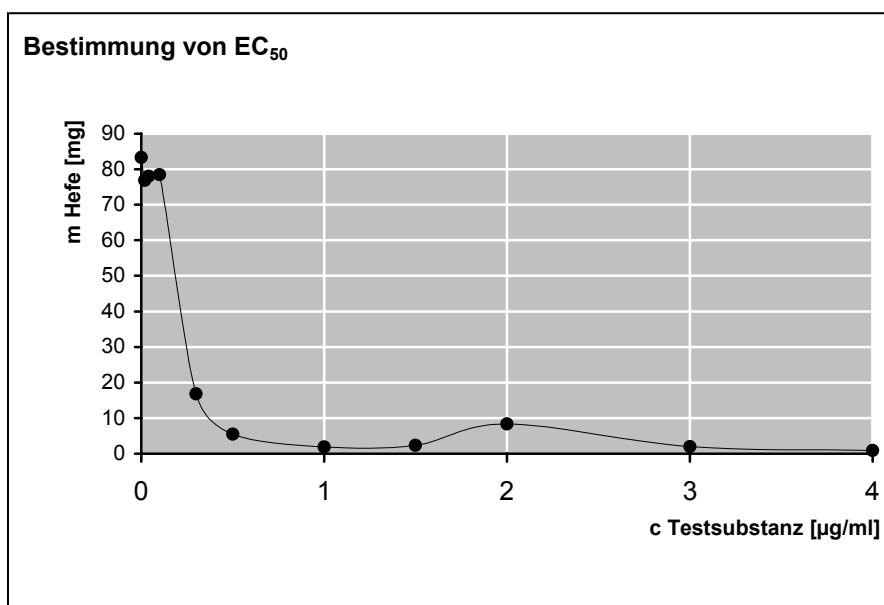
EC₅₀: ~ 2.2 $\mu\text{g/ml}$ Inhibitionstyp: C²⁴-Methyltransferase-Inhibitor

6.4.51 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-18H

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1460K1 1461K2	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492
MG-18H [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	83.3	76.9	78.0	78.5	16.8	5.5	1.9	2.3	8.4	2.0	0.9

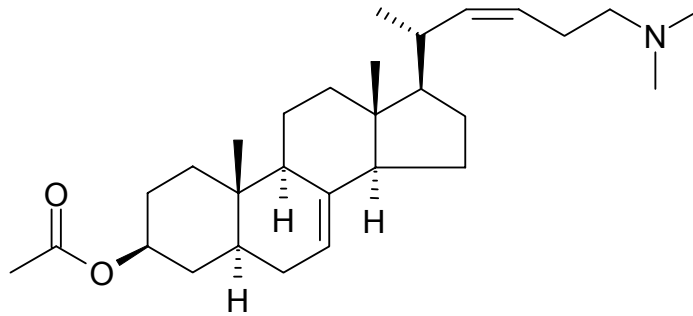


EC_{50} : ~ 0.2 $\mu\text{g/ml}$

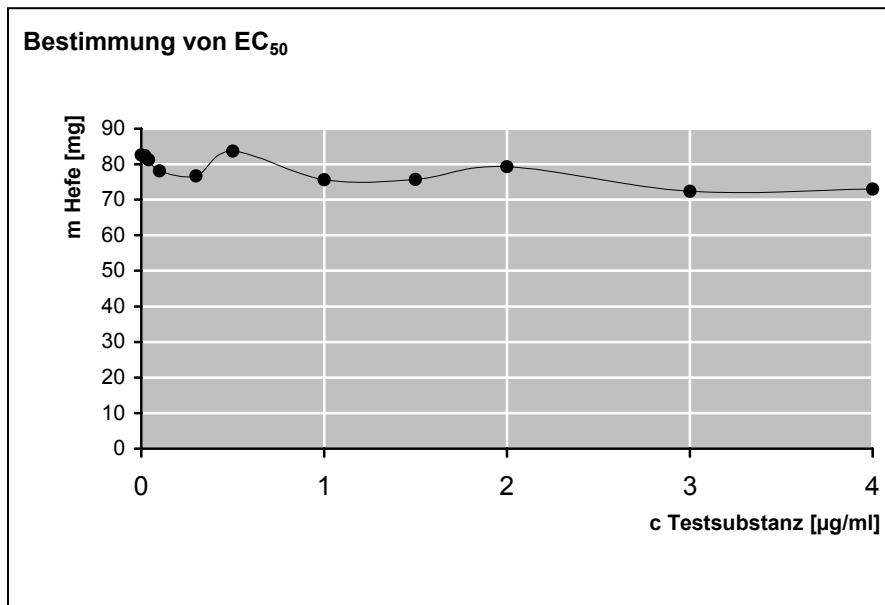
Inhibitionstyp: C^{24} -Methyltransferase-Inhibitor

6.4.52 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-22

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1593K1 1594K2	1615	1616	1617	1618	1619	1620	1621	1622	1623	1624
MG-22 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	82.6	82.4	81.3	78.1	76.7	83.7	75.6	75.7	79.3	72.4	73.0

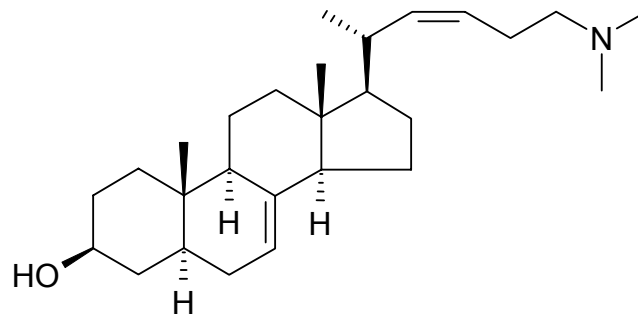


EC₅₀: ~ 0.4 $\mu\text{g/ml}$

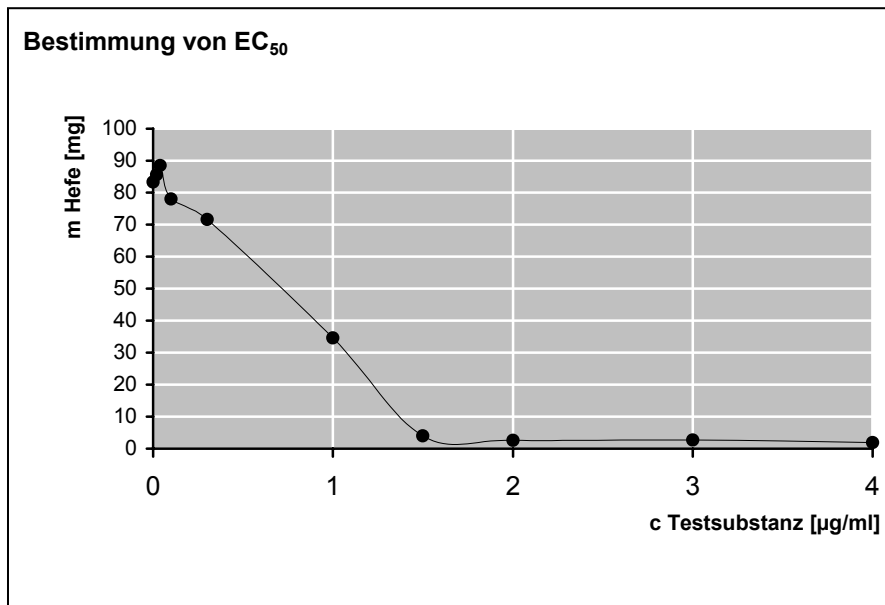
Inhibitionstyp: C²⁴-Methyltransferase-Inhibitor

6.4.53 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-22H

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1460K1 1461K2	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482
MG-22H [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	83.3	85.6	88.5	78.0	71.6		34.6	4.0	2.6	2.7	1.9

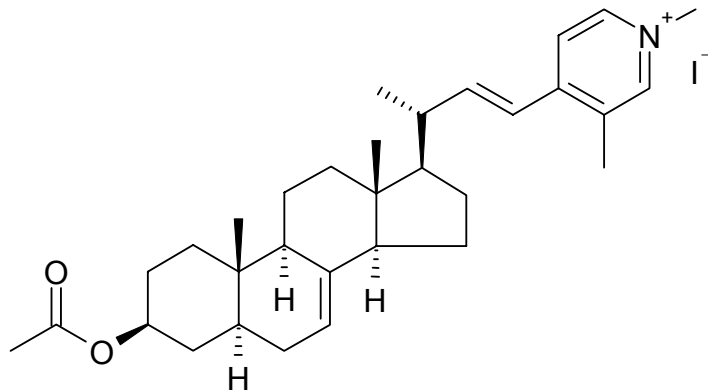


EC₅₀: ~ 0.8 $\mu\text{g/ml}$

Inhibitionstyp: C²⁴-Methyltransferase-Inhibitor

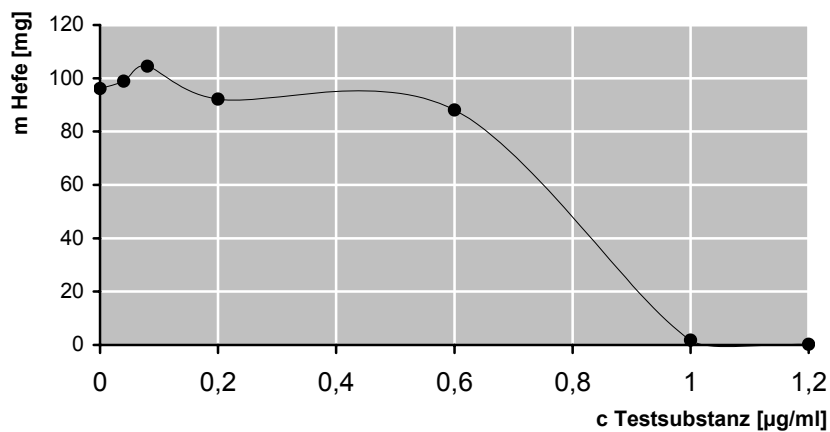
6.4.54 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG 34

Strukturformel:



Y.l.	Ø 847K1 848K2	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868
MG 34 [µg/ml]	0.00	0.04	0.08	0.20	0.60	1.00	2.00	3.00	4.00	6.00	8.00
Trockengewicht [mg]	107.3	98.9	104.5	92.2	88.1	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

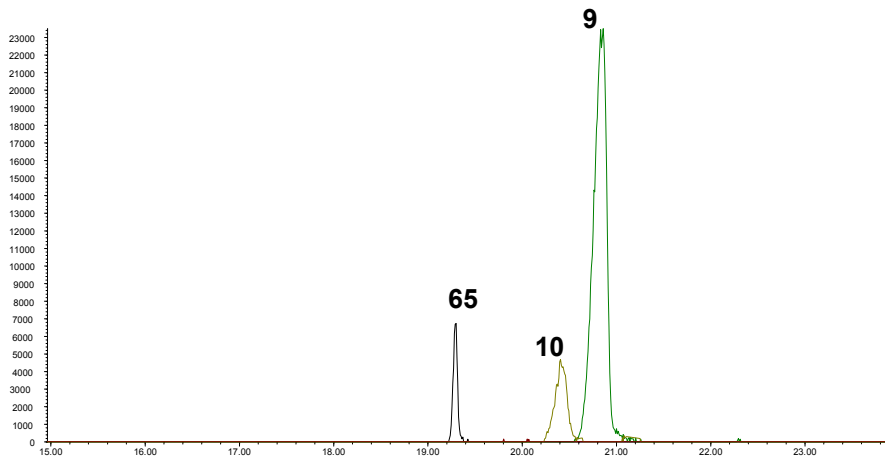
Bestimmung von EC₅₀



EC₅₀: ~ 0.8 µg/ml

Inhibitionstyp: Δ²⁴⁽²⁸⁾-Reduktase-Inhibitor

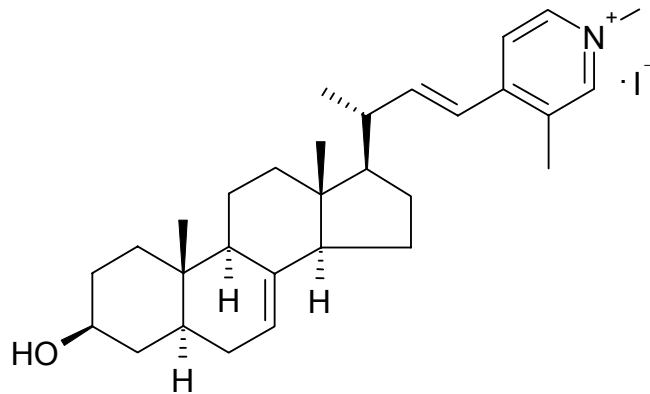
Abundance



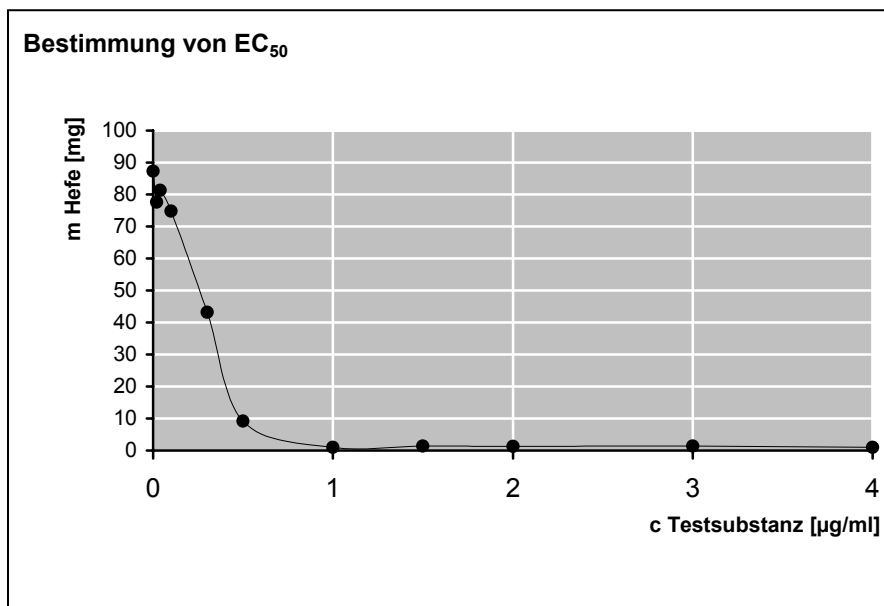
Time-->

6.4.55 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-34H

Strukturformel:



Y.l.	∅ 1539K1 1540K2	1562	1563	1564	1565	1566	1567	1568	1569	1570	1571
MG-34H [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	87.3	77.6	81.3	74.8	43.2	9.2	1.0	1.4	1.3	1.4	1.0

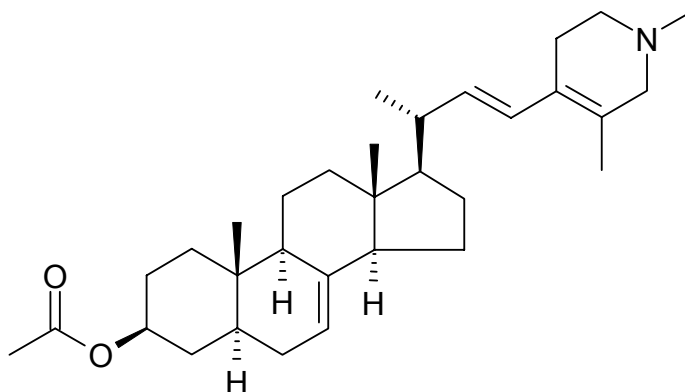


EC₅₀: ~ 0.3 $\mu\text{g/ml}$

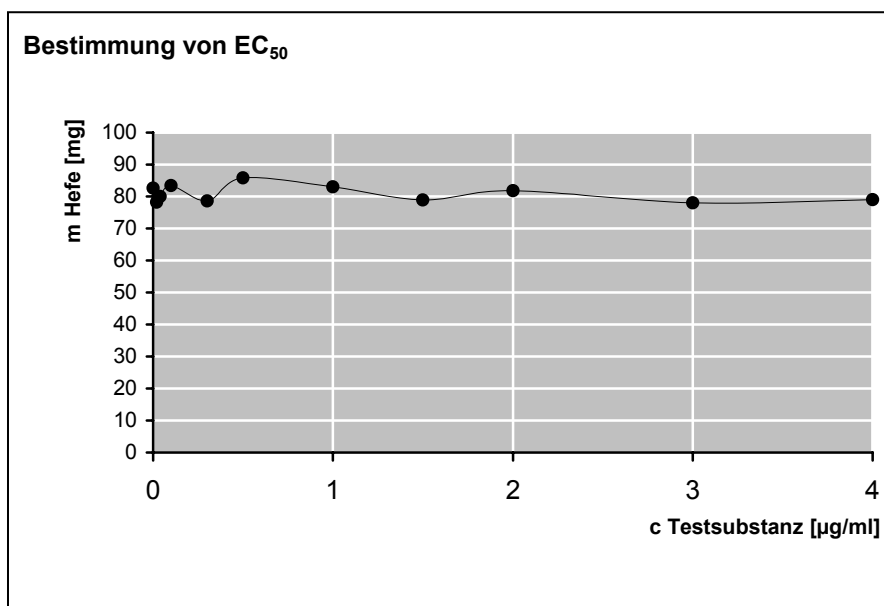
Inhibitionstyp: C²⁴-Methyltransferase-Inhibitor

6.4.56 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG 35

Strukturformel:



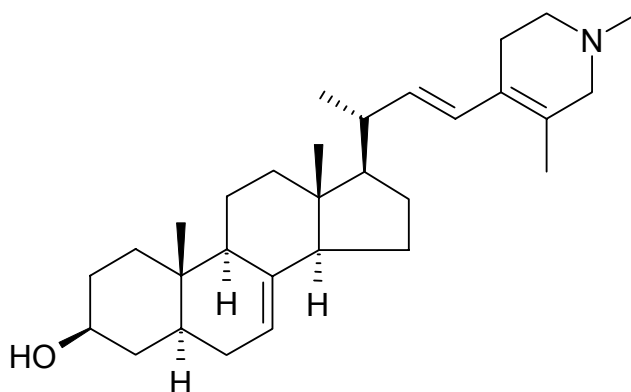
Y.l.	∅	1593K1 1594K2	1595	1596	1597	1598	1599	1600	1601	1602	1603	1604
MG 35 [µg/ml]		0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		82.6	78.2	80.0	83.4	78.6	85.8	83.0	78.9	81.8	78.0	79.0

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

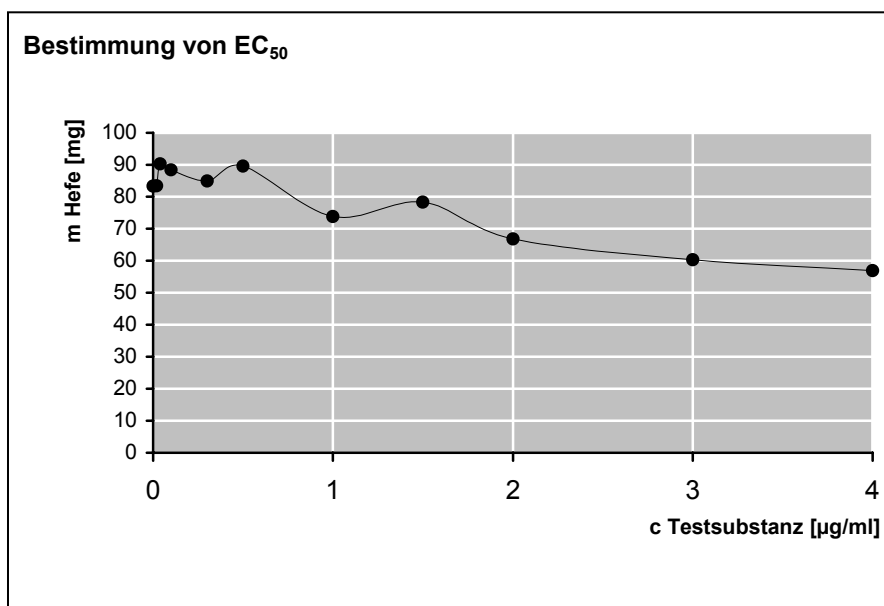
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.57 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-35H

Strukturformel:



Y.l.	∅	1460K1 1461K2	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472
MG-35H [$\mu\text{g/ml}$]		0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		83.3	83.4	90.3	88.4	84.9	89.6	73.8	78.3	66.8	60.3	56.9

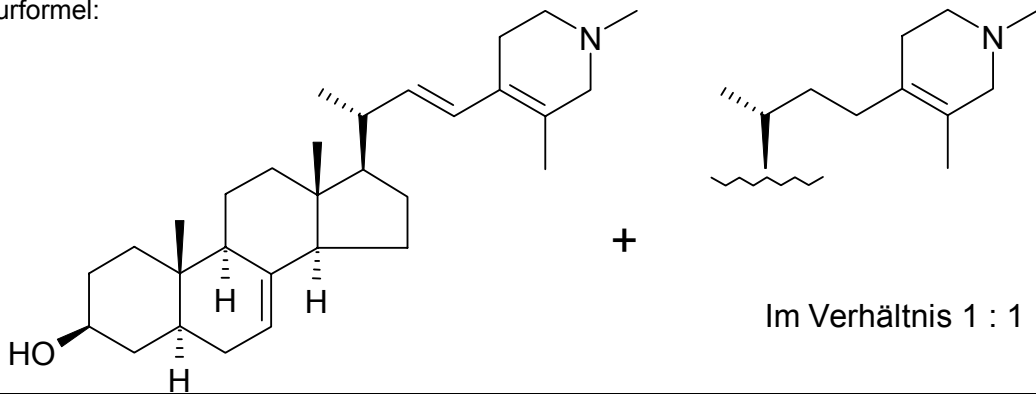


EC_{50} : > 4.0 $\mu\text{g/ml}$

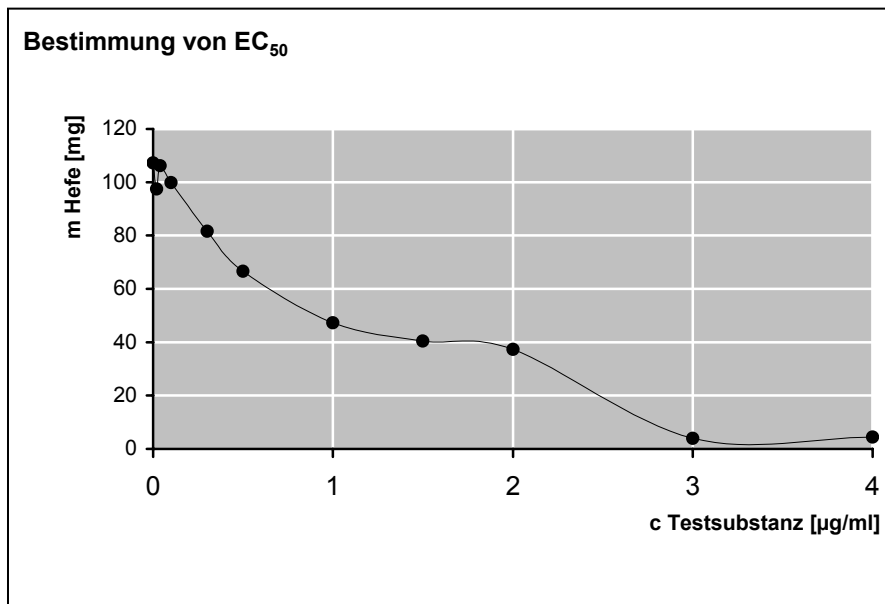
Inhibitionstyp: C^{24} -Methyltransferase-Inhibitor

6.4.58 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-35-1

Strukturformel:

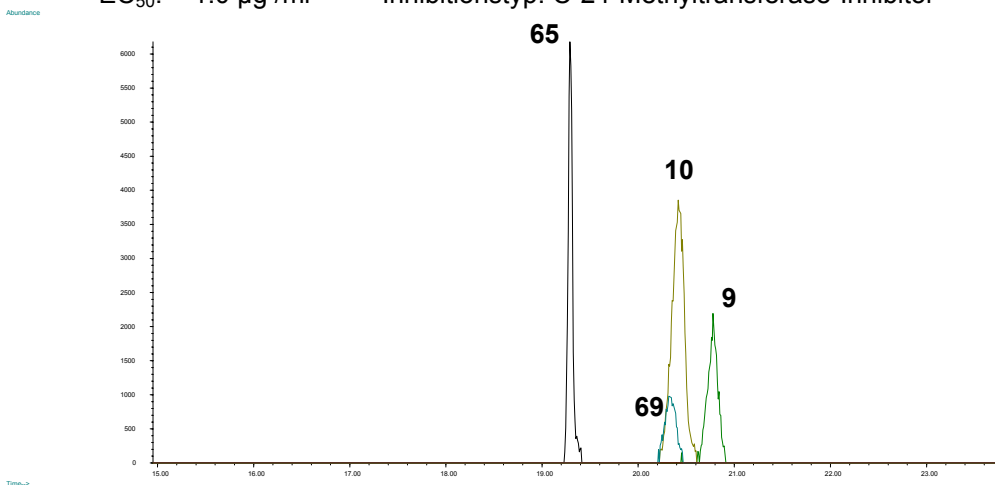


Y.l.	Ø	847K1 848K2	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858
MG-35-1 [$\mu\text{g/ml}$]		0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		107.3	97.4	106.2	99.8	81.6	66.6	47.3	40.4	37.3	4.0	4.4



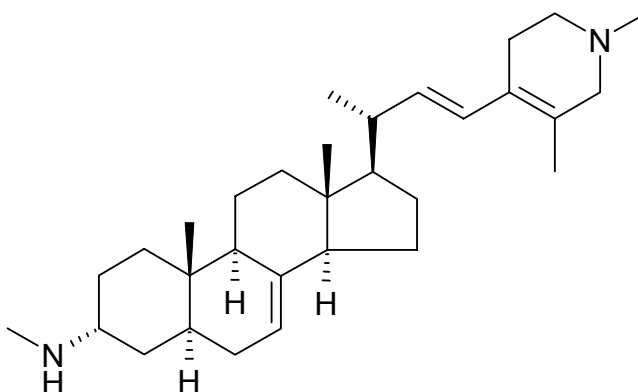
EC_{50} : ~ 1.0 $\mu\text{g/ml}$

Inhibitionstyp: C-24-Methyltransferase-Inhibitor

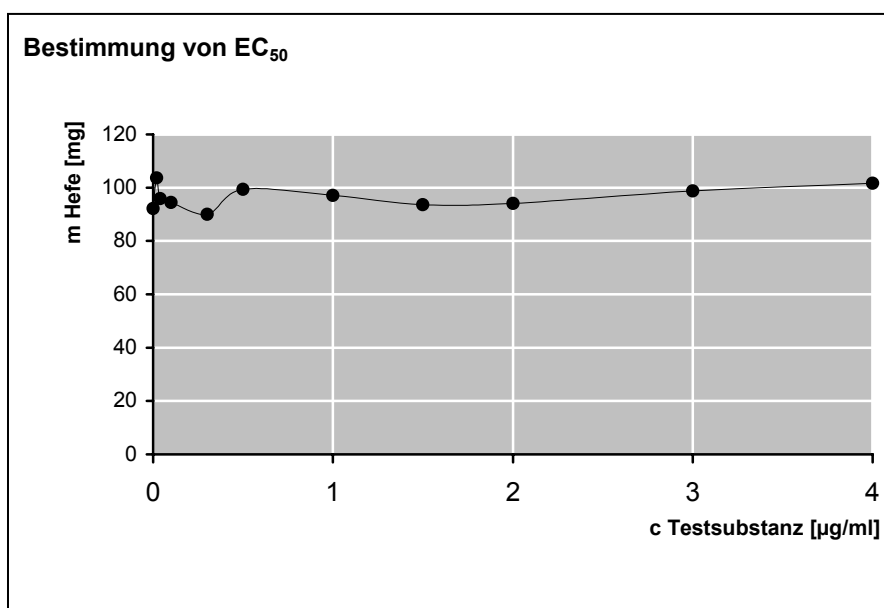


6.4.59 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-47

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1428K1 1429K2	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459
MG-47 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	92.2	103.7	95.9	94.5	90.0	99.4	97.1	93.6	94.1	98.7	101.6

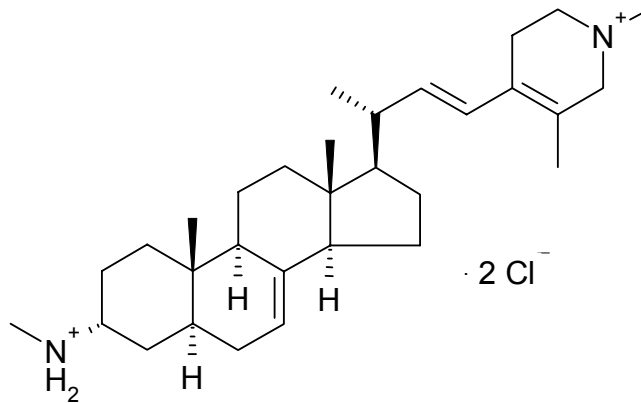


EC_{50} : > 4.0 $\mu\text{g/ml}$

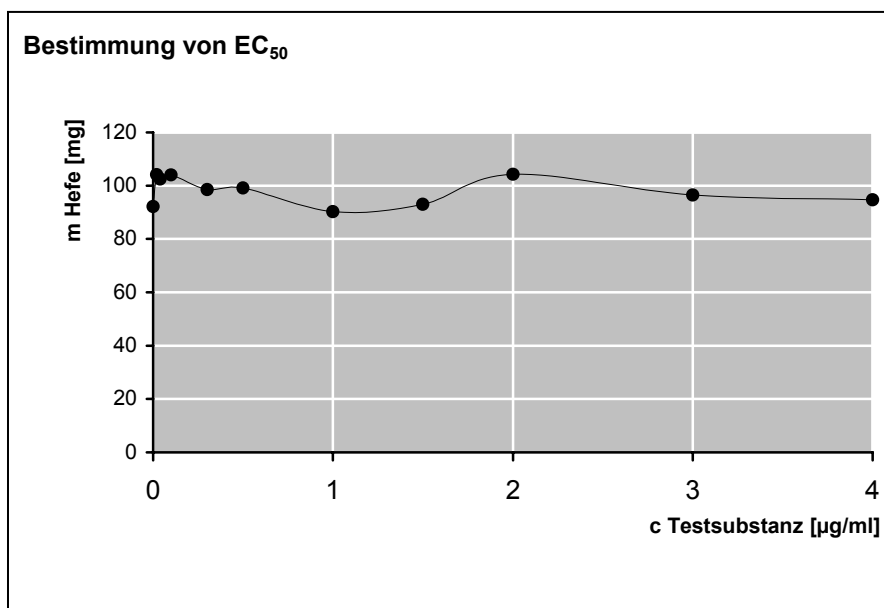
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.60 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit MG-47-2

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1428K1 1429K2	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449
MG-47-2 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	92.2	104.2	102.5	104.1	98.5	99.1	90.3	93.0	104.3	96.5	94.7

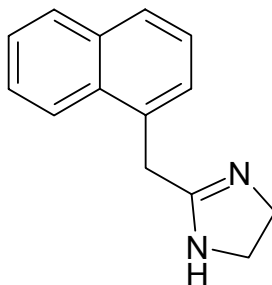


EC_{50} : > 4.0 $\mu\text{g/ml}$

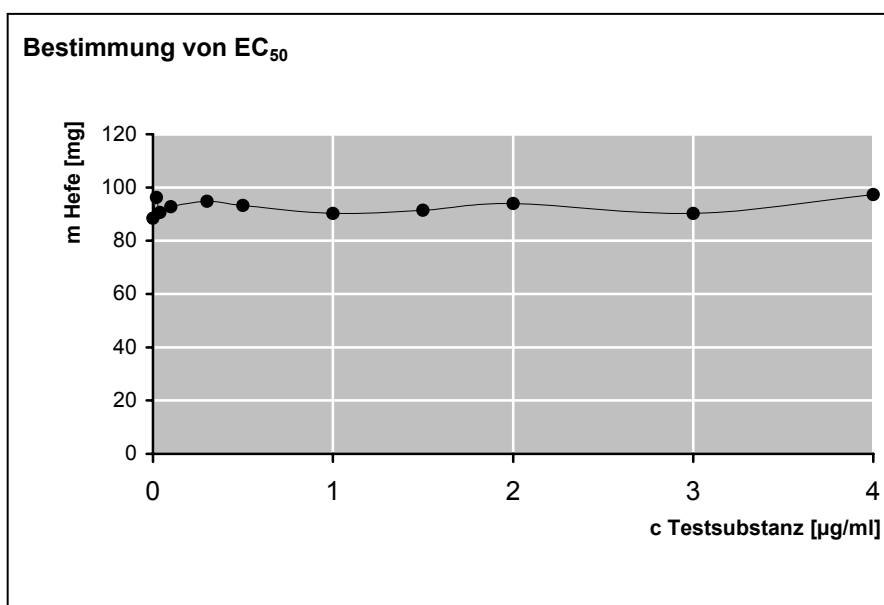
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.61 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit Naphazolin

Strukturformel:



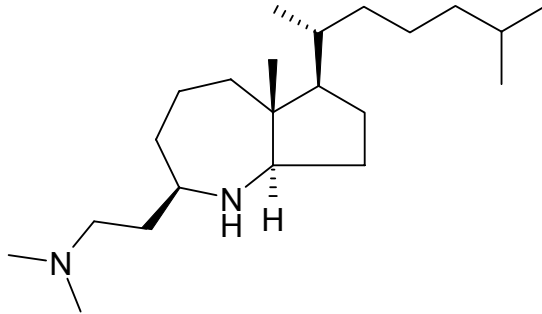
Y.I.	∅ 1177K1 1178K2	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198
Naphazolin [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	88.5	93.6	90.6	92.8	94.8	93.3	90.3	91.4	94.0	90.2	97.3

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

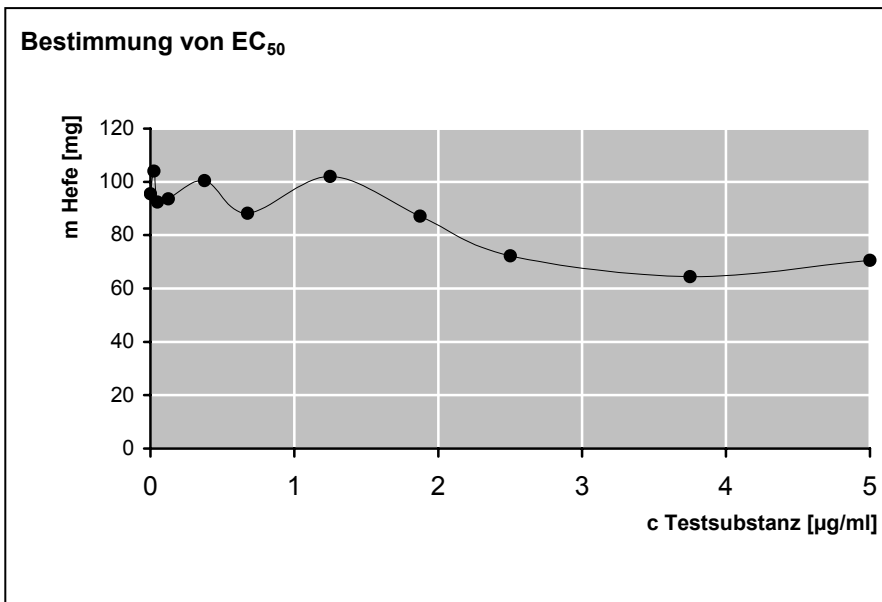
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.62 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-51

Strukturformel:

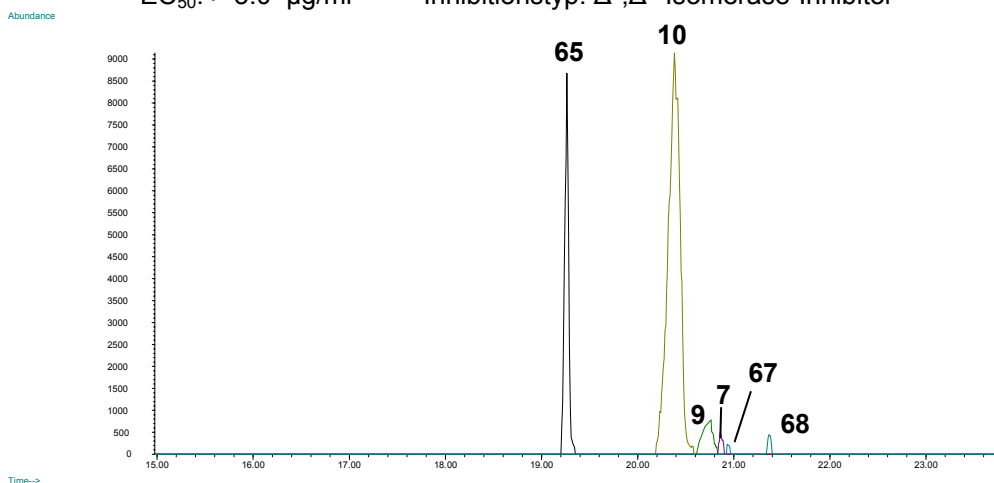


Y.l.	Ø 939K1 940K2	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970
NS-51 [µg/ml]	0.000	0.025	0.050	0.125	0.375	0.675	1.250	1.875	2.500	3.750	5.000
Trockengewicht [mg]	95.5	104.1	92.4	93.6	100.4	88.2	102.0	87.1	72.2	64.5	70.6



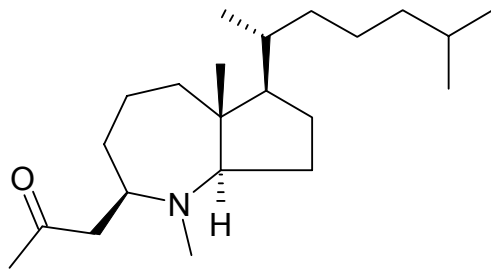
EC₅₀: > 5.0 µg/ml

Inhibitionstyp: Δ⁸,Δ⁷-Isomerase-Inhibitor

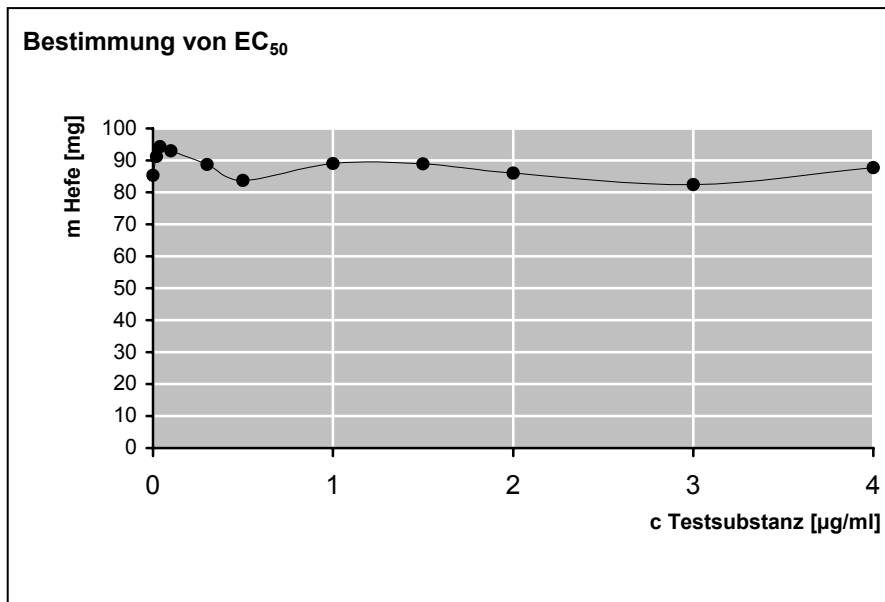


6.4.63 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-57

Strukturformel:

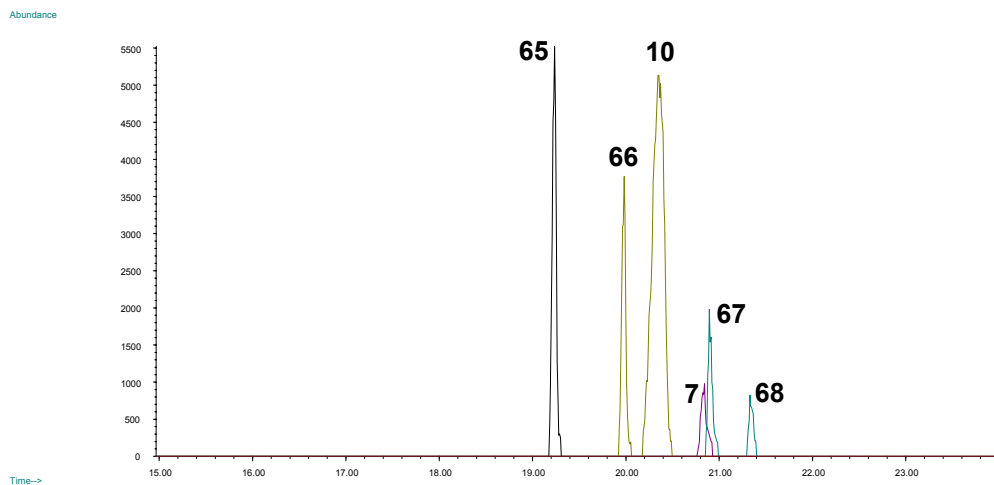


Y.I.	∅	1143K1 1144K2	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164
NS-57 [µg/ml]		0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		85.3	91.2	94.3	93.0	88.7	83.7	89.0	88.9	86.0	82.4	87.7



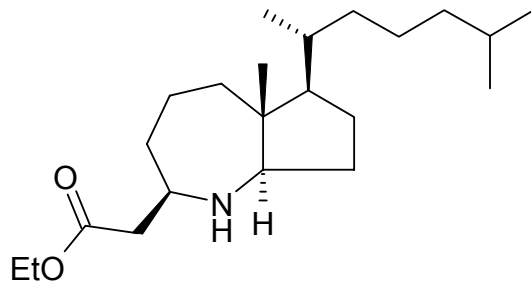
EC₅₀: > 4.0 µg/ml

Inhibitionstyp: Δ⁸,Δ⁷-Isomerase-Inhibitor

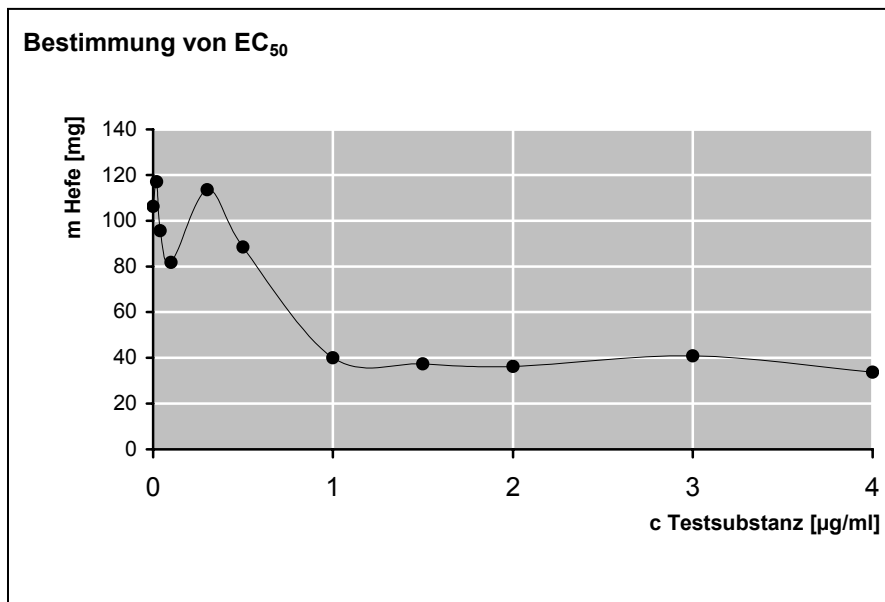


6.4.64 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-61

Strukturformel:



Y.I.	∅ 1025K1 1026K2	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056
NS-61 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	106.3	117.1	95.6	81.8	113.6	88.5	40.1	37.4	36.3	40.9	33.8

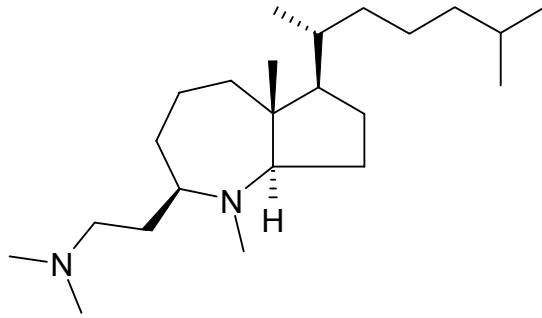


EC₅₀: ~ 0.9 µg/ml

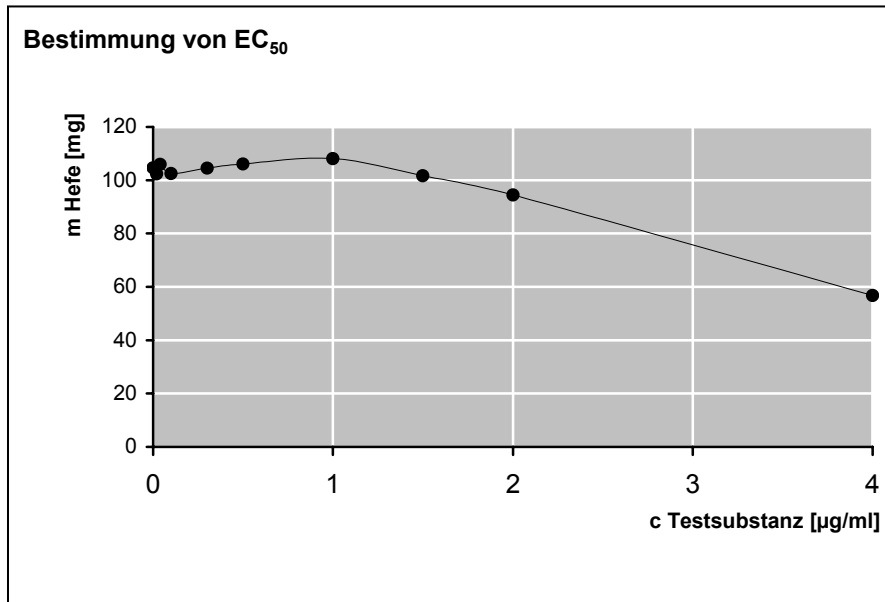
Inhibitionstyp: Δ⁸,Δ⁷-Isomerase-Inhibitor

6.4.65 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-68

Strukturformel:



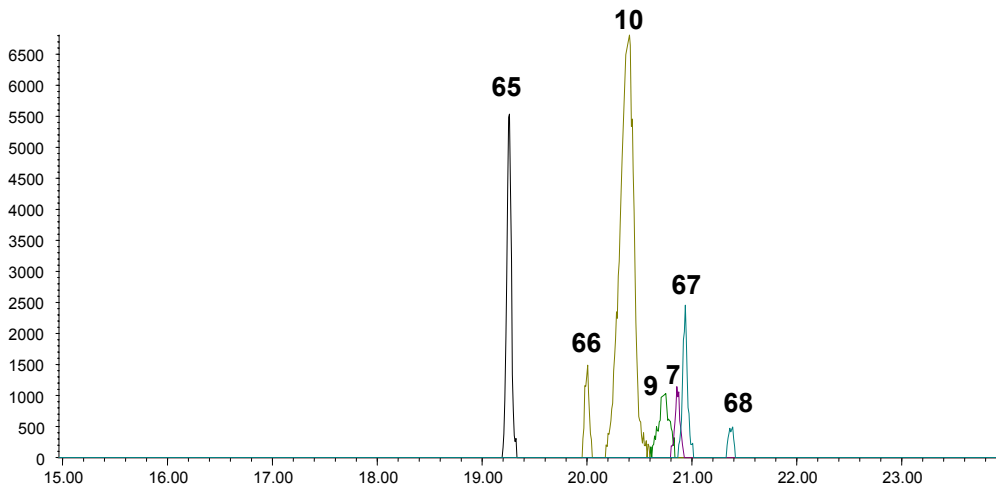
Y.l.	Ø 879K1 880K2	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890
NS-68 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	104.6	102.4	106.0	102.5	104.5	106.1	108.1	101.6	94.5	6.1	56.8



EC₅₀: > 4.0 µg/ml

Inhibitionstyp: Δ⁸,Δ⁷-Isomerase-Inhibitor

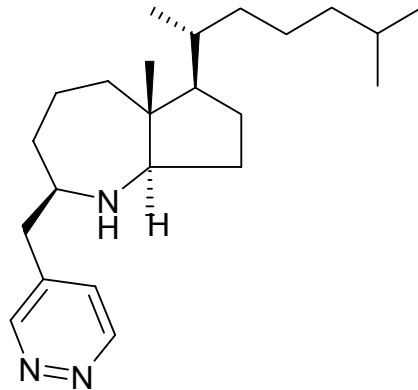
Abundance



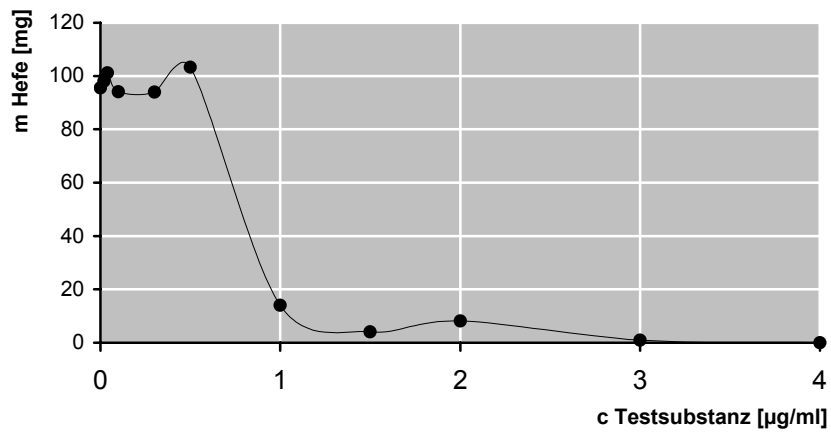
Time-->

6.4.66 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-69

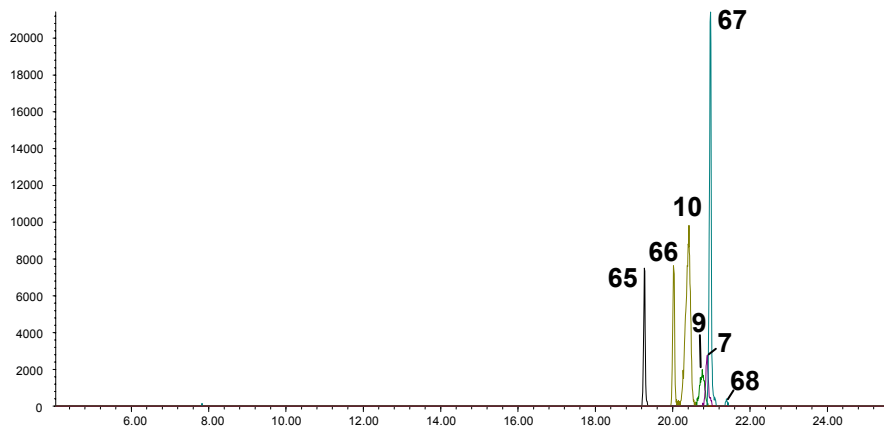
Strukturformel:



Y.l.	Ø 939K1 940K2	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960
NS-69 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	95.5	98.1	101.2	94.1	93.9	103.3	14.0	4.1	8.2	0.9	0.0

Bestimmung von EC₅₀EC₅₀: ~ 0.7 µg/mlInhibitionstyp: Δ^8, Δ^7 -Isomerase-Inhibitor

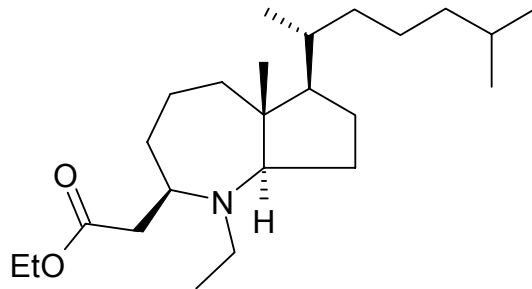
Abundance



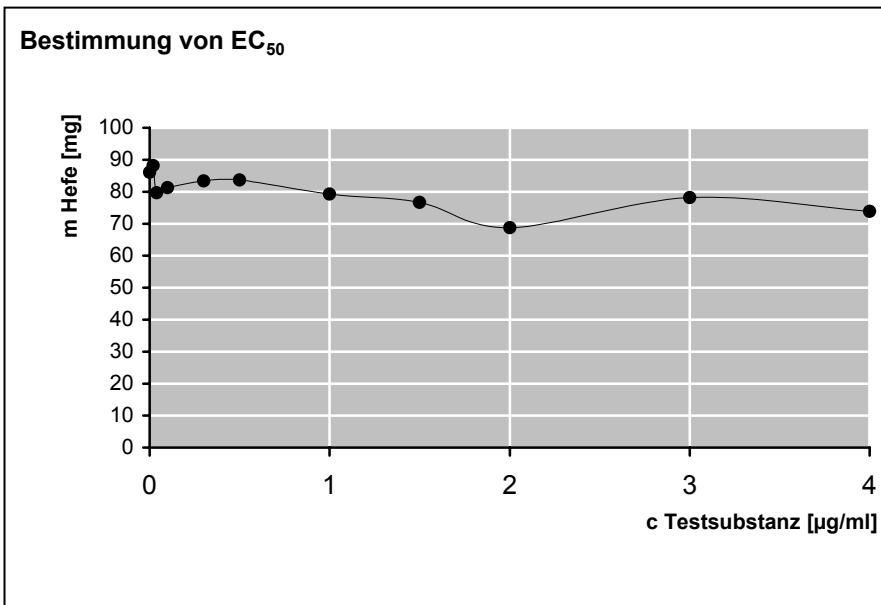
Time-->

6.4.67 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-70

Strukturformel:



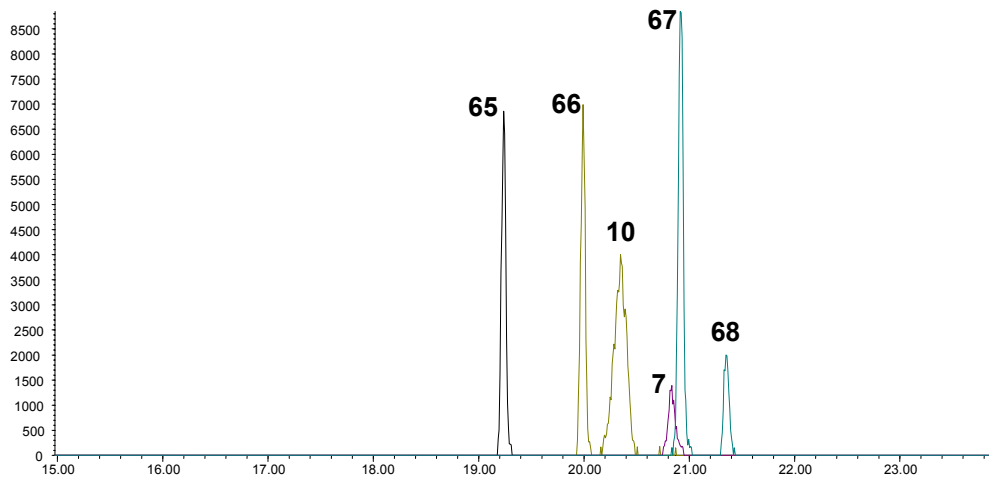
Y.l.	∅ 1089K1 1090K2	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130
NS-70 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	86.1	88.2	79.7	81.3	83.4	83.7	79.3	76.7	68.8	78.2	73.9



EC₅₀: > 4.0 µg/ml

Inhibitionstyp: Δ^8, Δ^7 -Isomerase-Inhibitor

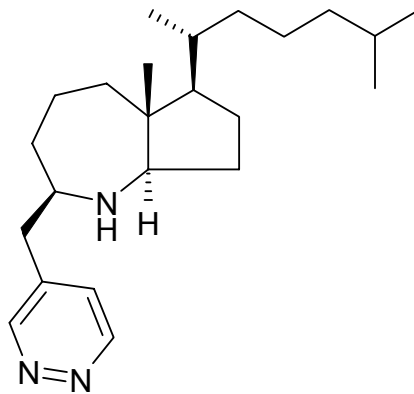
Abundance



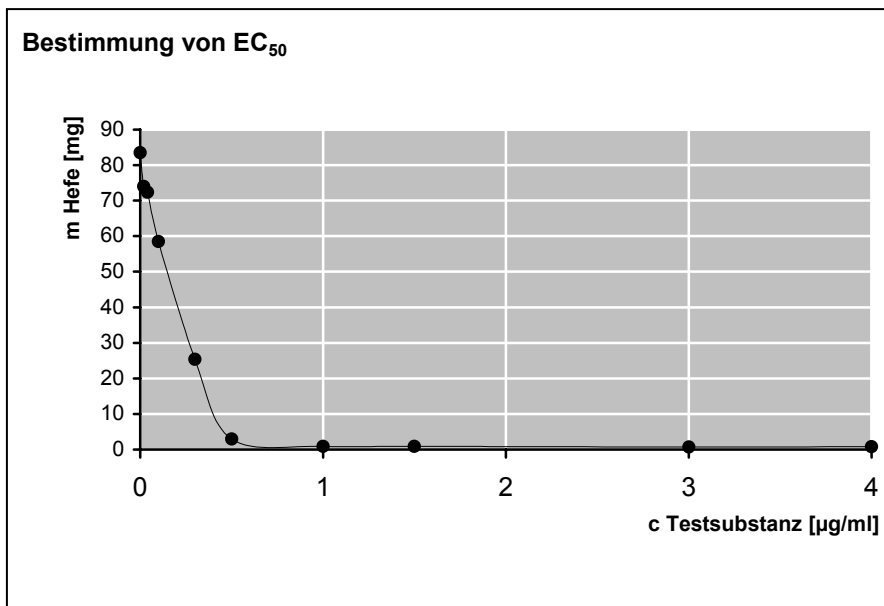
Time-->

6.4.68 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-72

Strukturformel:

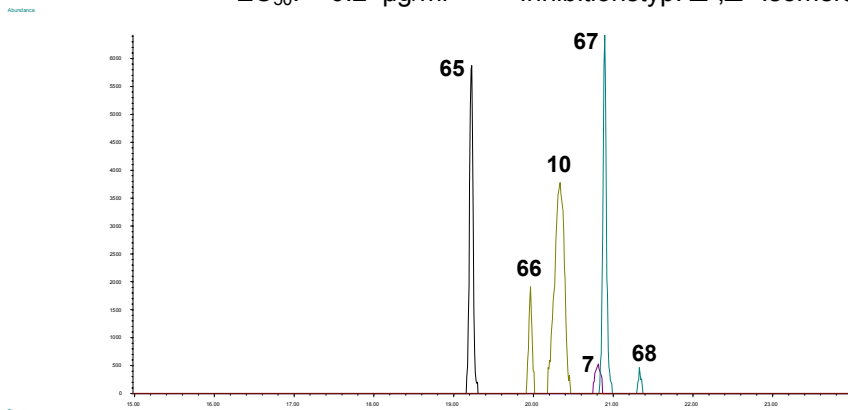


Y.I.	∅ 1057K1 1058K2	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078
NS-72 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	83.5	74.0	72.4	58.5	25.4	3.0	0.9	0.9	6.1	0.7	0.8



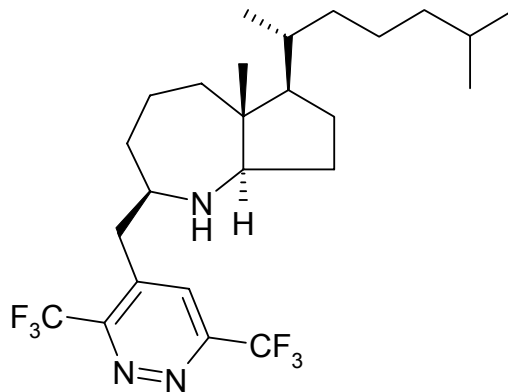
EC₅₀: ~ 0.2 µg/ml

Inhibitionstyp: Δ⁸,Δ⁷-Isomerase-Inhibitor

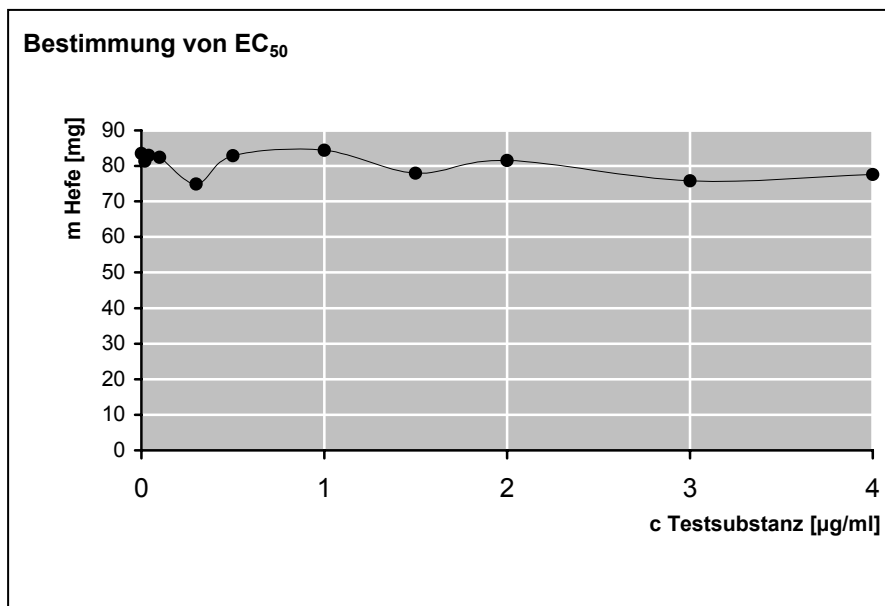


6.4.69 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-73

Strukturformel:



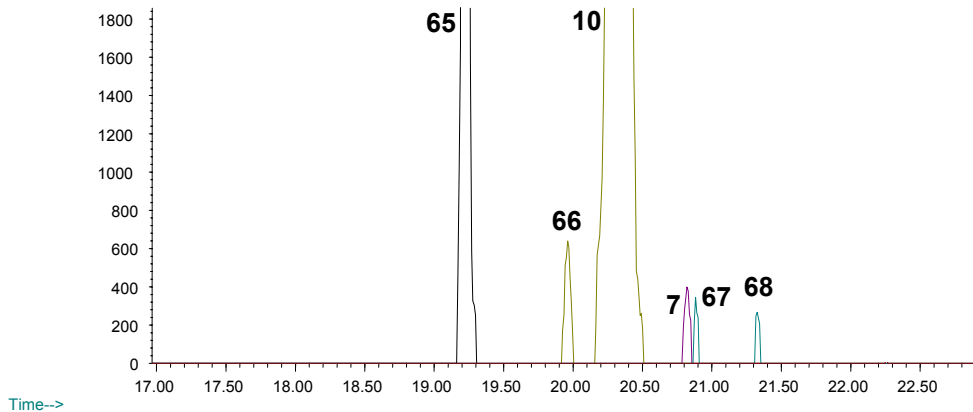
Y.l.	∅ 1057K1 1058K2	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088
NS-73 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	83.5	81.4	83.0	82.4	74.9	82.9	84.4	77.9	81.5	75.8	77.6



EC₅₀: > 4.0 µg/ml

Inhibitionstyp: Δ⁸,Δ⁷-Isomerase-Inhibitor

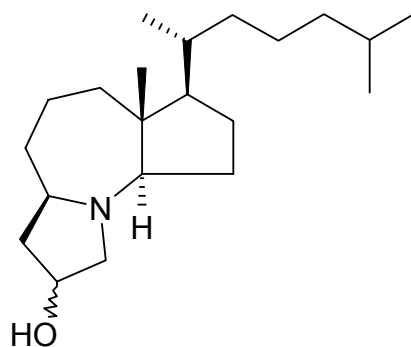
Abundance



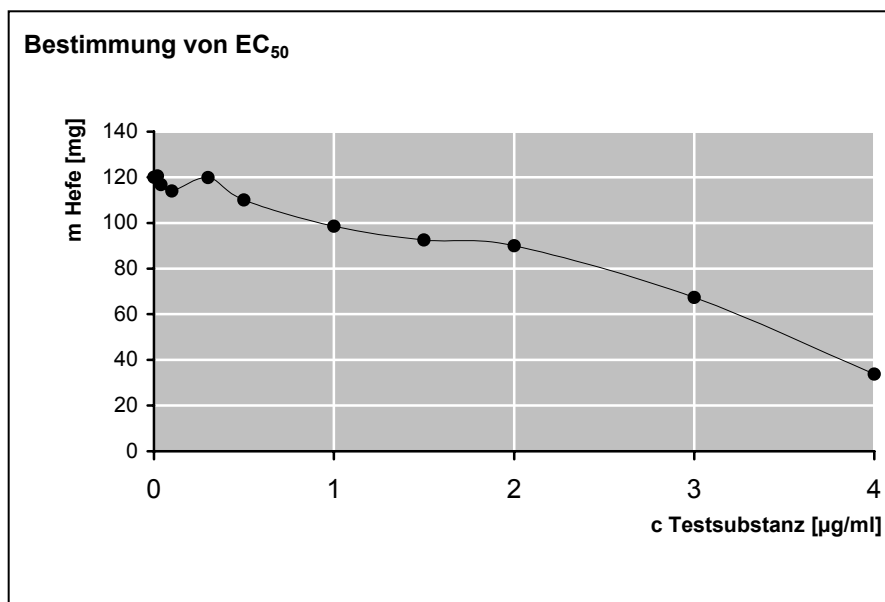
Time-->

6.4.70 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-76

Strukturformel:

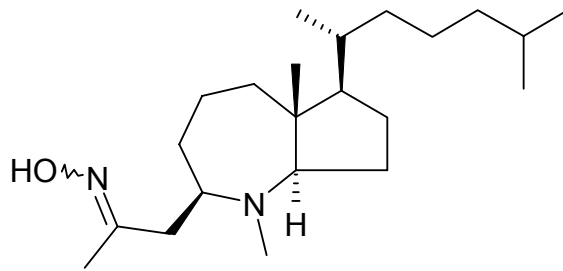


Y.l.	∅ 1571K1 1572K2	1573	1574	1575	1576	1577	1578	1579	1580	1581	1582
NS-76 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	120.0	120.6	116.7	113.9	119.8	110.0	98.6	92.6	90.0	67.3	33.7

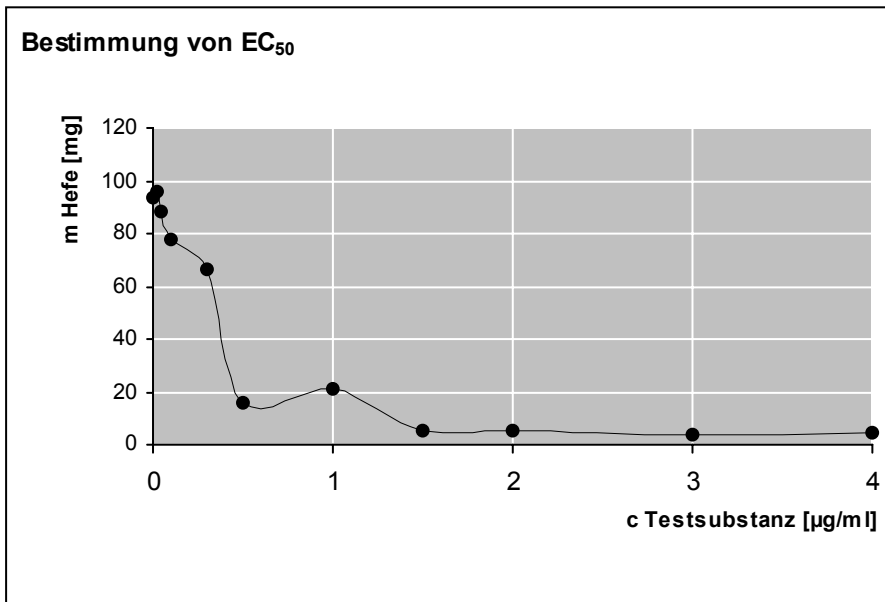
EC₅₀: ~ 3.2 µg/mlInhibitionstyp: Δ⁸,Δ⁷-Isomerase-Inhibitor

6.4.71 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-77

Strukturformel:



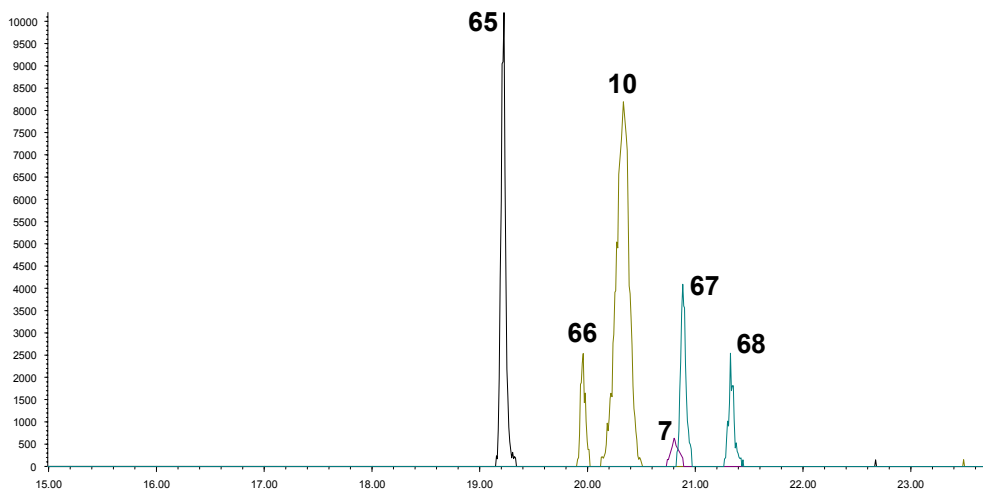
Y.I.	∅ 1221K1 1222K2	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242
NS-77 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	93.7	95.7	88.3	77.5	66.3	15.6	21.4	5.0	5.3	4.0	4.3



EC₅₀: ~ 0.3 µg/ml

Inhibitionstyp: Δ⁸,Δ⁷-Isomerase-Inhibitor

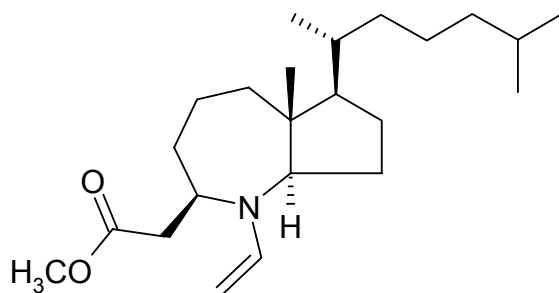
Abundance



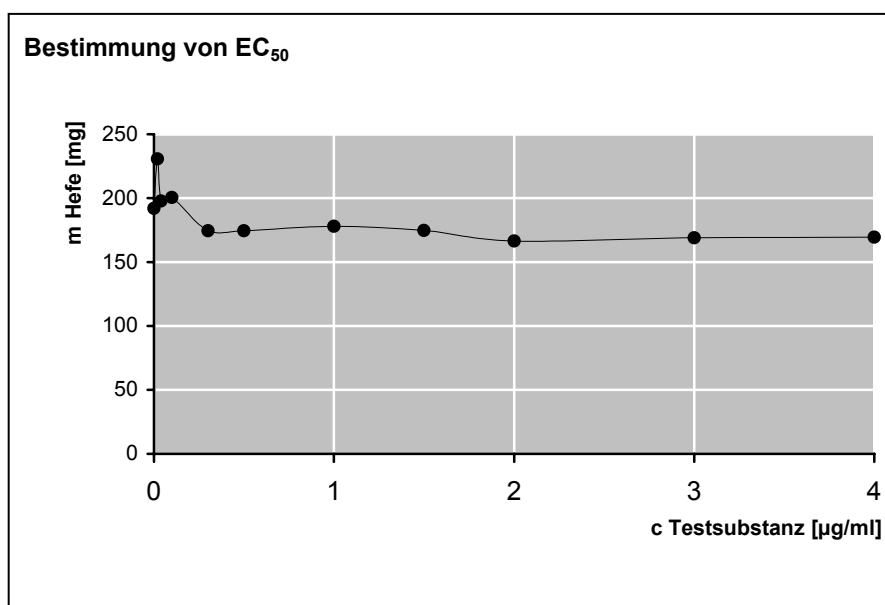
Time-->

6.4.72 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-79

Strukturformel:



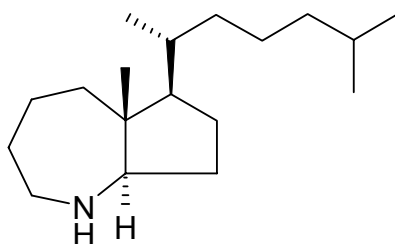
Y.I.	∅ 1209K1 1210K2	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208
NS-79 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	192.0	230.7	197.8	200.6	174.4	174.6	178.1	174.7	166.5	169.0	169.4

EC₅₀: > 4.0 µg/ml

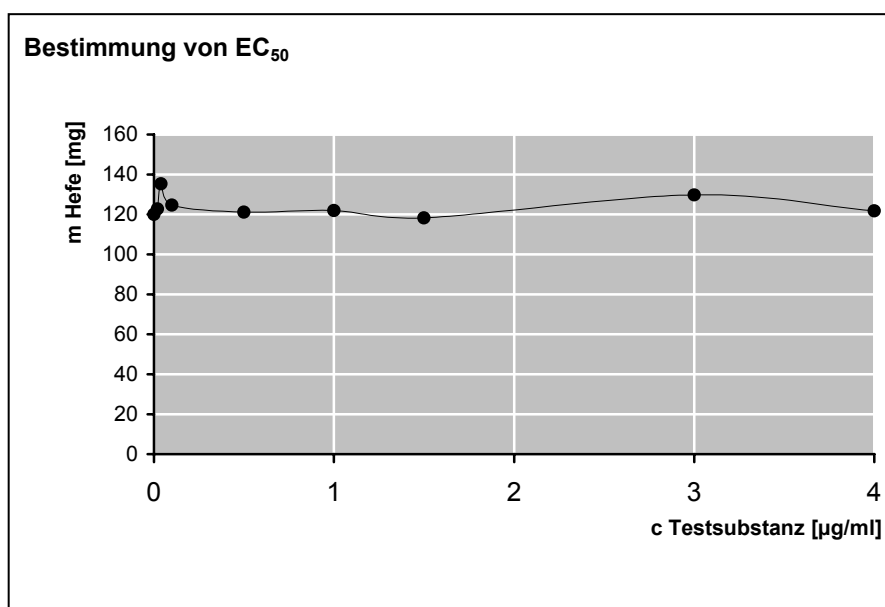
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.73 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-80

Strukturformel:



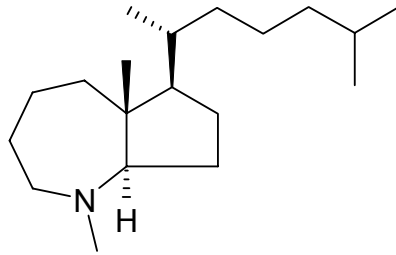
Y.l.	∅ 1571K1 1572K2	1583	1584	1585	1586	1587	1588	1589	1590	1591	1592
NS-80 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	120.0	122.7	135.4	124.6	81.2	121.1	121.9	118.3		129.8	121.7

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

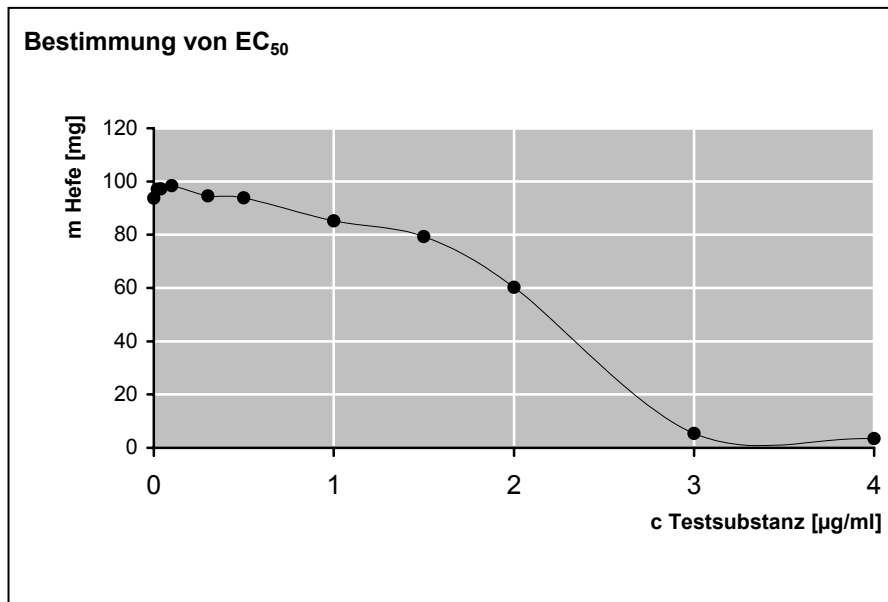
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.74 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-81

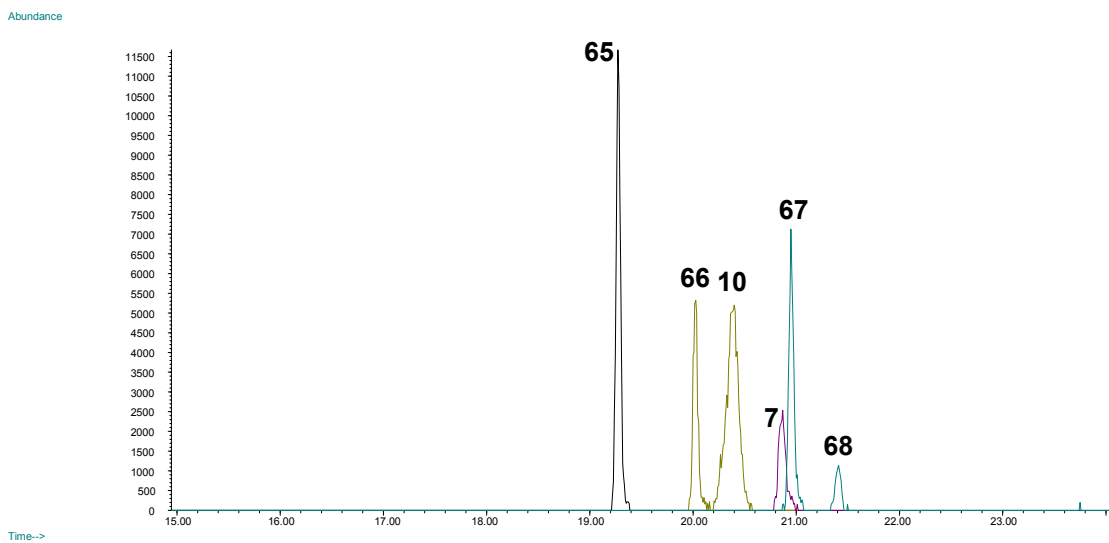
Strukturformel:



Y.l.	∅	1221K1 1222K2	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232
NS-81 [µg/ml]		0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]		93.7	97.1	97.2	98.4	94.6	93.8	85.2	79.3	60.3	5.4	3.5

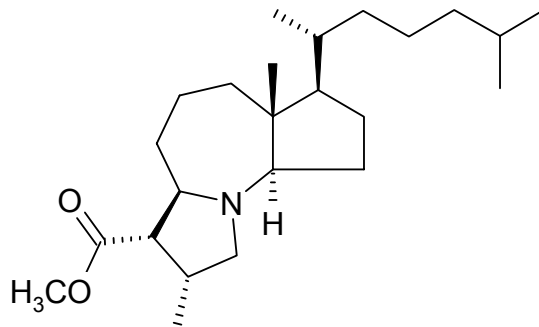


EC₅₀: ~ 2.2 µg/ml Inhibitionstyp: Δ^8, Δ^7 -Isomerase-Inhibitor

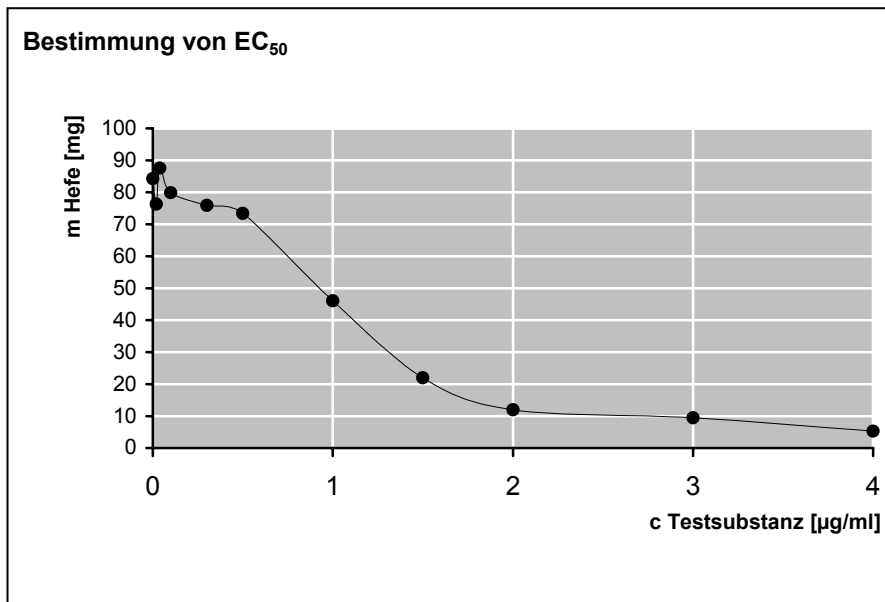


6.4.75 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-82

Strukturformel:

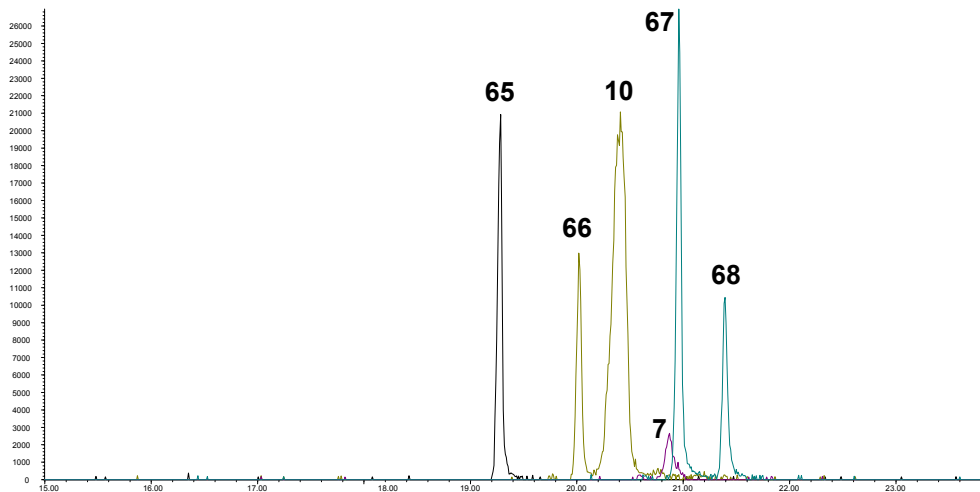


Y.I.	∅ 1330K1 1331K2	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341
NS-82 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	84.3	76.3	87.6	79.9	75.9	73.4	46.1	22.0	12.0	9.5	5.3



EC₅₀: ~ 1.1 µg/ml Inhibitionstyp: Δ⁸,Δ⁷-Isomerase-Inhibitor

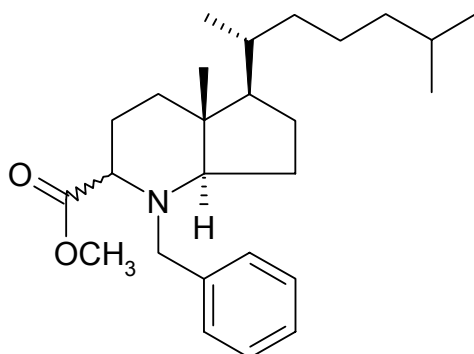
Abundance



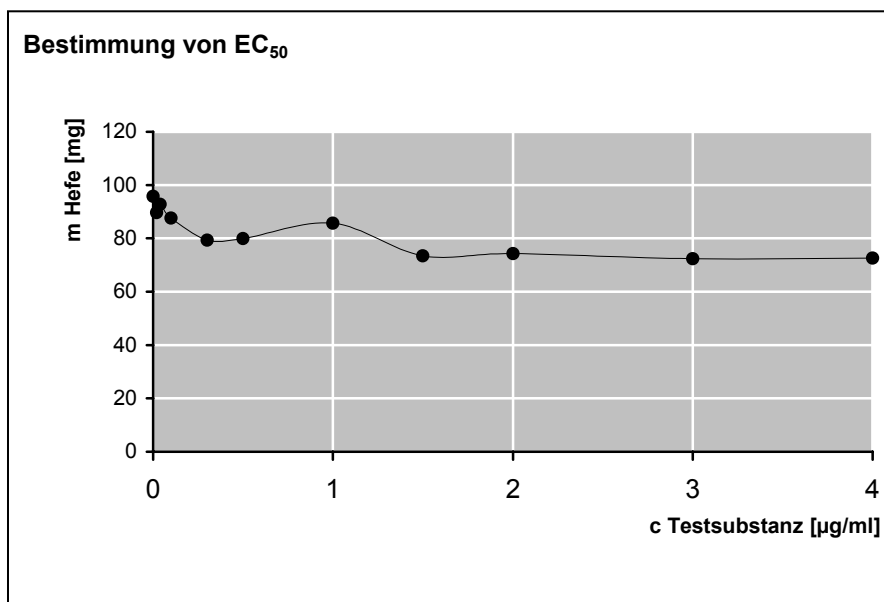
Time-->

6.4.76 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit NS-87

Strukturformel:

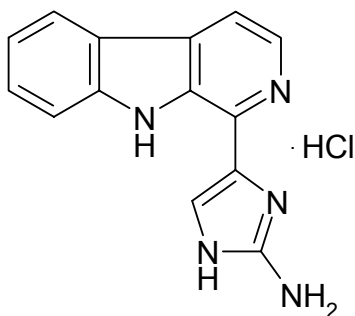


Y.l.	∅ 1406K1 1407K2	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417
NS-87 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	95.7	89.6	92.8	87.6	79.3	79.9	85.7	73.5	74.3	72.4	72.6

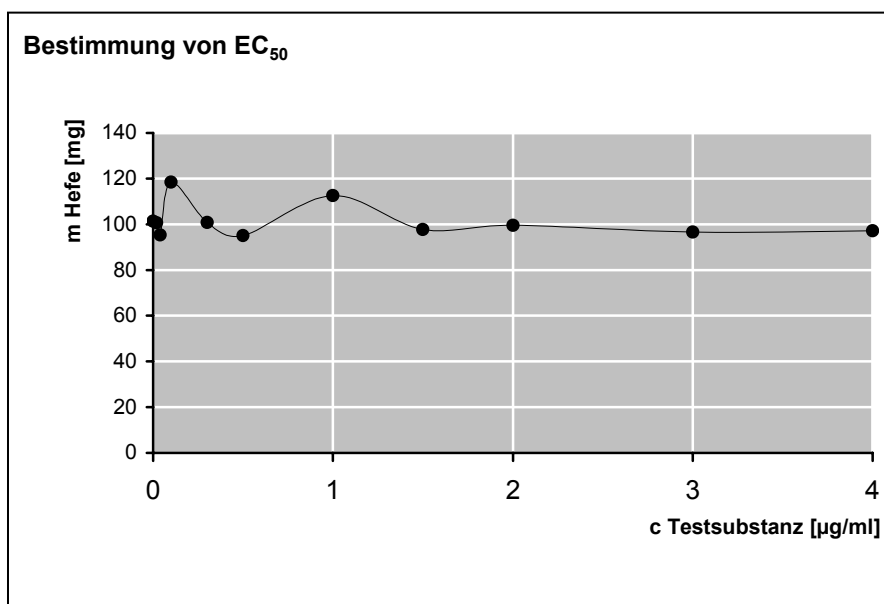
EC₅₀: > 4.0 µg/mlInhibitionstyp: Δ⁸,Δ⁷-Isomerase-Inhibitor

6.4.77 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit OK-45

Strukturformel:



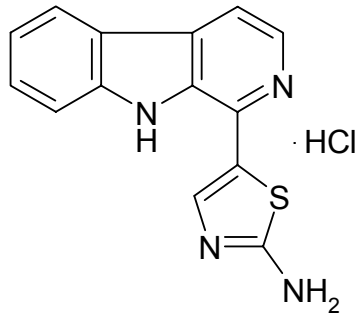
Y.l.	∅ 971K1 972K2	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982
OK-45 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	101.3	100.6	95.4	118.4	100.8	95.1	112.5	97.7	99.5	96.6	97.2

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

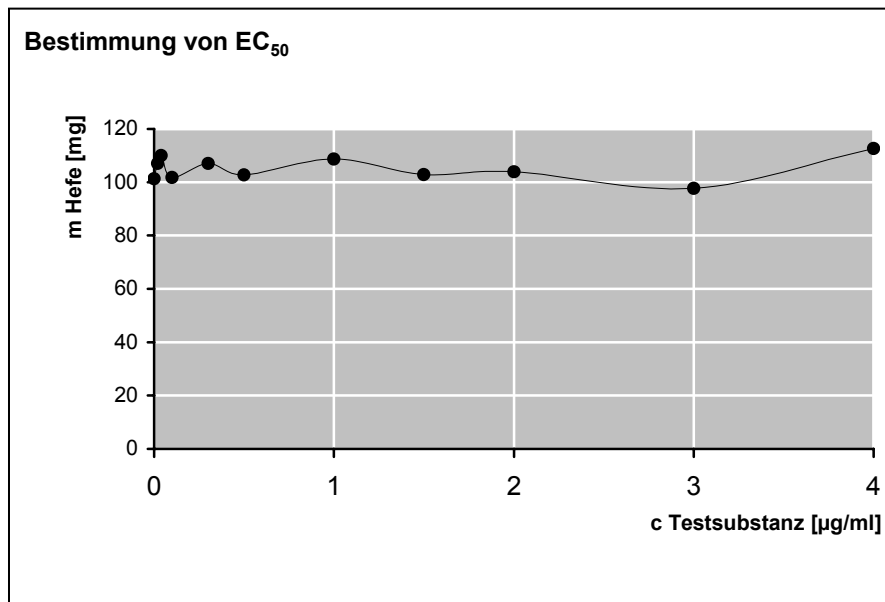
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.78 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit OK-47

Strukturformel:



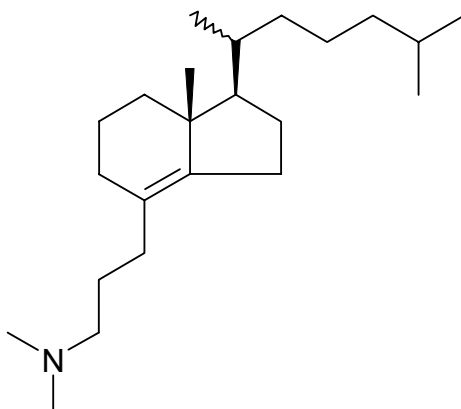
Y.l.	∅ 971K1 972K2	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992
OK-47 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	101.3	107.1	110.0	101.7	107.1	102.7	108.7	102.8	103.9	97.7	112.7

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

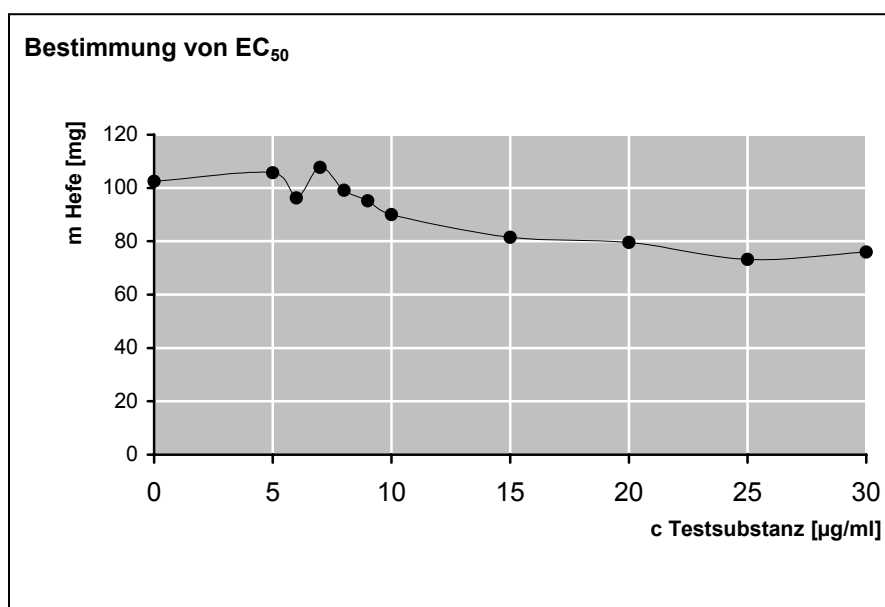
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.79 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 1-4

Strukturformel:



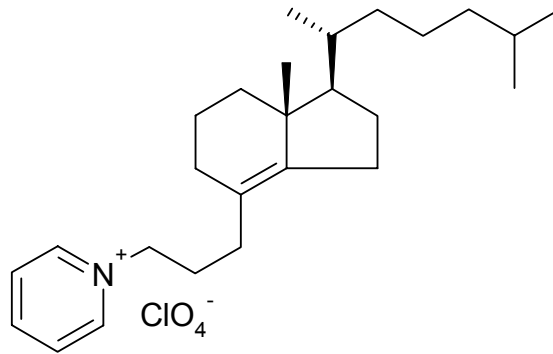
Y.l.	∅ 1753K1 1754K2	1711	1712	1713	1714	1715	1716	1717	1718	1719	1720
SL 1-4 [µg/ml]	0.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	15.00	20.00	25.00	30.00
Trockengewicht [mg]	102.5	105.7	96.2	107.8	99.1	95.2	90.0	81.5	79.6	73.2	75.9

EC₅₀: > 30.0 µg/ml

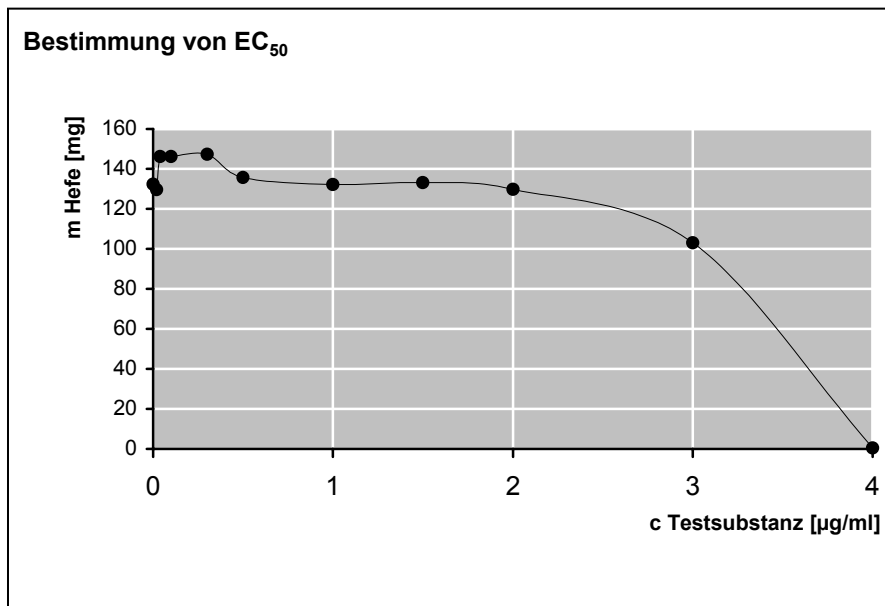
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.80 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 1-5

Strukturformel:

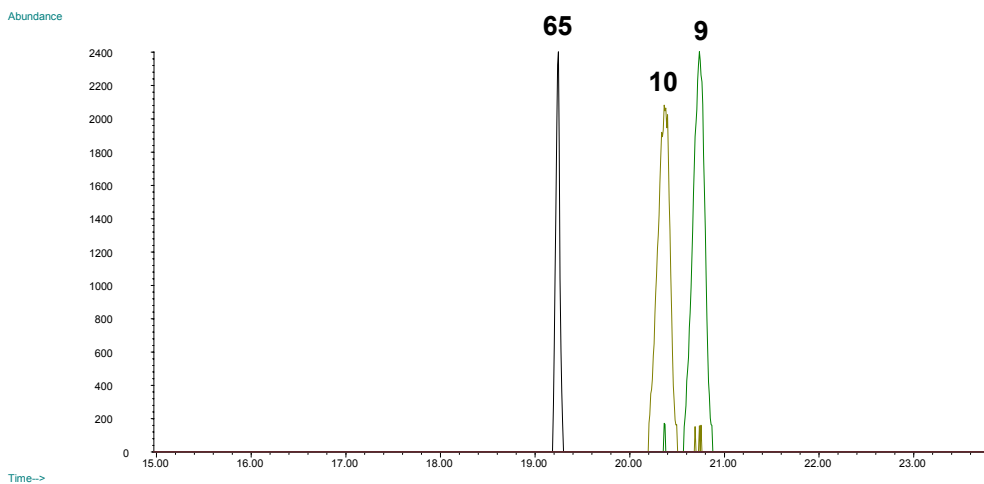


Y.l.	Ø 1821K1 1822K2	1823	1824	1825	1826	1827	1828	1829	1830	1831	1832
SL 1-5 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	132.3	129.6	146.2	146.3	147.4	135.7	132.1	133.2	129.7	103.0	0.5



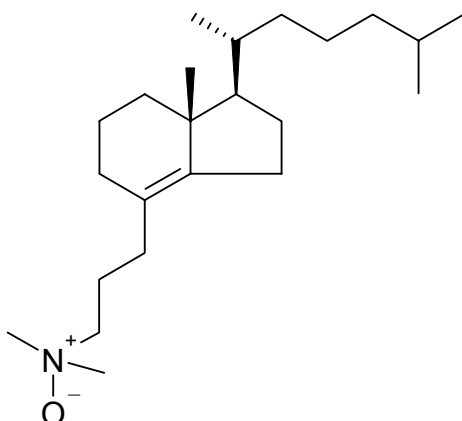
EC₅₀: ~ 3.4 µg/ml

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

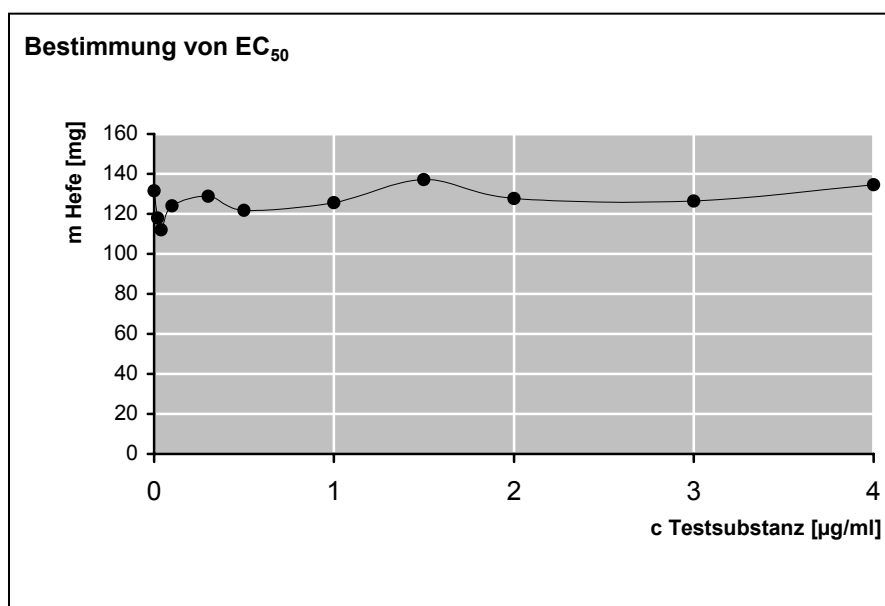


6.4.81 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 1-8

Strukturformel:



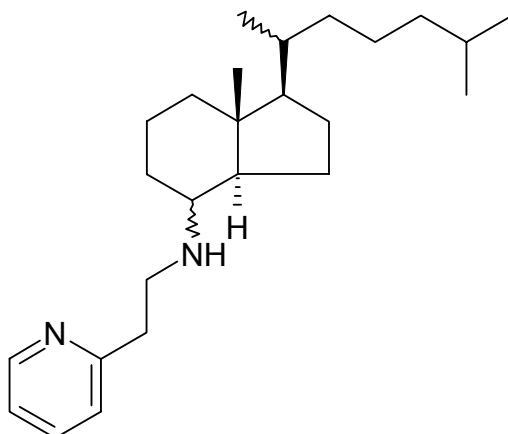
Y.l.	∅ 2034K1 2035K2	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055
SL 1-8 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	131.5	118.0	112.0	124.0	128.8	121.7	125.6	137.2	127.7	126.4	134.5

EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

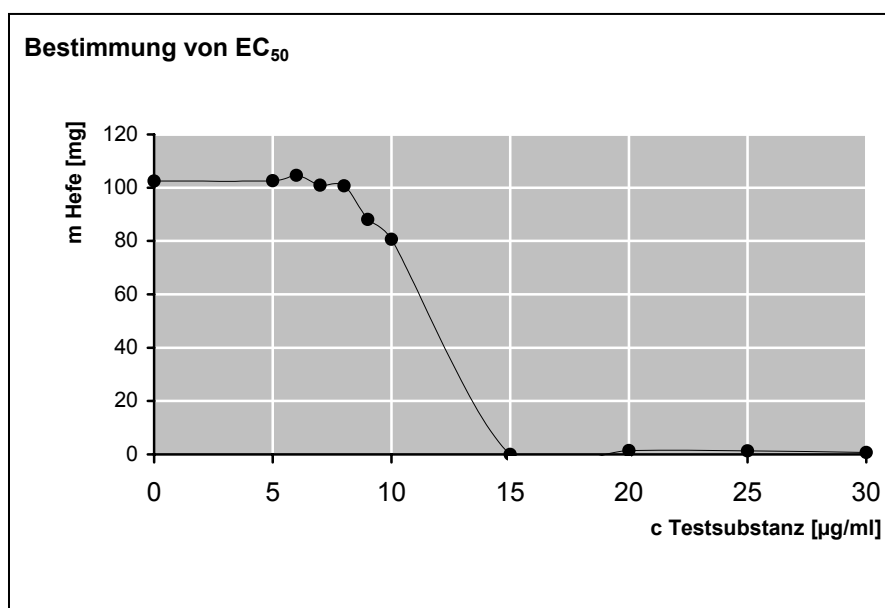
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.82 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 2-1

Strukturformel:



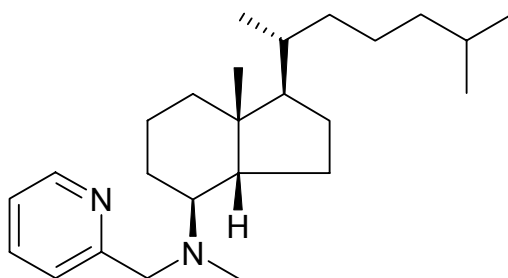
Y.l.	∅ 1753K1 1754K2	1701	1702	1703	1704	1705	1706	1707	1708	1709	1710
SL 2-1 [µg/ml]	0.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	15.00	20.00	25.00	30.00
Trockengewicht [mg]	102.5	102.6	104.6	100.9	100.7	88.1	80.6	0.0	1.4	1.3	0.7

EC₅₀: ~ 12.0 µg/ml

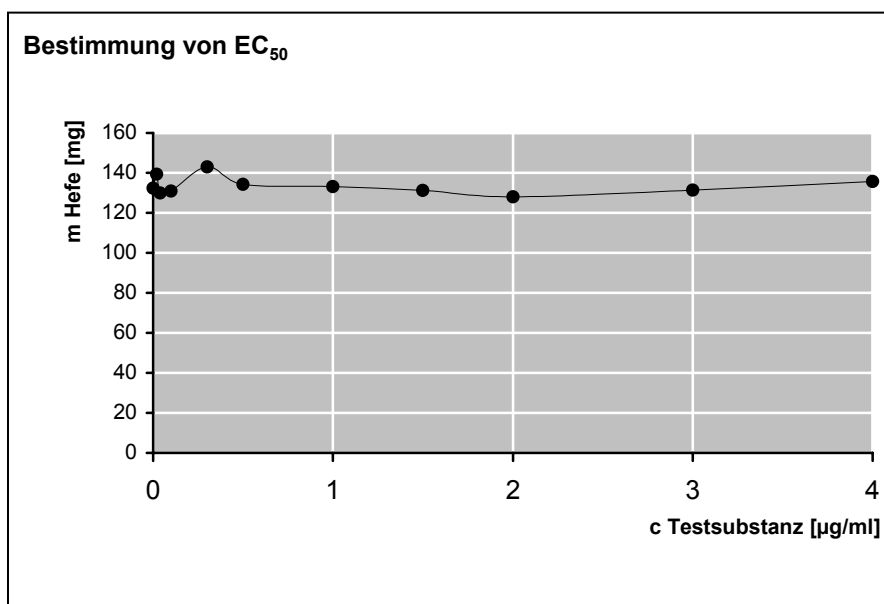
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.83 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 2-3

Strukturformel:



Y.I.	Ø 1821K1 1822K2	1843	1844	1845	1846	1847	1848	1849	1850	1851	1852
SL 2-3 [$\mu\text{g/ml}$]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	132.3	139.3	129.9	130.9	143.0	134.3	133.2	131.2	128.0	131.4	135.7

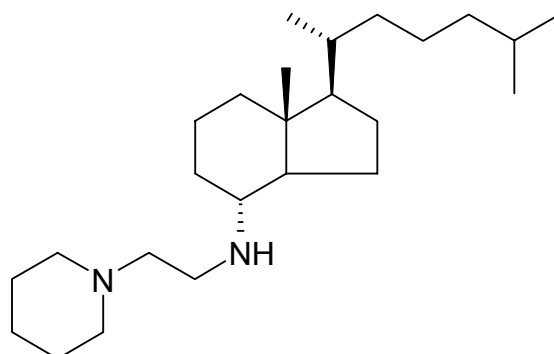


EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

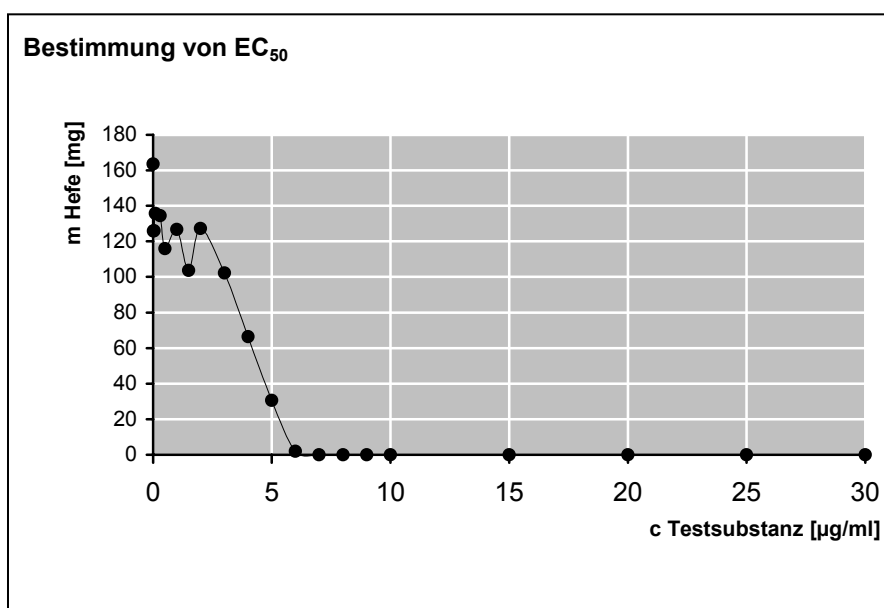
Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

6.4.84 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 3-2

Strukturformel:



Y.l.	∅ 2002K1 2003K2	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
SL 3-2 [$\mu\text{g/ml}$]*	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	125.6	125.8	126.0	135.7	134.4	116.0	126.8	103.7	127.2	102.2	66.4
Y.l.	∅ 2034K1 2035K2	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385
SL 3-2 [$\mu\text{g/ml}$]*	0.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	15.00	20.00	25.00	30.00
Trockengewicht [mg]	131.5	30.6	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0



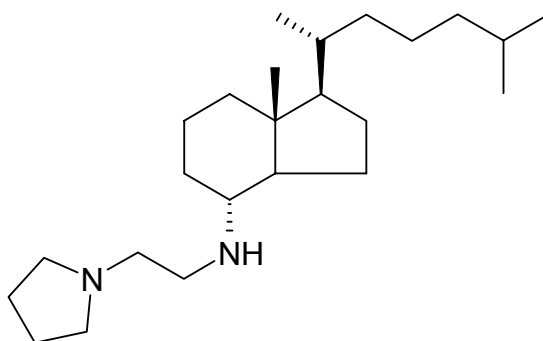
EC_{50} : ~ 4.0 $\mu\text{g/ml}$

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

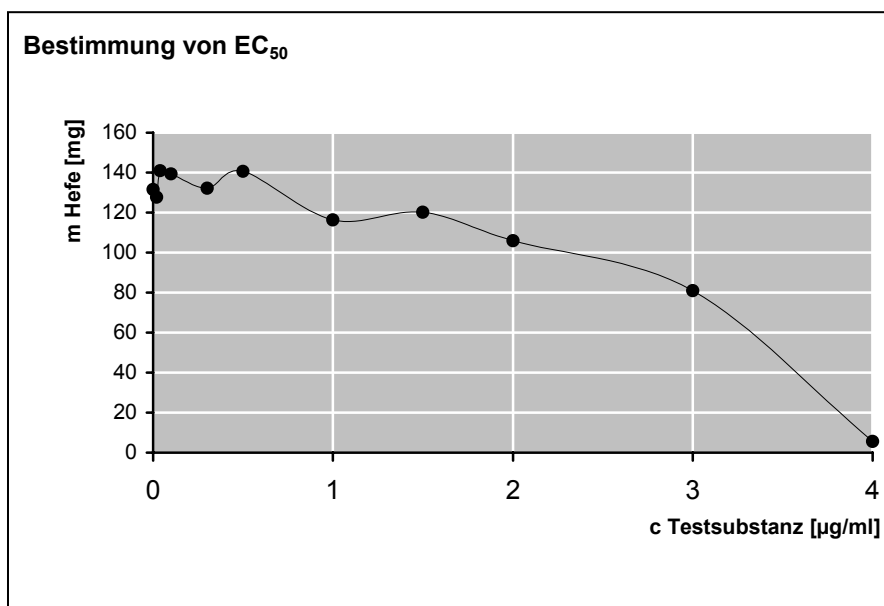
* In Schüttelkultur

6.4.85 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 3-3

Strukturformel:



Y.l.	Ø 2034K1 2035K2	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045
SL 3-3 [$\mu\text{g/ml}$]*	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	131.5	127.7	141.0	139.3	132.1	140.7	116.4	120.1	106.0	81.0	5.6



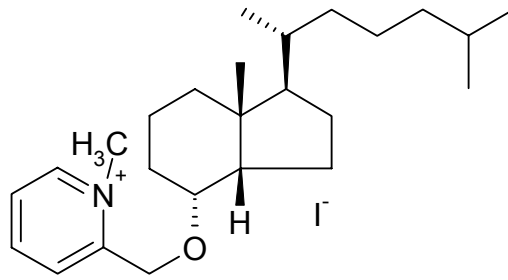
EC_{50} : ~ 3.2 $\mu\text{g/ml}$

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

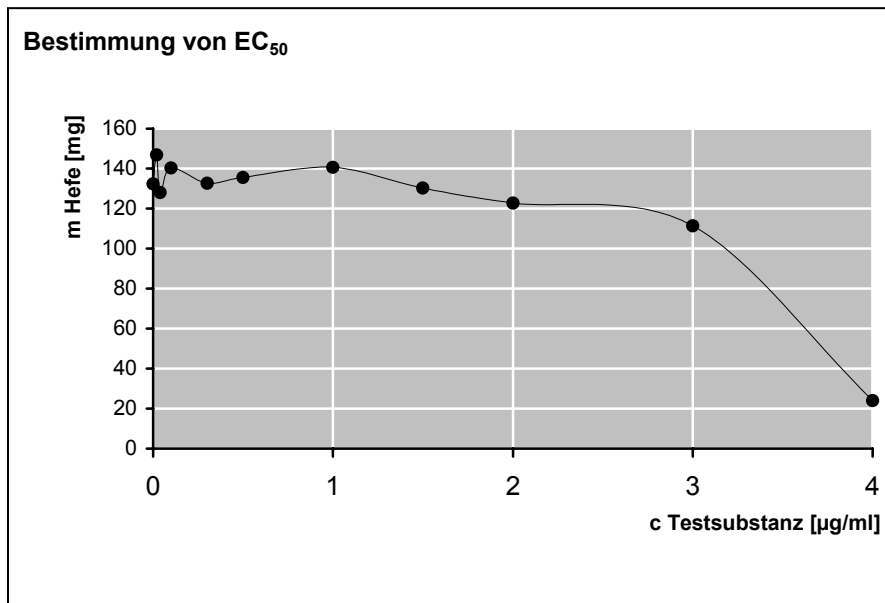
* In Schüttelkultur

6.4.86 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 4-2

Strukturformel:



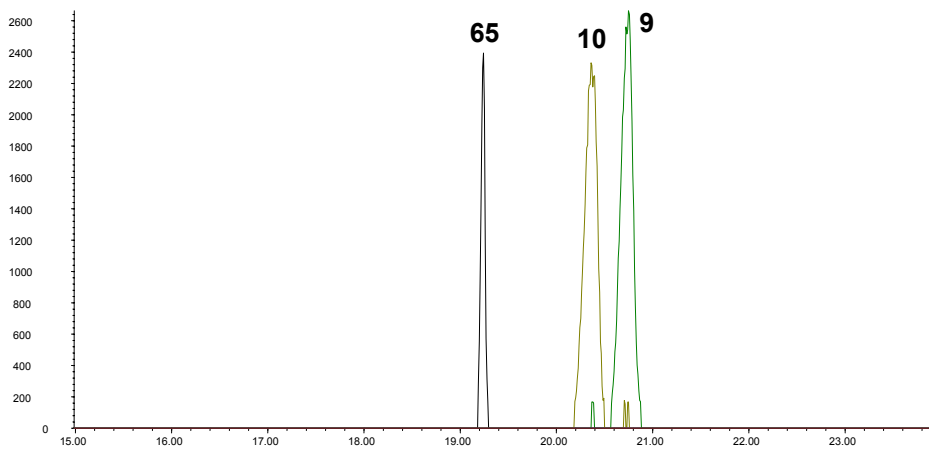
Y.l.	∅ 1821K1 1822K2	1833	1834	1835	1836	1837	1838	1839	1840	1841	1842
SL 4-2 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	132.3	146.9	128.0	140.4	132.7	135.6	140.6	130.3	122.7	111.4	24.0



EC₅₀: EC₅₀: ~ 3.5 µg/ml

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

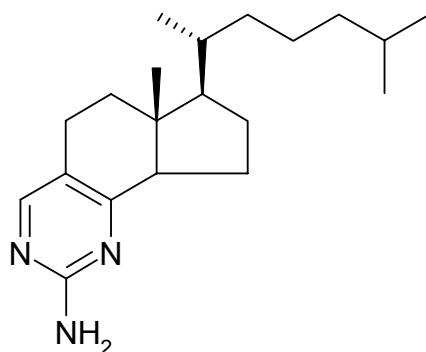
Abundance



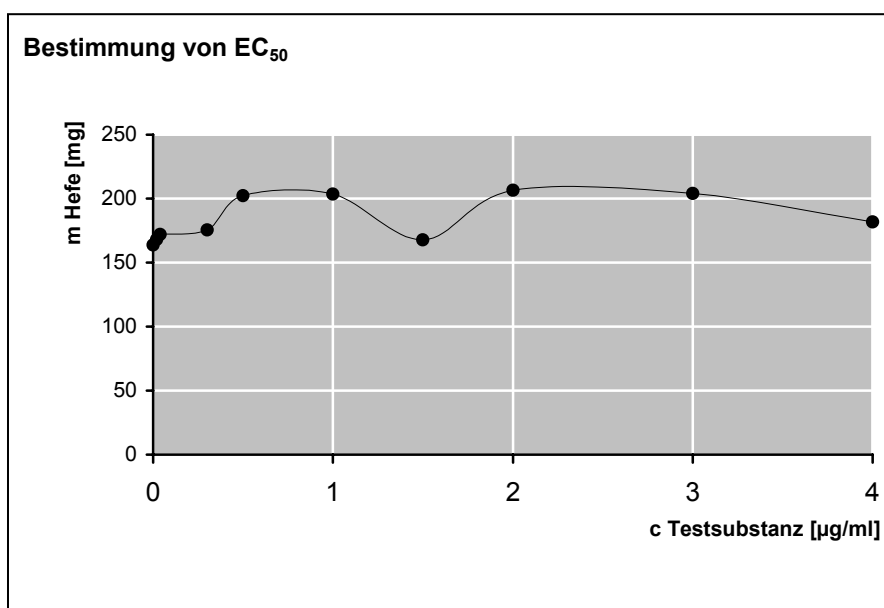
Time-->

6.4.87 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 5-1

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1853K1 1854K2	1855	1856	1857	1858	1859	1860	1861	1862	1863	1864
SL 5-1 [$\mu\text{g/ml}$]*	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	163.7	168.0	172.0	67.6	175.6	202.2	203.6	167.7	206.6	203.9	181.8



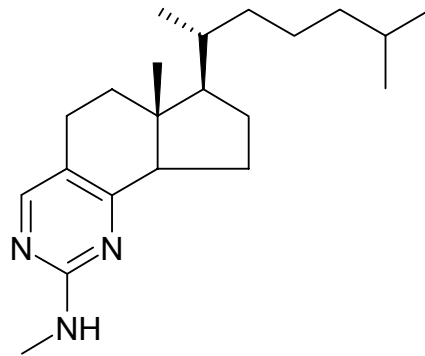
EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

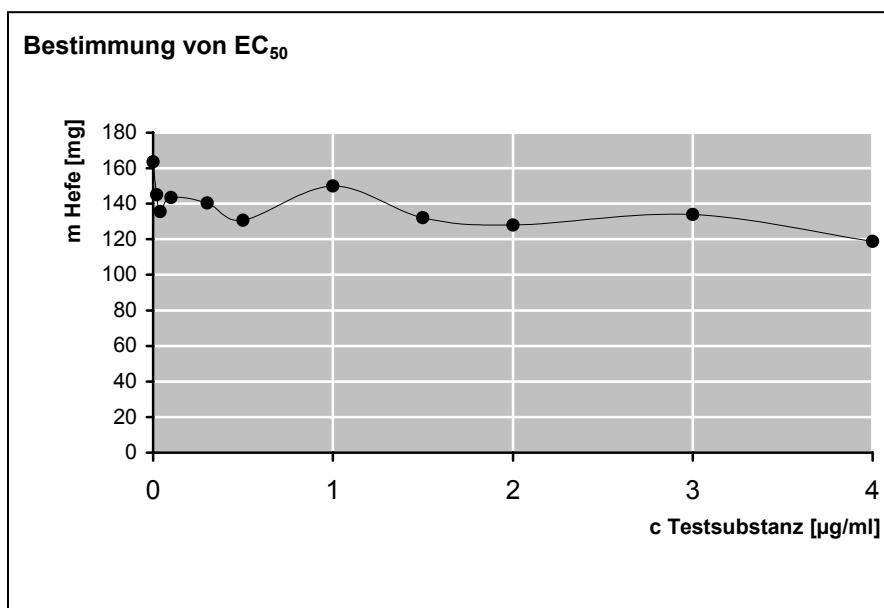
* In Schüttelkultur

6.4.88 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 5-2

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1853K1 1854K2	1865	1866	1867	1868	1869	1870	1871	1872	1873	1874
SL 5-2 [$\mu\text{g/ml}$]*	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	163.7	145.1	135.6	143.4	140.4	130.7	150.0	132.1	127.9	133.9	118.8



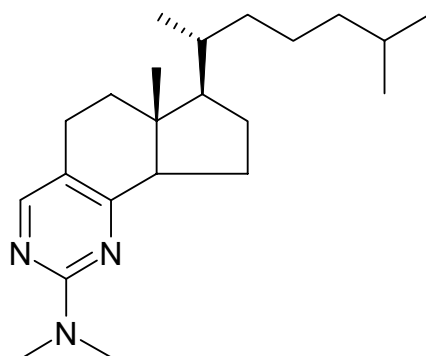
EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

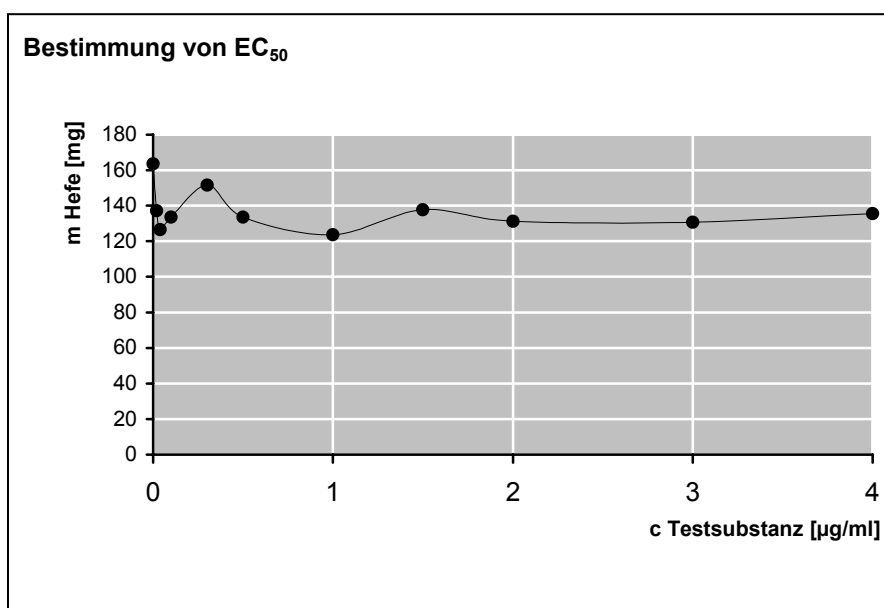
* In Schüttelkultur

6.4.89 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL 5-3

Strukturformel:



Y.l.	Ø 1853K1 1854K2	1875	1876	1877	1878	1879	1880	1881	1882	1883	1884
SL 5-3 [$\mu\text{g/ml}$]*	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	163.7	137.1	126.6	133.5	151.5	133.5	123.6	137.7	131.2	130.7	135.5



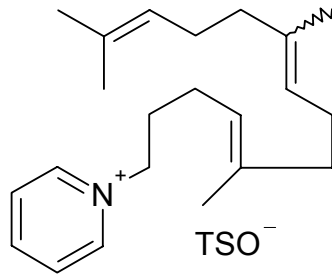
EC_{50} : Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

* In Schüttelkultur

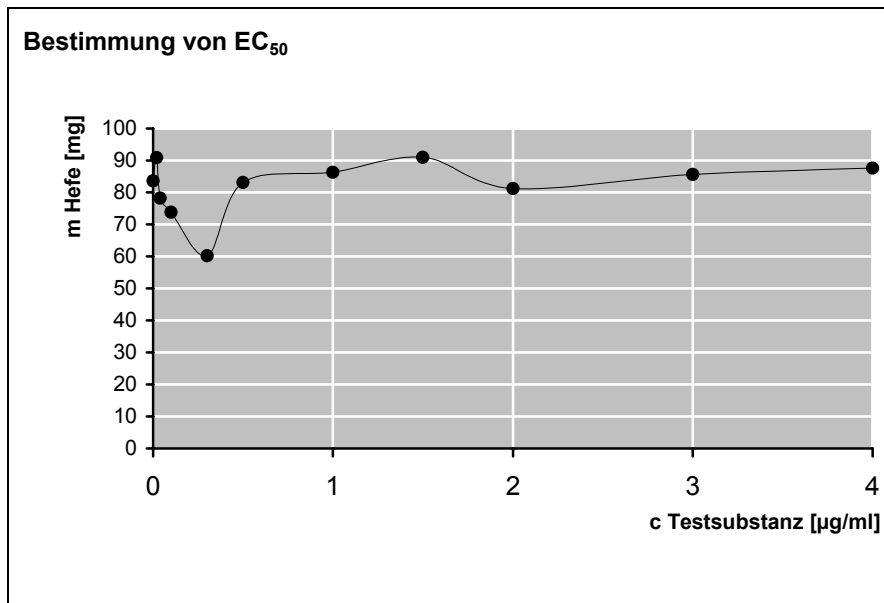
6.4.90 Inkubation von *Yarrowia lipolytica* mit SL N4

Strukturformel:



Lit.: Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 4, No. 1, pp. 97-103, 1996

Y.l.	∅ 1537K1 1538K2	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536
SL N4 [µg/ml]	0.00	0.02	0.04	0.10	0.30	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00
Trockengewicht [mg]	83.6	90.9	78.2	73.8	60.2	83.1	86.3	91.0	81.2	85.6	87.6



EC₅₀: Keine Reduktion des Wachstums feststellbar

Inhibitionstyp: Keine Bestimmung möglich

Verzeichnis der Abkürzungen

Å	<i>Angström</i>
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
APCI	<i>atomic pressure chemical ionisation</i>
aromat.	Aromatisch
atm	<i>atmospheres</i> (physikalische Atmosphäre = 1.01325 bar)
Ber.	Berichtet
benzyl.	benzylisch
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CI	<i>chemical impact ionisation</i> (chemische Ionisation)
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
DAD	<i>diode array detector</i>
DCM	Dichlormethan
d	Dublett
dd	Doppeldublett
ddd	Dublett vom Doppeldublett
δ	chemische Verschiebung [ppm]
DC	Dünnschichtchromatographie
d. h.	das heißt
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	Hexadeuterodimethylsulfoxid
EI	<i>electron impact ionisation</i> (Elektronenstossionisation)
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FSC	Flashsäulenchromatographie
g	Gramm
Gef.	Gefunden
HEI	<i>high energy intermediate</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond coherence</i>

HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatograph(ie)
Hz	Hertz
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante [Hz]
KOH	Kaliumhydroxid-Lösung
m	Multiplett
mg	Milligramm
ml	Milliliter
m/z	Masse pro Ladungseinheit
CD ₃ OH	1,1,1-Trideuteromethanol
MS	Massenspektrometrie
ν	Wellenzahl [cm ⁻¹]
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (kernmagnetische Resonanz)
PPA	Polyphosphorsäure
ppm	<i>parts per million</i>
s	Singulett
SBI	Sterol-Biosynthese-Inhibitor
Smp.	Schmelzpunkt [°C]
SOP	<i>standard operating procedure</i> (Arbeitsvorschrift)
SPE	<i>solid phase extraction</i> (Festphasenextraktion)
t	Triplett
<i>tert.</i>	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
TIC	<i>total ion chromatogramm</i>
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
XIC	<i>extracted ion chromatogram</i>
z. B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- ¹ E. Zinser, F. Paltauf, G. Daum, *J. Bacteriol* **1993**, 175, 2853
- ² E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, M. Schäfer-Korting, *Arzneimittelwirkungen*, 8. Aufl., **2001**, S. 831, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart
- ³ R.T. Lorenz, W.M. Casey, L.W. Parks, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 6169
- ⁴ J.A. Urbina, S. Pekerar, H. Le, J. Patterson, B. Montez, E. Oldfield, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1238, 163
- ⁵ W.D. Nes, G.G. Janssen, F.G. Crumley, M. Kalinowska, T. Akihisa, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 300, 724
- ⁶ M. Ramgopal, K. Bloch, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, 80, 712
- ⁷ W.J. Pinto, R. Lozano, B.C. Sekula, W.R. Nes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 112, 47
- ⁸ R.S. Burden, D.T. Cooke, G.A. Carter, *Phytochemistry* **1989**, 28, 1791
- ⁹ S.R. Parker, W.D. Nes, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1992**, 497, 111
- ¹⁰ R.J. Rodriguez, C. Low, C.D.K. Bottema, L.W. Parks, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 837, 336
- ¹¹ J. M. Fostel, P.A. Lartey, *Drug Devel. Ther.* **2000**, 5, 25
- ¹² I. Abe, J.C. Tomesch, S. Wattanasin, G.D. Prestwich, *Nat. Prod. Rep.* **1994**, 11, 279
- ¹³ E.I. Mercer, *Prog. Lipid. Res.*, **1993**, 32, 357
- ¹⁴ D. Guo, A.T. Mangla, W. Zhou, M. Lopez, Z. Jia, S.D. Nichols, W.D. Nes in R. Bittman: *Subcellular Biochemistry Volume 28: Cholesterol: Its Functions and Metabolism in Biology and Medicine*, **1997**, S. 89, Plenum Press, New York
- ¹⁵ S. Lange, F. Bracher: *Novel azasecosteroid based antimicrobial agents*, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Regensburg **2004**
- ¹⁶ F. Bracher in: *Lokale Pilzinfektionen*, Schriftenreihe der Bayerischen Landesapothekerkammer **2001**, Heft 62, S. 47
- ¹⁷ G. Folkers, *Pharm. Ztg.* **1994**, 139, 267
- ¹⁸ R.I. Baloch, E.I. Mercer, *Phytochemistry* **1987**, 26, 663
- ¹⁹ M. Taton, P. Benveniste, A. Rahier, *Phytochemistry* **1987**, 26, 385
- ²⁰ M. Taton, P. Benveniste, A. Rahier, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 185, 605
- ²¹ P.G. Hartman, D. Sanglard, *Curr. Pharm. Design* **1997**, 3, 177
- ²² T. Kuchta, C. Leka, P. Farkas, H. Bujdakova, E. Belajova, N.J. Russell, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 1538

-
- ²³ D. Debieu, J. Bach, M. Hougon, C. Malosse, P. Leroux, *Pest. Manag. Sci.* **2001**, *57*, 1060
- ²⁴ M. Gans, Synthese des antimykotisch aktiven Steroid-Alkaloids Plakinamin B - Azasteroide als Inhibitoren der Sterol-C-24-Methyltransferase, Dissertationsschrift, München, **2001**
- ²⁵ R. Gordee, T. Butler, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 112
- ²⁶ R. Smith, D. Shay, N. Doorenbos, *J. Bacteriol.* **1963**, *85*, 1295
- ²⁷ N. Doorenbos, J. Brown, *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60*, 1234
- ²⁸ J. Burbiel, F. Bracher, *Steroids* **2003**, *68*, 587
- ²⁹ H. Aboul-Enein, N. Doorenbos, *Pharm. Acta Helv.* **1974**, *49*, 320
- ³⁰ N. Doorenbos, W. Solomons, *J. Pharm. Sci.* **1973**, *62*, 638
- ³¹ A. Rahier, M. Taton, P. Schmitt, P. Benviste, P. Place, C. Anding, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1223
- ³² M. Taton, P. Benviste, A. Rahier, *Pure & Appl. Chem.* **1987**, *59*, 287
- ³³ J. C. Daab, Synthese und biologische Aktivität von Indolizidinium- und Chinolizidinium-Alkaloiden, Dissertationsschrift, Braunschweig, **2001**
- ³⁴ J. C. Burbiel, 2-Azabicyclo[5.3.0]decane und weitere Azasteroidanaloga als neuartige Antimykotika, Dissertationsschrift, München, **2001**
- ³⁵ N. Salman, Azasecosteroids as New Ergosterol Biosynthesis Inhibitors, Dissertationsschrift, München, **2003**
- ³⁶ L. Parks, R. Rodriguez, *Biochem. Soc. Trans.* **1983**, *11*, 656
- ³⁷ J. Müller, Analytik von freien Sterolen und Entwicklung einer Screening-Methode zur Charakterisierung des Inhibitionsverhaltens neuer Sterolbiosyntheseinhibitoren, Dissertationsschrift, München, **2002**
- ³⁸ B. Caprathe, J. Jaen et al., *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2736
- ³⁹ R. Lyle, G. Heavner, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 50
- ⁴⁰ K. Konno, K. Ojima et al., *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1120
- ⁴¹ Buu-Hoi, J. Lecocq, *Compt. rend.* **1946**, 222 1441
- ⁴² F. Bracher, T. Litz, *J. prakt. Chem.* **1996**, 338, 386
- ⁴³ S. Kim, C. Oh, J. Ko, K. Ahn, Y. Kim, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1927
- ⁴⁴ A. El-Barbary, S. Carlsson, S. Lawesson, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 405
- ⁴⁵ J. Vill, T. Steadman, J. Godfrey, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 2780
- ⁴⁶ R. Shabana, S. Scheibye, K. Clausen, S. Olesen, S. Lawesson, *Nouv. J. Chim.* **1980**, *4*, 47
- ⁴⁷ M. Cava, M. Levinson, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 5061

-
- ⁴⁸ R. Cherkasov, G. Kuttyrev, A. Pudovik, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 2567
- ⁴⁹ E. Knott, *J. Chem. Soc.* **1955**, 916
- ⁵⁰ K. Shiosaki, G. Fels et al., *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3230
- ⁵¹ Y. Tsuda, T. Ohshima et al., *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 500
- ⁵² J. Hasserodt, K. Janda, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11237
- ⁵³ R. Brown, D. Lustgarten, R. Stanaback, R. Meltzer, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1489
- ⁵⁴ H. Lochte, A. Pittmann, *Tetrahedron* **1960**, *82*, 469
- ⁵⁵ P. Kocięński, *Protecting Groups* (Georg Thieme Verlag Stuttgart) **1994**, *1. Auflage*, 192
- ⁵⁶ P. Beak, W. Lee, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1109
- ⁵⁷ D. Knight, N. Lewis, A. Share, D. Haigh, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3673
- ⁵⁸ A. Meyers, G. Milot, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6652
- ⁵⁹ M. Kozłowski, Z. Xu, A. Santos, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4537
- ⁶⁰ C. Kuhn, L. Skaltsounis, C. Monneret, J.-C. Florent, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2585
- ⁶¹ H. Becker, W. Berger et al., *Organikum* (Johann Ambrosius Barth Verlag Heidelberg) **1996**, *20. Auflage*, 508 (für Wittig), 543 (für Grignard)
- ⁶² J. March, *Advanced Organic Chemistry* (Wiley-Interscience, New-York) **1992**, *5. Auflage*, 838
- ⁶³ J. Houben, T. Weyl, *Die Methoden der organischen Chemie* (Georg Thieme Verlag Stuttgart) **1952**, *8*, 663
- ⁶⁴ B. Desai, K. Fowler et al., *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2158
- ⁶⁵ M. Cook, E. Forbes, G. Khan, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1966**, 121
- ⁶⁶ S. Baldwin, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 3280
- ⁶⁷ T. Ishikawa, T. Mizuta et al., *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3702
- ⁶⁸ B. Jiang, Y.-G. Si, *Tetrahedron Let.* **2002**, *43*, 8323
- ⁶⁹ D. Reddy, M. Iqbal et al. *Tetrahedron Let.* **2002**, *43*, 8063
- ⁷⁰ R. Borch, M. Bernstein, H. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897
- ⁷¹ R. Rosser, D. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 5160
- ⁷² D. Renard, Unveröffentlichte Ergebnisse, München, **2004**
- ⁷³ A. Puzik, Die Chemie der Canthin-4-one, Dissertationsschrift, München, **2003**
- ⁷⁴ O. Kast, 1-Heteroaryl- β -carboline als neuartige Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen, Dissertationsschrift, München, **2003**

-
- ⁷⁵ F. Dombeck, Strukturmodifikationen an den antimikrobiell u. zytotoxisch aktiven Annonaceen-Alkaloiden Cleistopholin, Sampangin und Onychin, Dissertationsschrift, München, **2003**
- ⁷⁶ F. Bracher, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1994**, 327, 371
- ⁷⁷ J. Peterson, J. Zjawiony et al., *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4069
- ⁷⁸ E. Kirchisner, Das 2,7-Naphthyridin-Ringsystem als bioisotere Gruppe in antimikrobiell und zytostatisch wirksamen Verbindungen, Dissertationsschrift, München, **2004**
- ⁷⁹ G. Patani, E. LaVoie, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3147
- ⁸⁰ J. Gal, S. Dilmaghanian et al., *Chirality* **2004**, 16, 79
- ⁸¹ L. Rasoamiaranjanahary, A. Marston et al., *Phytochemistry* **2003**, 64, 543
- ⁸² E. Gößnitzer, A. Punkenhofer, *Monatsh. Chem.* **2003**, 134, 909

Lebenslauf

Christian Hantelmann

Geboren:

am 18. November 1972 in Wolfenbüttel

Nationalität, Familienstand:

deutsch, verheiratet mit Katja Hantelmann, geb. Wolz

Eltern:

Dr. rer. nat. Ortwin Hantelmann, Apotheker
Inhaber der *Bahnhof-Apotheke*
in Wolfenbüttel (bis April 2005)

Jutta Hantelmann, geb. Roth, Apothekerin
Inhaberin der *Apotheke im Fischzug*
in Salzgitter-Lebenstedt

Ausbildung:

1979 – 1982	Grundschule <i>Groß-Stöckheim</i>	Wolfenbüttel
1982 – 1983	Grundschule <i>Wilhelm-Raabe-Schule</i>	Wolfenbüttel
1983 – 1985	Orientierungsstufe <i>Ravensberger Straße</i>	Wolfenbüttel
1985 – 1992	Gymnasium <i>Große Schule</i>	Wolfenbüttel
1990	Sechsmonatiger Auslandsaufenthalt mit Besuch der <i>Wichita High School East</i>	Wichita / U.S.A.
1992	Abitur	Wolfenbüttel
1992 – 1993	Grundwehrdienst bei der Marine	Eckernförde, Flensburg, Wilhelmshaven
1994 – 1996	Ausbildung zum Bankkaufmann (Abschluß Januar 1996)	Hamburg
1996	<i>Deutsche Bank AG</i> , Filiale Grindel (Januar bis April)	Hamburg
1996 – 2000	Studium der Pharmazie <i>Bayerische Julius-Maximilian-Universität</i>	Würzburg
1998	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung	Würzburg
2000	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung	Würzburg
2000	Pharmaziepraktikant in der <i>Stern-Apotheke</i>	Tauberbischofsheim
2000 – 2001	Pharmaziepraktikant in der <i>SaniPlus-Apotheke</i>	München
2001	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung	München
seit 2001	Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik	Bayern
2001 – 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis Prof. Dr. Franz Bracher am Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung – der <i>Ludwig-Maximilians-Universität</i>	München
2005	Promotion zum Dr. rer. nat.	München
seit 2005	Inhaber der <i>Bahnhof-Apotheke</i>	Wolfenbüttel