

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



**Seitenkettenfunktionalisierte Steroide als Inhibitoren der
Ergosterol- und Cholesterolbiosynthese**

von

Sandra Hemmers

aus

Düsseldorf

2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Franz Bracher betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 29.02.2012

Sandra Hemmers

Dissertation eingereicht am 02.03.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Bracher
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus T. Wanner

Mündliche Prüfung am 20.04.2012

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bracher für die großzügige und wohlwollende Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Prüfungskommission, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Wanner für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Lars Allmendinger und seinem Team danke ich für die Aufnahme der NMR-, IR- und MS-Spektren sowie Herrn Schulz, Herrn Eicher und Frau Käser für die elementaranalytischen Untersuchungen. Für die Durchführung der Tests der biologischen Prüfung und Auswertung der Testergebnisse möchte ich mich herzlich bei Martina Stadler und Christoph Müller bedanken.

Für die wertvolle Unterstützung meiner praktischen Arbeit möchte ich mich herzlich bei Monika Klimt bedanken.

Herrn Prof. Dr. Severin möchte ich an dieser Stelle für wertvolle Tipps und Diskussionen danken.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen, vor allem dem Team des zweiten Semesters, für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit bedanken.

Meinen (ehemaligen) Laborkolleginnen Uschi Kopp und Melanie Krojer, die mir nicht nur den Laboralltag verschönert haben, sondern auch ihre Freundschaft geschenkt haben, gebührt mein ganz besonderer Dank.

Meinen Eltern und meiner Schwester Claudia möchte ich ganz besonders danken für den Rückhalt, die Unterstützung, das Vertrauen und die Liebe, die mir immer entgegengebracht werden. Besonders danken möchte ich an dieser Stelle auch Lukas, der immer für mich da ist.

Danke.

*Meinen Eltern
Joke & Ernst Hemmers*

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Steroidbiosynthese	3
1.1.2	Inhibitoren des Präsqualenabschnitts	9
1.2	Der Postsqualenabschnitt	11
1.2.1	Von Squalen bis Lanosterol	11
1.2.2	Inhibitoren der Squalenepoxidase und der Oxidosqualencyclase	14
1.2.3	Die Ergosterolbiosynthese ab Lanosterol	19
1.2.4	Inhibitoren des Postsqualenabschnitts der Ergosterolbiosynthese	21
1.2.5	Die Cholesterolbiosynthese ab Lanosterol	24
1.2.6	Inhibitoren des Postsqualen-Abschnitts der Cholesterolbiosynthese	26
1.3	Kovalent bindende und irreversible Inhibitoren	28
2	ZIELSETZUNG UND SYNTHESEPLANUNG	33
2.1	Zielsetzung	33
2.2	Syntheseplanung	42
3	SYNTHESEN	47
3.1	Synthese von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (3)	47
3.2	Synthese potentiell irreversibler Inhibitoren	49
3.2.1	Synthese der Disulfidderivate	49
3.2.2	Synthese der Thioester	51
3.2.3	Synthese der Epoxide	55

3.2.4	Synthese der Nitrile	58
3.2.5	Synthese der <i>Michael</i> -Systeme	60
3.2.6	Synthese der Pyrrolderivate	70
3.2.7	Synthese alternativer Heteroaromaten	76
3.3	Synthese TBDMS-geschützter Sterolderivate	79
3.4	Synthese potentieller Inhibitoren der C-22-Desaturase	83
3.4.1	Synthese der Azole	83
3.4.2	Synthese der Hydroxamsäurederivate	88
3.5	Synthese potentieller Inhibitoren der Δ^{24}-Reduktase	90
4	BIOLOGISCHE PRÜFUNG	99
4.1	Agar-Diffusionstest	99
4.1.1	Testergebnisse	100
4.1.2	Diskussion der Testergebnisse	103
4.2	MTT-Test	104
4.2.1	Testergebnisse	105
4.2.2	Diskussion der Testergebnisse	106
4.3	Ergosterolbiosynthese-Assay	107
4.3.1	Testergebnisse	108
4.3.4	Diskussion der Testergebnisse	110
4.4	Cholesterolbiosynthese-Assay	113
4.4.1	Testergebnisse	114
4.4.2	Diskussion der Testergebnisse	115
4.5	Aktivitätsbestimmung von Testsubstanzen	115

5	ZUSAMMENFASSUNG	123
5.1	Synthesen	124
5.2	Biologische Prüfung	134
6	EXPERIMENTELLER TEIL	137
6.1	Geräte und Parameter	137
6.2	Synthesevorschriften	141
6.2.1	(3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (3)	141
6.2.2	(3S,20S)-20-Cyanopregn-7-en-3-ylacetat (4)	142
6.2.4	(3S,20S)-20-Oxiranylpregn-7-en-3-ylacetat (5)	143
6.2.3	(3S,20S)-20-Brommethylpregn-7-en-3-ylacetat (7)	144
6.2.5	(3S,20S)-20-(Acetylthiomethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (9)	145
6.2.6	(3S,20S)-20-Thiomethylpregn-7-en-3-ol (10)	147
6.2.7	(3S,20S)-3-Acetoxypregn-7-en-20-yl-methansäurechlorid (11)	148
6.2.8	(<i>E</i>)-((3S,20S)-3-Acetoxypregn-7-en-20-yl)-but-2-en-1-on (12)	149
6.2.9	(3S,20S)-20-[1-(2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrolyl)-methyl]-pregn-7-en-3-ol (14)	151
6.2.10	(3S,20S)-20-(Imidazol-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (18)	152
6.2.11	(3S,20S)-20-(1,2,4-Triazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (19)	154
6.2.12	(3S,20S)-20-(Imidazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (20) und (3S,20S)-20-(Imidazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ol (81)	155
6.2.13	(3S,20S)-20-(Hydroxycarbamoyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (21)	158
6.2.14	Synthese der unsymmetrischen Disulfide 22 - 26	159
6.2.15	(3S,20S)-20-(1-Hydroxyeth-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (29)	166
6.2.16	(3S,20S)-20-(1-Acetylthioeth-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (30)	167
6.2.17	(3S,20S)-20-(1-Thioeth-2-yl)-pregn-7-en-3-ol (31)	169

6.2.18	(3S,20S)-20-[1-(Pyridin-2-yl)-disulfanyleth-2-yl]-pregn-7-en-3-ol (32)	170
6.2.19	Synthese der Thioester 33 - 35	172
6.2.20	(3S,20S)-20-((<i>E</i>)-Prop-1-enyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (36)	176
6.2.21	(3S,20S)-20-(3-Methyloxiran-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (37)	177
6.2.22	(3S,20S)-20-Cyanomethylpregn-7-en-3-ylacetat (38)	178
6.2.23	(3S,20S)-20-(Propenoyloxymethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (39)	179
6.2.24	(3S,20S)-20-((<i>E</i>)-But-2-enoyloxymethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (40)	181
6.2.25	(3S,20S)-20-[(<i>E</i> -2-Methylbut-2-enoyloxy)-methyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (41)	183
6.2.26	(3S,20S)-20-(Formyloxymethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (42)	184
6.2.27	(<i>E</i>)-(3S,20S)-20-(<i>N,N</i> -Dimethylamino-1,4-dioxobut-2-enylcarboxymethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (43)	186
6.2.28	(3S,20S)-20-((<i>E</i>)-4-Ethoxy-1,4-dioxobut-2-enylamino)-pregn-7-en-3-yl-acetat (44)	188
6.2.29	(3S,20S)-20-((<i>E</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-ethoxy-1,4-dioxobut-2-enylamino)-pregn-7-en-3-yl-acetat (45)	189
6.2.30	(3S,20S)-20-(Aminomethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (46)	191
6.2.31	(<i>E</i>)-3-Dimethylcarbamoylacrylsäureethylester (48)	193
6.2.32	(<i>E</i>)-3-Dimethylcarbamoylacrylsäure (49)	194
6.2.33	(3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-yl- <i>tert</i> -butyldimethylsilylether (51)	195
6.2.34	(3S,20S)-20-(1-Hydroxyprop-2-en-1-yl)-pregn-7-en-3-yl- <i>tert</i> -butyl-di-methylsilyl-ether (52)	197
6.2.35	(3S,20S)-20-(1-Oxoprop-2-en-1-yl)-pregn-7-en-3-ol (54)	198
6.2.36	(3S,20S)-20-Iodmethylpregn-7-en-3-ylacetat (58)	200

6.2.37 (3S,20S)-20-[(2-Formylpyrrol-1-yl)-methyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (59) und (3S,20S)-20-[(2-Formylpyrrol-1-yl)-methyl]-pregn-7-en-3-ol (60)	201
6.2.38 (E)-3-{1-[(3S,20S)-(3-Acetylpregn-7-en-20-yl)-methyl]-2-formyl-1 <i>H</i> -pyrrol-5-yl}-2-cyano-propensäureethylester (61)	204
6.2.39 2-[1-((3S,20S)-3-Acetylpregn-7-en-20-yl)-oxomethyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-5-carbaldehyd (62)	206
6.2.40 5-Ethylfuran-2-carbaldehyd (63)	207
6.2.41 5-Propylthiophen-2-carbaldehyd (64)	208
6.2.42 Reduktion der heteroaromatischen Aldehyde	209
6.2.43 Reduktion der stannylierten heteroaromatischen Aldehyde	211
6.2.44 Acylierung der 5-stannylierten Heteroaromaten nach <i>Stille</i>	213
6.2.45 [5-(Dimethyl-hydrazonomethyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl]-methanol (76)	216
6.2.46 Ergosteryl- <i>tert</i> -butyldimethylsilylether (77)	217
6.2.47 5 <i>α</i> ,6-Dihydroergosteryl- <i>tert</i> -butyldimethylsilylether (78)	219
6.2.48 (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ol (79)	220
6.2.49 (3S,20S)-20-(1,2,4-Triazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ol (80)	222
6.2.50 (3S,20S)-20-(1 <i>H</i> -Imidazolin-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (82)	223
6.2.51 (3S,20S)-20-(2-Aminoethylaminocarbonyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (83)	225
6.2.52 (3S,20S)-20-(Methoxyaminocarbonyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (84)	226
6.2.53 (3S,20S)-20-(Ethoxyaminocarbonyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (85)	228
6.2.54 (3S, 20S)-3-Hydroxypregn-7-en-20-yl-methansäuremethylester (86)	229
6.2.55 Propionsäure-[(3S,20S)-3-acetoxypregn-7-en-20-yl]-methylester (87)	230
6.2.56 Butansäure-[(3S,20S)-3-acetoxypregn-7-en-20-yl]-methylester (88)	232

6.2.57	(3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäureallylester (89)	234
6.2.58	(3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäurebut-2-enylester (90)	236
6.2.59	Synthese der sekundären Amide nach <i>Tanabe</i> ¹⁰²	237
6.2.60	Synthese der tertiären Amide nach <i>Tanabe</i> ¹⁰²	241
6.2.61	(3S,20S)-20-[(Dimethylamino)-acetoxy methyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (96)	244
6.2.62	(3S,20S)-20-[(Dimethylamino)-acetoxy methyl]-pregn-7-en-3-ol (97)	246
6.2.63	(3S,20S)-20-[<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(2-methylpropyl)-aminocarbonyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (98) und (3S,20S)-20-(<i>N,N</i> -Dimethylamino-carbonyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (99)	247
6.2.64	(3S,20S)-20-(1-Hydrazonemethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (100)	250
6.3	Testmethoden der biologischen Prüfung	252
6.3.1	Agar-Diffusionstest	252
6.3.2	MTT-Test	253
6.3.3	Ergosterolbiosynthese-Assay	254
6.3.3.1	Inkubation mit Testsubstanzen	254
6.3.3.2	Bestimmung der MHK	255
6.3.3.3	Aufschluss der Zellen und Extraktion der Sterole	255
6.3.3.4	Identifizierung des inhibierten Enzyms ⁷⁴	256
6.3.4	Cholesterolbiosynthese-Assay ¹⁶²	257
6.3.4.1	Herstellung der Substanzlösungen	257
6.3.4.2	Inkubation	257
6.3.4.3	Aufschluss der Zellen und Extraktion der Sterole	257
6.3.4.4	Aufschluss der Zellen und Extraktion der Sterole	258
6.3.5	Aktivitätsbestimmung bezogen auf die Gesamtcholesterol-biosynthese	258

6.3.6	Proteinbestimmung nach <i>Bradford</i>	260
6.3.6.1	Erstellen der Kalibriergeraden	260
6.3.6.2	Vermessung der Probenlösung	260
7	ANHANG	261
7.1	Abkürzungsverzeichnis	261
7.2	Abbildungsverzeichnis	264
7.3	Tabellenverzeichnis	272
7.4	Formelverzeichnis	273
7.5	Literaturverzeichnis	273

1 EINLEITUNG

Sterole werden von den meisten Eukaryoten synthetisiert und finden sich vorwiegend in der Lipiddoppelschicht von Zellmembranen, wo ihre Hauptfunktion die Regulierung der Membranfluidität und -durchlässigkeit ist.^{1,2} Strukturelle und funktionelle Äquivalente in prokaryotischen Zellen, in denen bisher keine Sterole nachgewiesen werden konnten, sind pentacyclische Triterpene wie Hopen oder Diploterol. Cholesterol ist das Hauptsterol von Tieren, während Pilze hauptsächlich Ergosterol synthetisieren. In höheren Pflanzen findet man anstelle eines Hauptsterols ein Gemisch von drei verschiedenen Sterolen: Campesterol, Sitosterol und Stigmasterol.³ Bei Protozoen, vor allem bei Trypanosomatida, hängt die Zusammensetzung endogener Sterole stark von der Spezies und vom Lebenszyklus ab.^{1,4} Allgemein sind die von den verschiedenen Organismen synthetisierten Triterpene die Ausgangsverbindungen für sämtliche Hopanoide und Steroide, einschließlich der Gallensäuren und Steroidhormone. Tierische Steroidhormone (Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene und Östrogene) haben einen großen Anteil an der Regulation von Zellwachstum, -entwicklung, -differenzierung und -homöostase.⁵ Die Signale werden mechanistisch unterschiedlich über spezifische intrazelluläre Steroidrezeptoren übertragen und regulieren so auch diverse physiologische Funktionen wie Reproduktion, Mineralstoffwechsel, sexuelle Entwicklung und Funktion, Entzündungs- und Stressreaktion, neuronale Funktionen und verschiedene metabolische Prozesse.⁵ Steroidhormone werden hauptsächlich in den Nebennieren als Antwort auf gewebespezifische Hormone aus Cholesterol synthetisiert. Diese steroidogenen Gewebe sind einzigartig, da sie Cholesterol nicht nur für Membran-Biogenese, Erhaltung der Membranfluidität und Signaltransduktion benötigen, sondern auch als Edukt der Steroidhormon-Biosynthese.⁶ Die bis dato über 50 verschiedenen identifizierten steroidalen Phytohormone, unter dem Begriff der Brassinosteroide zusammengefasst, sind ebenfalls essentielle chemische Signale, die Wachstum und Entwicklung steuern.^{7,8,9} Sitosterol ist also nicht nur integraler Bestandteil der Lipiddoppelschicht höherer Pflanzen sondern auch eine

Vorstufe der ubiquitären Brassinosteroide.¹⁰ Auch in Pilzen konnten Steroidhormone nachgewiesen werden, wie beispielsweise die Sexualhormone Antheridiol und Oogoniol in *Achlya ambisexualis*.¹¹ Außerdem wird Ergosterol im Pilz nicht nur für die Membranfluidität und -durchlässigkeit benötigt sondern auch in geringen Konzentrationen als Wachstumspromotor.¹² Die Anwesenheit von Steroid-bindenden Proteinen in etlichen Pilzen lässt die Annahme zu, dass noch weitere Steroidhormone in Pilzen vorkommen könnten.¹³

Verschiedene Krankheiten, wie beispielsweise das Conradi-Hünermann-Syndrom oder das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom, werden durch Gendefekte, die eine fehlerhafte Cholesterolsynthese induzieren, ausgelöst.¹⁴ Es gibt einige gemeinsame phänotypische Merkmale der verschiedenen Krankheiten, die mit auffälligen Missbildungen und dysmorphen Fazies einhergehen. Dies deutet auf einen potenzen teratogenen Effekt bei Störungen der Cholesterolsynthese und damit auch auf die enorme Bedeutung des Cholesterols für die mammale Entwicklung hin.¹⁵ Ebenso mit der Cholesterolsynthese assoziiert ist die Arteriosklerose, die Ursache koronarer Herzerkrankung. Dabei werden durch hohe LDL- und Cholesterol-Konzentration im Blut Lipide in den glatten Muskelzellen der inneren Arterienwand eingelagert (arteriosklerotische Plaques).¹⁶ Eine weitere mit einer Störung der Cholesterolsynthese verbundene Krankheit ist die Addison-Krankheit, eine Autoimmunerkrankung. Dabei kommt es zu Hyperglykämie und Muskelschwäche, Na^+ -Verlust und K^+ -Retention. Als Folge davon machen sich erhöhte Stressanfälligkeit und verminderte Herztätigkeit bemerkbar.¹⁷ Auch bei der Ausprägung neurodegenerativer Krankheiten wie Morbus Alzheimer oder der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit spielt Cholesterol durchaus eine Rolle.¹⁸ Aufgrund der enormen physiologischen Bedeutung der Triterpene ist nachvollziehbar, dass Steroide und andere polycyclische Triterpene seit über hundert Jahren im Fokus der Wissenschaft stehen. Vor allem Cholesterol fasziniert Forscher schon lange und für Strukturaufklärung, Biosynthesewege und deren metabolische Regulation wurden bereits 13 Nobelpreise vergeben.¹⁹

Inhibitoren der verschiedenen Biosynthesewege der Triterpene sind demnach von großem Interesse für die Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe. Da sich die Enzyme der Sterolsynthese in verschiedenen Organismen unterscheiden, ist es möglich,

selektiv in die Biosynthesen einzugreifen. Durch Eingriff in die Cholesterolsynthese ergeben sich Möglichkeiten zur Senkung des Serumcholesterolspiegels und damit zur Behandlung der Hypercholesterinämie oder auch Ansätze zur Behandlung von anderen Cholesterolsynthese-assoziierten Erkrankungen. Von einigen Sterolsynthese-Inhibitoren konnte *in vivo* antibiotische Wirkung^{20,21} und antimikrobielle Aktivität *in vitro*²² gezeigt werden. Erkrankungen durch schädliche Pilze oder Protozoen können durch selektive Hemmung der Ergosterolsynthese behandelt werden. Gerade durch die kontinuierlich steigende Anzahl immunsupprimierter Patienten werden Infektionen mit opportunistischen Pilzen ein schwerwiegendes Problem von steigender Bedeutung.

1.1 Steroidsynthese

Steroide sind Derivate von 1,2-Cyclopentanoperhydrophenanthren und gehören in die Klasse der Triterpene. Tragen sie an C-3 eine Hydroxyfunktionen werden sie als Sterole bezeichnet. Die Biosynthese der tetracyclischen Naturstoffe verläuft über einen komplexen Weg, der in einen Präsqualen- und einen Postsqualenabschnitt unterteilt ist. Trotz der unterschiedlichen Endprodukte werden von allen Organismen Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) als gemeinsame C₅-Bausteine genutzt. Sechs dieser Isopreneinheiten werden zu dem linearen Triterpen Squalen kondensiert, das von Prokaryoten direkt zu den pentazyklischen Hopanoiden zyklisiert wird (Abbildung 1). Eukaryoten setzen Squalen zu 2,3-Oxidosqualen (Oxidosqualen) um, das anschließend in einer komplexen enzymkatalysierten Zyklierung zu den tetracyclischen Zwischenstufen der Sterolsynthese umgesetzt wird. Die Sterolsynthese verzweigt sich hier abhängig von den verschiedenen Gattungen.²³ Während höhere Pflanzen Oxidosqualen zu Cycloartenol umsetzen synthetisieren Tiere, Pilze und Protozoen Lanosterol.

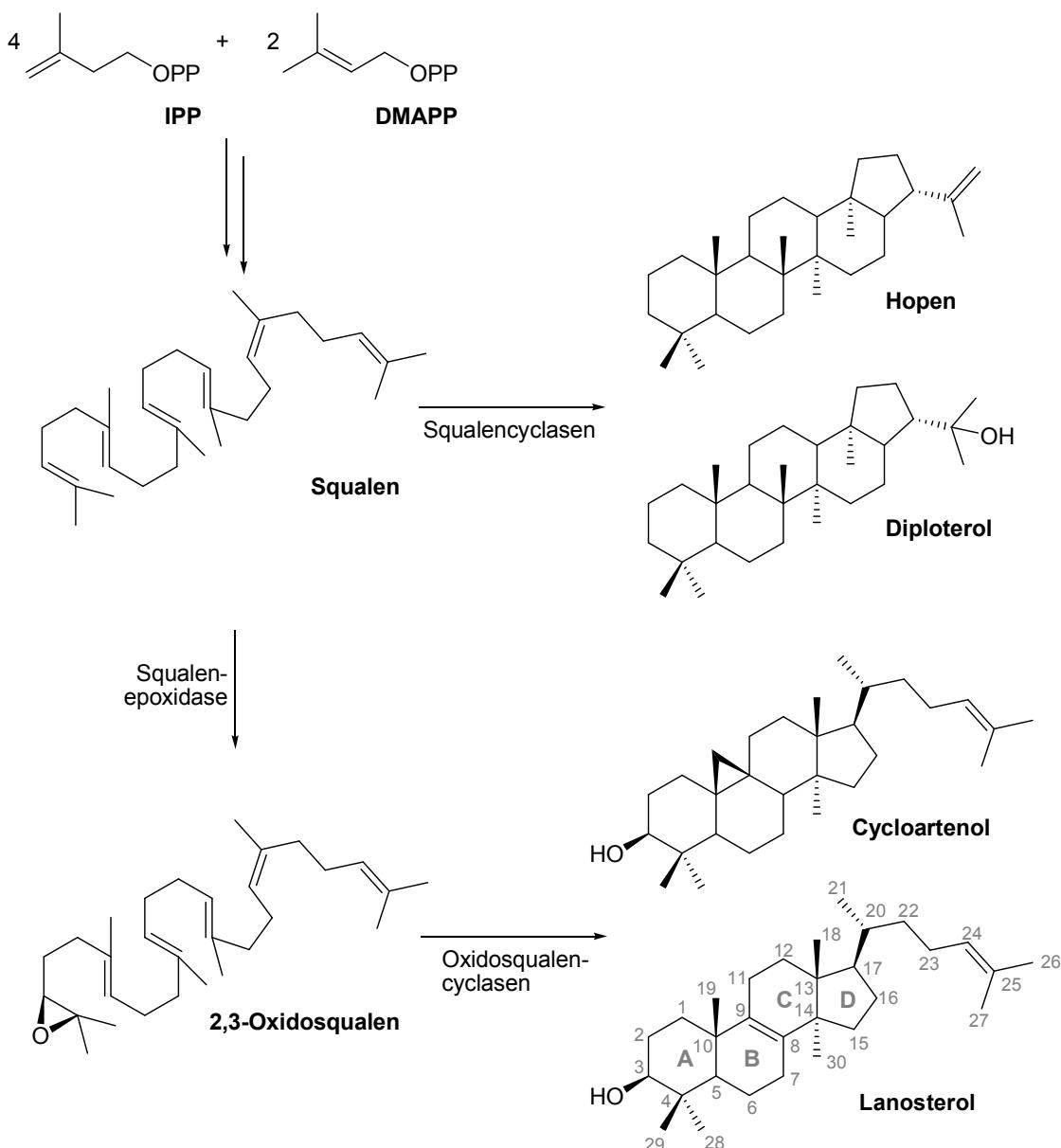


Abbildung 1: Verzweigung der Triterpenbiosynthesen durch die Cyclasen und Nummerierung von Sterolen nach IUPAC am Beispiel von Lanosterol

Höhere Pflanzen setzen in mehreren enzymkatalysierten Schritten Cycloartenol zu den verschiedenen Phytosterolen um. Lanosterol wird von den verschiedenen Gattungen unterschiedlich umgesetzt. Während Tiere Cholesterin und Pilze sowie Trypanosomatida Ergosterol und andere C-24-alkylierte Sterolderivate synthetisieren, setzen Protozoen Lanosterol zu verschiedenen Derivaten eines spezifischen C₂₈-beziehungsweise C₂₉-Grundkörpers um (Abbildung 2).

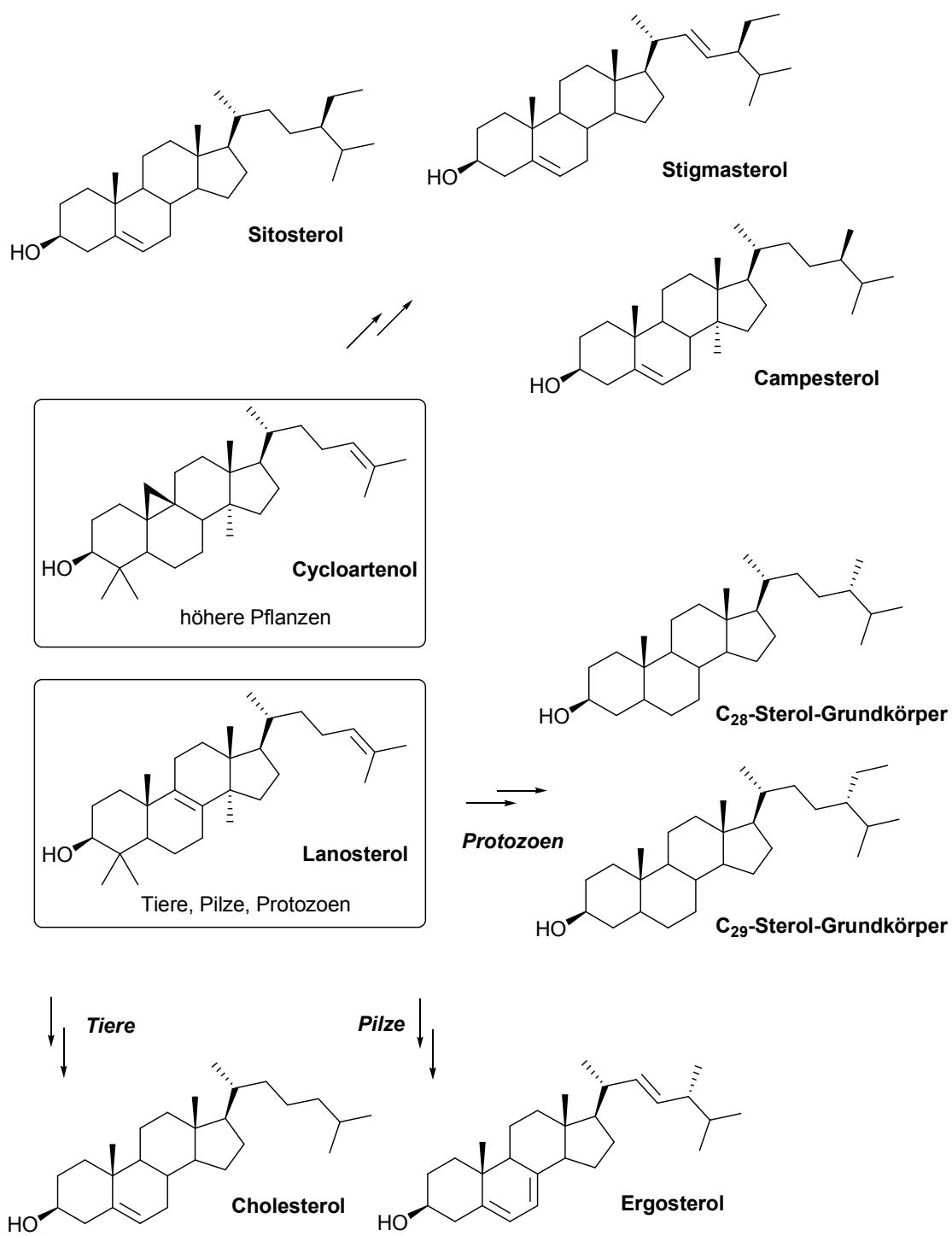


Abbildung 2: Übersicht der Sterolbiosynthese ausgehend von Lanosterol/Cycloartenol (vereinfacht)

Die Sterole der verschiedenen Gattungen werden also offensichtlich über verschiedene Biosynthesewege dargestellt, so dass die spezifischen Enzyme der verschiedenen Wege attraktive Targets für die Entwicklung selektiver Inhibitoren sind.²⁴

1.1.1 Der Präsqualenabschnitt

In den meisten Prokaryoten und Eukaryoten erfolgt die Biosynthese der aktivierte Isopreneinheiten Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) aus drei Molekülen Acetyl-CoenzymA (Acetyl-CoA) über Mevalonat (Abbildung 3).

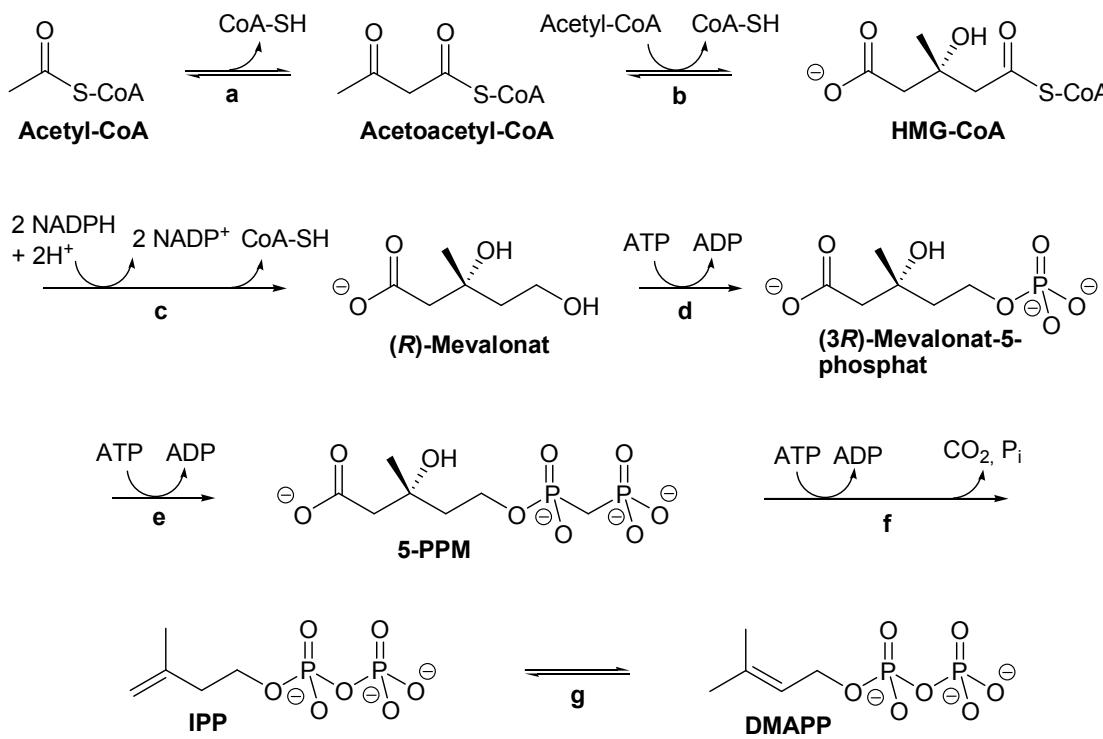


Abbildung 3: Biosynthese der aktivierte Isopreneinheiten im Mevalonatweg

Der Start dieses Biosynthesewegs ist die Bildung von Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA (HMG-CoA) katalysiert durch die Acetyl-CoA-Acetyltransferase (**a**) und die HMG-CoA-Synthase (**b**) aus drei Acetyl-CoA. HMG-CoA wird durch die HMG-CoA-Reduktase (**c**) in einer NADPH-abhängigen Reduktion zum analogen Alkohol (*R*)-Mevalonat umgesetzt. (*R*)-Mevalonat wird an der primären Hydroxy-Gruppe durch die Mevalonat-5-phosphotransferase (**d**) unter Verbrauch von ATP zum (*3R*)-Mevalonat-5-phosphat phosphoryliert, das durch die Phosphorylmevalonat-Kinase (**e**) unter Verbrauch eines weiteren ATPs zum entsprechenden Pyrophosphat (*3R*)-5-Pyrophosphorylmevalonat (5-PPM) umgesetzt wird. Der letzte Schritt zum Erhalt von IPP ist die ATP-abhängige Decarboxylierung und Dehydratisierung des 5-PPM durch die Pyrophosphorylmevalonat-Decarboxylase (**f**). IPP kann durch die Isopentenyl-

pyrophosphat-Isomerase (g) direkt zu DMAPP isomerisiert werden. Neben diesem klassischen Bloch-Lynen-Weg wurde von Rohmer und Arigona ein weiterer Biosyntheseweg der Isoprenoide entdeckt.²⁵ Höhere Pflanzen, verschiedene Bakterien und Protozoen bauen DMAPP und IPP über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) aus Pyruvat und Glycerinaldehyd auf (Abbildung 4).

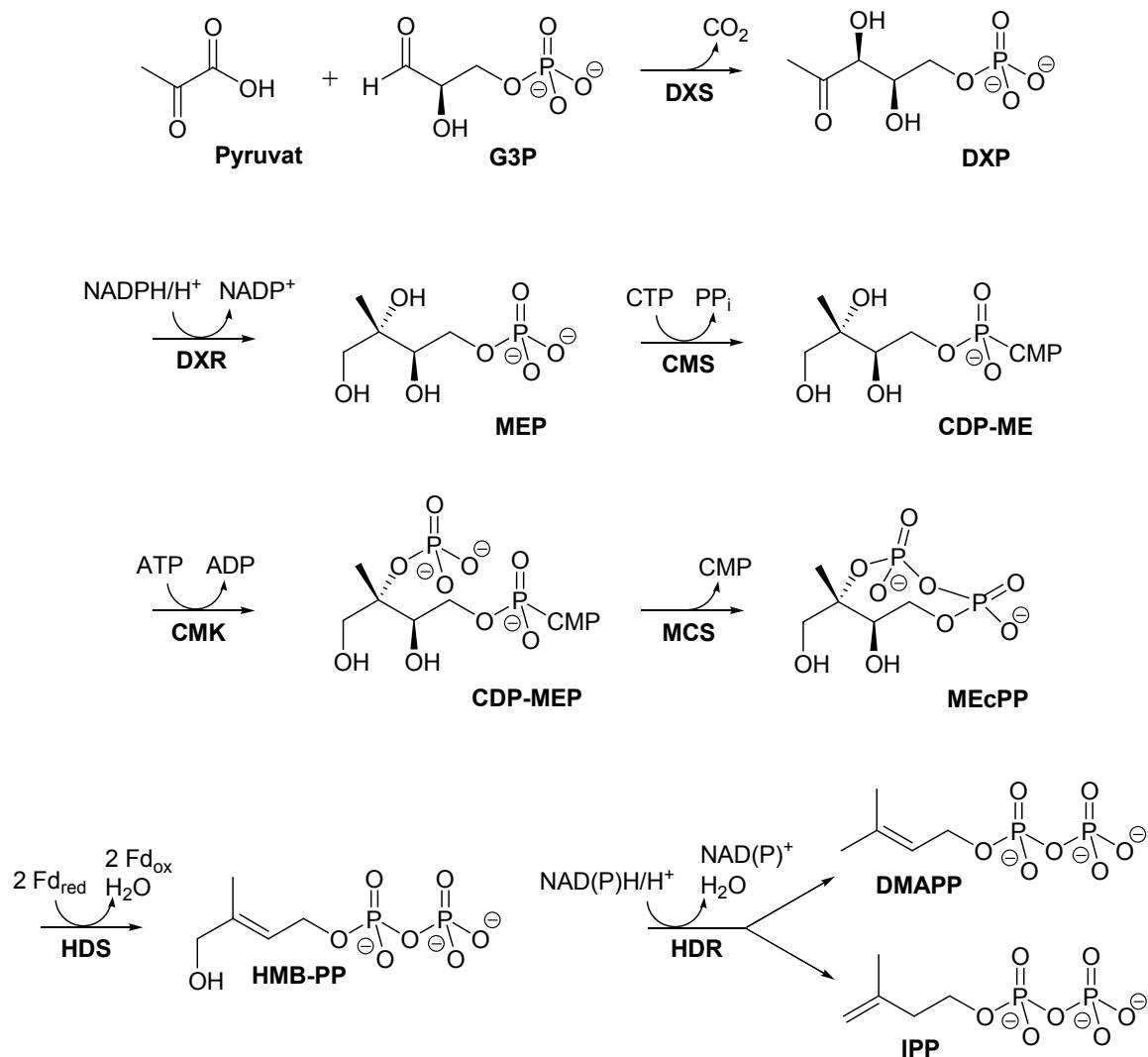


Abbildung 4: Biosynthese der aktivierten Isopreneinheiten im Methylerythritolphosphatweg

Der erste Schritt ist hier die durch die Deoxyxylulosephosphat-Synthase (DXS) katalysierte Verknüpfung von Pyruvat und *D*-Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid zum 1-Deoxy-*D*-xylulose-5-phosphat (DXP). In einer NADPH-abhängigen Reduktion katalysiert die DXP-Reduktase (DXR) die Umsetzung zu 2-C-Methyl-*D*-erythritol-4-phosphat (MEP). Eine Phosphocytidyl-

Gruppe wird durch die Cytidindiphosphat-methylerythritol-Synthase (CMS) aus Cytidintriphosphat übertragen, um 4-Phosphocytidyl-2-C-methyl-*D*-erythritol (CDP-ME) zu erhalten. Diese Zwischenstufe wird von der Cytidylmethylkinase (CMK) an C-2 zum Diphosphocytidyl-2-C-methyl-*D*-erythritol-2-phosphat (CDP-MEP) unter Verbrauch von ATP phosphoryliert. Die Methylerythritolcyclodiphosphat-Synthase (MCS) katalysiert die Zyklisierung zum 2-C-Methyl-*D*-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (MEcPP) unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat. MEcPP wird katalysiert durch die Hydroxymethylbutenylcyclodiphosphat-Synthase (HDS) zu (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enylcyclodiphosphat (HMB-PP) dehydratisiert, wobei zwei reduzierte Ferredoxine als Reduktionsmittel fungieren. Die Umsetzung zu IPP wie auch DMAPP in einem Verhältnis von 5:1 wird NADPH-abhängig durch die IPP/DMAPP-Synthase (IDS) katalysiert.

Die Synthese des Triterpens Squalen aus je vier IPP und zwei DMAPP verläuft in Eukaryoten und Prokaryoten analog über drei Stufen (Abbildung 5).

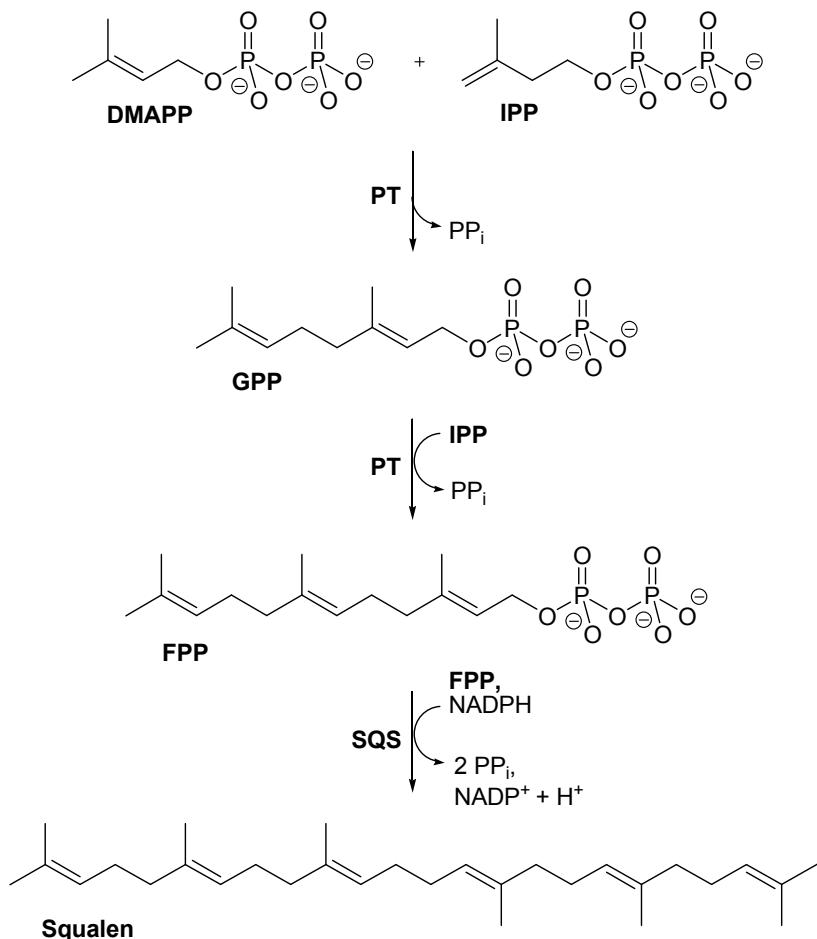


Abbildung 5: Biosynthese von Squalen ausgehend von IPP und DMAPP

Das Monoterpen Geranylpyrophosphat (GPP) entsteht durch die Prenyltransferasen-katalysierte (PT) Kopf-an-Schwanz-Kondensation von DMAPP und IPP unter Abspaltung von Pyrophosphat (PP_i). Die PT katalysiert eine weitere Kopf-an-Schwanz-Kondensation von einem weiteren IPP-Baustein an GPP zum Sesquiterpen Farnesylpyrophosphat (FPP). Die Prenyltransferase bildet bei diesen Katalysezyklen carbokationische Zwischenstufen im Verlauf eines Ionisierungs-Kondensations-Eliminierungs-Mechanismus zur Kondensation.¹⁷ Je zwei der dabei entstehenden Moleküle FPP werden in einer Kopf-an-Kopf-Kondensation NADPH-abhängig von der Squalen-Synthase (SQS) zum Triterpen Squalen umgesetzt. Bei der Kondensation entsteht in einem ersten Schritt unter Abspaltung von Pyrophosphat Präsqalen-Pyrophosphat. In einem zweiten Schritt durchläuft dieses Intermediat in der Anwesenheit von NADPH und unter Abspaltung eines weiteren Pyrophosphats eine komplexe reduktive Umlagerung zum all-*trans*-Squalen.¹⁶

1.1.2 Inhibitoren des Präsqalenabschnitts

Während therapeutisch eingesetzte Antimykotika erst im Postsqualenabschnitt eingreifen, sind die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase-Inhibitoren (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren) der Cholesterolbiosynthese durchaus von medizinischer Bedeutung. Die als Statine bekannten fungalen Metaboliten verschiedener Spezies zeigen eine Reduktion der totalen Cholesterolkonzentration sowie der Lipoproteine geringer Dichte (LDL) aufgrund einer Hemmung der HMG-CoA-Reduktase. Die Hemmung dieses Enzyms führt zu einer Abnahme des Cholesterols in den Zellen und damit verbunden einer vermehrten Expression des LDL-Rezeptors.²⁶ Das führt zu einer erhöhten Aufnahme von LDL in die Zellen und damit zu einer Reduktion des Serumcholesterols.²⁴ Mevastatin (aus *Penicillium citrinum* und *Penicillium brevicompactum*) war die erste isolierte Substanz dieser Klasse strukturell sehr ähnlicher Inhibitoren, gefolgt von der Isolierung von Lovastatin (aus *Aspergillus terreus*). Auch die später isolierten Naturstoffe Pravastatin (aus *Nocardia autotrophica*) und Simvastatin (aus *Aspergillus terreus*) gehören in diese Substanzklasse, ebenso wie die Lipidsenker Fluvastatin und Atorvastatin, die als Beispiele für neuere synthetische Statine abgebildet werden (Abbildung 6).^{24,27}

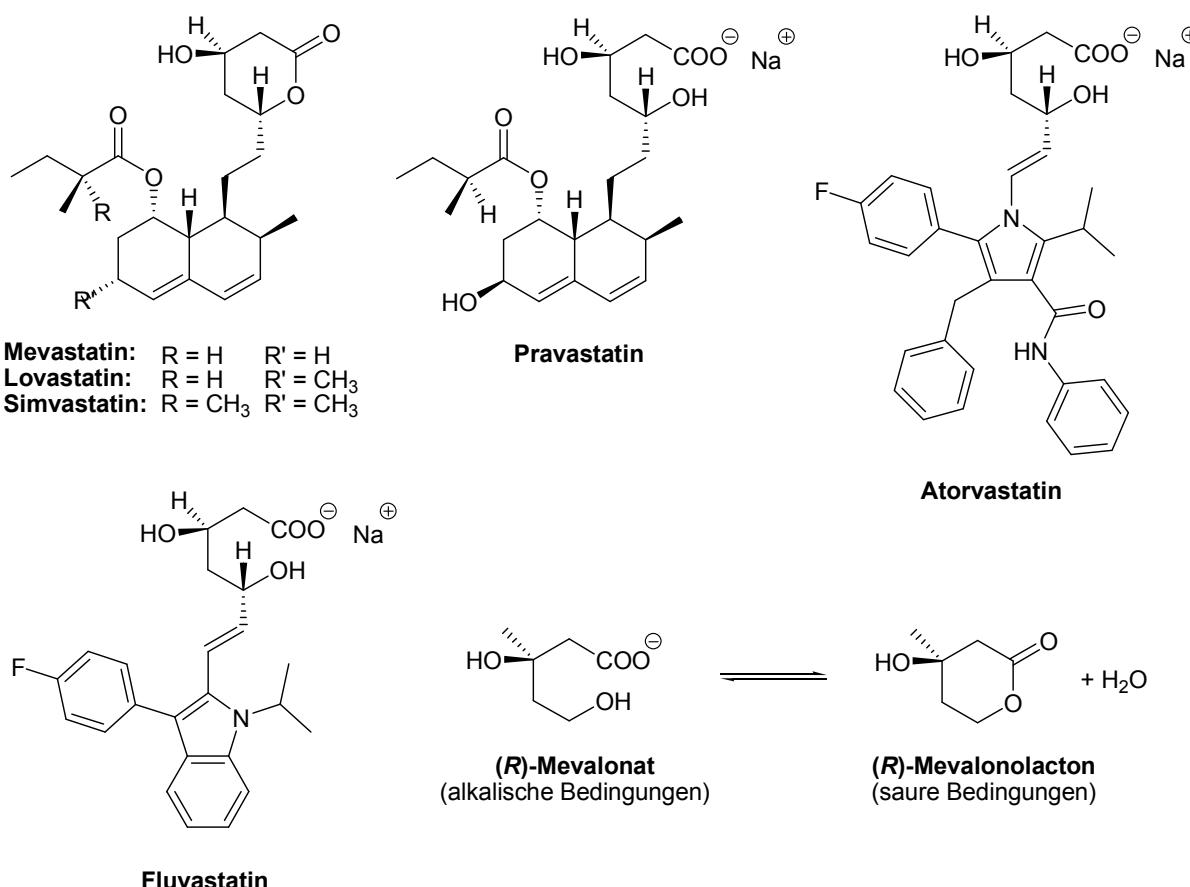


Abbildung 6: HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Auswahl), (R)-Mevalonat und (R)-Mevalonolacton

Eine Betrachtung der Strukturen der Statine zeigt, dass allen Inhibitoren dieser Substanzklasse ein Rest gemein ist, der entweder (R)-Mevalonat oder (R)-Mevalonolacton ähnelt. (R)-Mevalonat ist das Produkt der durch die HMG-CoA-Reduktase katalysierten Reduktion von HMG-CoA. Obwohl diese Gruppe entscheidend für die inhibitorische Wirkung ist, zeigen unterschiedliche K_i -Werte der verschiedenen Wirkstoffe, dass auch der Rest des Moleküls zur Wirksamkeit beiträgt.²⁴

Eine weitere therapeutische Anwendung von Inhibitoren des Präsqualenabschnitts der Sterolbiosynthese findet sich in der Behandlung von Malaria. Der Erreger *Plasmodium falciparum* synthetisiert IPP und DMAPP über den MEP-Weg, ein guter Ansatzpunkt für selektive Inhibition der Sterolbiosynthese des einzelligen Parasiten, da der Mensch ausschließlich den Mevalonatweg nutzt. Das bekannteste Medikament ist das Fosmidomycin (Abbildung 7), ein Inhibitor der DXP-Reduktase (DXR).²⁸

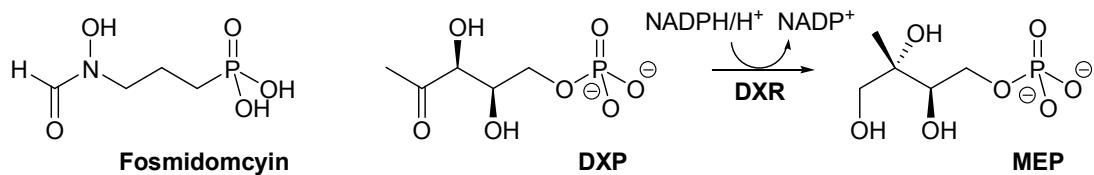


Abbildung 7: Fosmidomycin und Reduktion von DXP zu MEP

1.2 Der Postsqualenabschnitt

Da der Postsqualenabschnitt eine deutlich höhere Diversität der Biosynthesen von Steroiden und Hopanoiden aufweist, werden im Folgenden nur noch die für diese Arbeit relevanten Biosynthesen von Cholesterin und Ergosterol betrachtet.

1.2.1 Von Squalen bis Lanosterol

Der Postsqualenabschnitt wird bei Tieren, Pilzen und Protozoen mit der stereospezifischen Epoxidierung der Δ^2 -Doppelbindung des Squalens durch die Squalen-Epoxidase (SE) zum 2,3-Oxidosqualen eingeleitet (Abbildung 8).

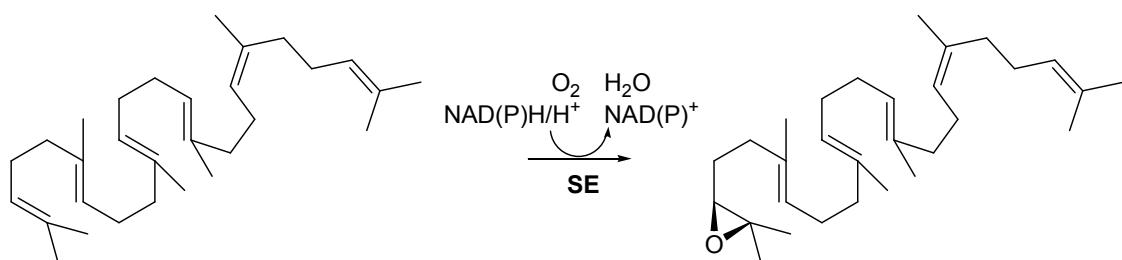


Abbildung 8: Biosynthese von Squalen zu 2,3-Oxidosqualen

Die SE gehört zu den mikrosomalen, FAD-abhängigen Flavoprotein-Monoxygenasen. Wie alle Monoxygenasen benötigt sie Sauerstoff und reduzierte Pyridinnukleotide. Essentiell für die Wirksamkeit ist eine ebenfalls in der Membran des endoplasmatischen Retikulum vorliegende NAD(P)H-Cytochrom P₄₅₀-Reduktase, deren Funktion die Katalyse des Transfers reduzierender Äquivalente vom reduzierten Pyridinnukleotid auf die Epoxidase ist. Normalerweise ist NADPH der

Donor dieser reduzierenden Äquivalente, allerdings konnte in *Candida albicans* und *Candida parapsilosis* gezeigt werden, dass deren Squalen-Epoxidase-Reduktase-Komplex vorzugsweise NADH nutzt.^{29,30}

Sowohl in der Ergosterol- als auch in der Cholesterolsynthese wird 2,3-Oxidosqualen im nächsten Schritt durch die 2,3-Oxidosqualencyclase (OSC) zu Lanosterol zyklisiert (Abbildung 9).

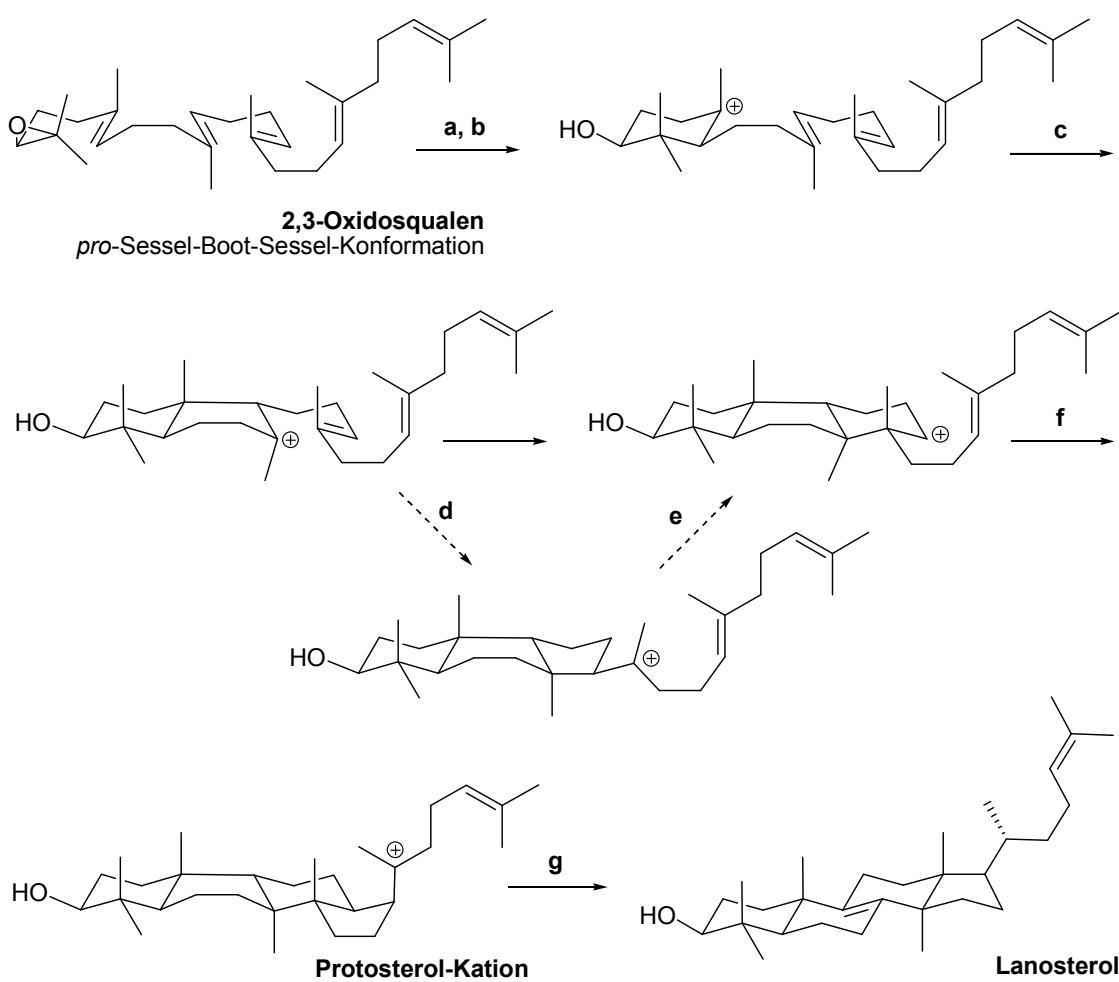


Abbildung 9: OSC-katalysierte Reaktion von 2,3-Oxidosqualen zu Lanosterol: **a:** Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und Protonierung des Epoxids, **b:** Ringschluss Ring A, **c:** Ringschluss Ring B, **d:** Ringschluss Ring C, **e:** Ringerweiterung Ring C, **f:** Bildung Ring D, **g** Hydrid- und Methylgruppenverschiebungen, Eliminierung des 9 β -Protons

Der komplexe Mechanismus dieser enzymkatalysierten Reaktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings gibt es diverse fundierte Kenntnisse aus *Homology Modelling*,^{31,32} Mutagenese-Studien³³ und Experimenten mit Suizidsubstraten³⁴. Die allgemein hohe strukturelle Diversität der Produkte der Zykлизierung in verschiedenen

Organismen ist eine Folge von mehreren 1,2-Hydrid- und Methyl-Shifts sowie eine Konsequenz der enzyminduzierten spezifischen Faltung des Substrates.³⁵ Die Cyclisierung zum Lanosterol findet aus einer *pro*-Sessel-Boot-Sessel-Konformation statt.^{36,37,38} Dabei ist die energetisch nicht bevorzugte Boot-Konformation von Tyr98 im aktiven Zentrum induziert. Die C-19-Methylgruppe wird trotz sterischer Hinderung unter die Molekülebene gedrückt, und damit der Vorläufer des B-Rings in die Boot-Konformation gezwungen.³⁹ Die Ringöffnung des Epoxids unter sauren Bedingungen wird durch einen katalytisch aktiven Carboxylatrest eines Aspartats im aktiven Zentrum der OSC (Asp456 in *S. cerevisiae*^{40,41} bzw. Asp455 in der humanen OSC³⁸) initialisiert. Die dafür erforderliche Azidität wird durch zwei Wasserstoffbrücken-donatoren erreicht, die sich ebenfalls im aktiven Zentrum des Enzyms befinden.⁴² Die Ringöffnung des Epoxids und der Ringschluss zu Ring A finden wahrscheinlich in einem konzertierten Mechanismus statt.^{43,44} Dadurch entsteht eine positive Ladung an C-6 (*pro*C-10), die zu einem schnellen Ringschluss von Ring B in Boot-Konformation führt. Der Mechanismus der nachfolgenden Ausbildung des C-Rings ist noch nicht vollständig geklärt. Der direkte Ringschluss des sechsgliedrigen Rings würde einer Anti-Markownikow-Addition an eine Doppelbindung entsprechen, wäre aber stereoelektronisch bevorzugt gegenüber einer Markownikow-Cyclisierung, die zu einem Fünfring führen würde.⁴⁵ Studien mit Substratanaloga legen einen Mechanismus über ein fünfgliedriges Intermediat nahe, das anschließend zu einem sechsgliedrigen Ring umlagert.³⁵ Induziert durch die positive Ladung an *pro*C-13 findet der Ringschluss zum fünfgliedrigen Ring D statt und es entsteht das 20-Protosterolkation. Durch vier 1,2-*trans*-Wagner-Meerwein-Umlagerungen wird aus dem 20-Protosterolkation Lanosterol gebildet. *Thoma et al.*³⁹ konnten zeigen, dass His232 und Phe696 Kation- π -Wechselwirkungen mit dem 20-Protosterol-Kation eingehen können. Dabei könnte das basische His232 potentiell auch für die Eliminierung des 9 β -Protons des letztendlich entstehenden C8-Kations verantwortlich sein.³⁹ Bemerkenswert ist, dass sogar Lewis-Säure-katalysierte Cyclisierungen von 2,3-Oxidosqualen zu mindestens einem Produkt einer Methylgruppenverschiebung führen.⁴⁶ Diese Tatsache deutet auf die Einfachheit dieser Verschiebungen und Umlagerungen in der Natur hin, und indiziert spontane Devolution nach der spezifischen Faltung des Substrates und der initialen Ringöffnung ohne direkte Beteiligung der OSC außer der finalen Deprotonierung. Dieser Schritt benötigt strikte enzymatische Kontrolle während die Hauptaufgabe der OSC während der

Ringschlussreaktionen vermutlich der Schutz der intermediären Carbokationen vor Addition von Wasser oder Deprotonierung durch Basen ist. Das aktive Zentrum der OSC muss dementsprechend hydrophob sein und darf keinerlei basische Reste in der Nähe der positiven Ladungen der carbokationischen Intermediate tragen.³⁸

1.2.2 Inhibitoren der Squalenepoxidase und der Oxidosqualencyclase

Von der erfolgreichen Therapie von Hypercholesterinämie durch die Statine (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren) motiviert wird nach neuen Inhibitoren der Cholesterolsynthese gesucht, die ebenfalls eine Abnahme des Serumcholesterols bewirken. Bei diesem Ansatz werden Enzyme, die vor der Squalensynthase liegen vermieden, da diese Schritte auch in der Proteinprenylierung und bei der Synthese wichtiger Vorstufen anderer Biosynthesen, wie beispielsweise der Coenzym Q₁₀-Synthese, eine Rolle spielen. Die Hemmung von Enzymen nach der Zyklisierung zum Lanosterol hingegen führt zur Akkumulation toxischer Sterole wie beispielsweise Desmosterol.⁴⁷ Optimale Targets zur Entwicklung neuer Cholesterolsynthese-Inhibitoren als therapeutisch einsetzbare Wirkstoffe sind also der Oxidationsschritt zum 2,3-Oxidosqualen und die nachfolgende Zyklisierung durch die OSC.⁴⁷

Im Verlauf der OSC-katalysierten Zyklisierung von Oxidosqualen zu Lanosterol entstehen mehrere *High Energy Intermediates* (HEIs) als metastabile energiereiche Intermediate zwischen sehr schnell reagierenden Übergangszuständen (Abbildung 10).

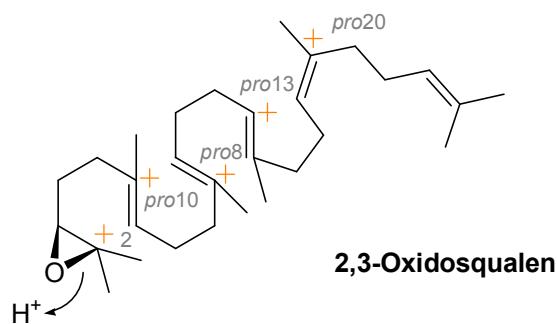


Abbildung 10: Positionen der *High Energy Intermediates*, die im Verlauf der Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen zu Lanosterol durchlaufen werden

Nach dem Hammond-Postulat sind sich die energetisch näherstehenden Zustände in einer chemischen Reaktion auch strukturell ähnlicher. Somit sind die HEIs als gute Annäherung an die Übergangszustände zu betrachten, und damit auch gute Leitstrukturen für potentielle Enzyminhibitoren. Dabei werden Verbindungen dargestellt, die den relevanten Intermediaten strukturell ähnlich sind und ein positiv geladenes Stickstoffatom an der Position des Carbokations haben.⁴⁸ Diese werden potentiell mit hoher Spezifität im aktiven Zentrum gebunden, können allerdings nicht umgesetzt werden und inhibieren das Enzym dadurch. Bislang sind drei wichtige Substanzklassen von OSC-Inhibitoren in der Literatur beschrieben (Abbildung 11). Es handelt sich dabei um tertiäre Amine, die bei physiologischem pH protoniert vorliegen wie BIBX-79 (Boehringer Ingelheim) oder Ro48-8071 (Hoffmann-La Roche), Pyridin- oder Pyrimidin-Derivate (Astra Zeneca) und Oxazolinderivate wie BIBB-515 (Boehringer Ingelheim).

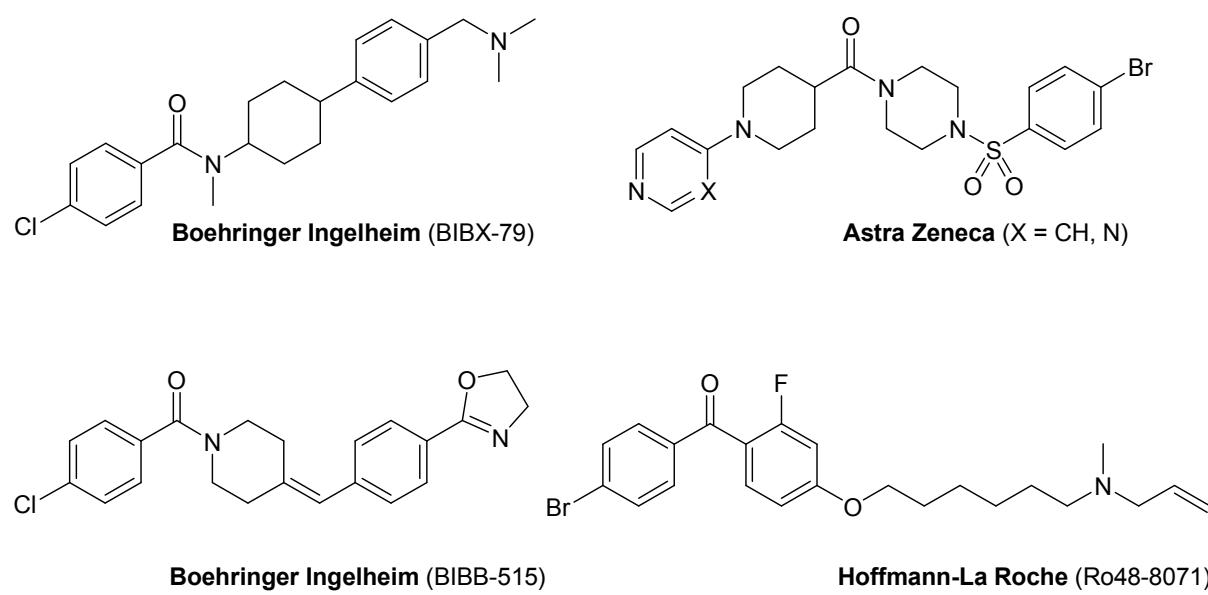


Abbildung 11: Prototypen lipidsenkender OSC-Inhibitoren

Oxidosqualencyclasen katalysieren nicht nur die Zyklisierung von Oxidosqualen, sondern auch von 2,3,22,23-Dioxidosqualen (Dioxidosqualen) in einem alternativen Oxysterolbiosyntheseweg (Abbildung 12). Bei geringen Konzentrationen der OSC-Inhibitoren kommt es zu einer partiellen Inhibition der OSC, so dass Oxidosqualen nicht mehr zyklisiert wird sondern durch die Squalenepoxidase zu Dioxidosqualen umgesetzt wird. Dadurch wird außerdem die Anreicherung von Oxidosqualen in der

Leber vermieden.⁴⁹ Da die OSC eine höhere Affinität zum zweifach epoxidierten Substrat zeigt wird die Oxysterolbiosynthese nicht inhibiert und es kommt es zu einer verstärkten Biosynthese von 24(S),25-Oxidolanosterol und damit auch von 24(S),25-Epoxycholesterol, einem negativen Regulator der HMG-CoA-Reduktase-Expression.^{49,50} Durch die verminderte Expression dieses Enzyms wird der primäre inhibitorische Effekt auf die Gesamtcholesterolbiosynthese noch verstärkt. 24(S),25-Epoxycholesterol ist außerdem ein potenter Aktivator des Liver X Rezeptors (LXR). Dieser Hormonrezeptor dimerisiert mit einem Retinoid X Rezeptor (RXR) und reguliert dadurch Gene, die am Metabolismus von Cholesterol, Fettsäuren und Lipoproteinen beteiligt sind.⁵⁰ OSC-Inhibitoren hemmen also die Cholesterolbiosynthese insgesamt betrachtet in einem dualen Mechanismus.

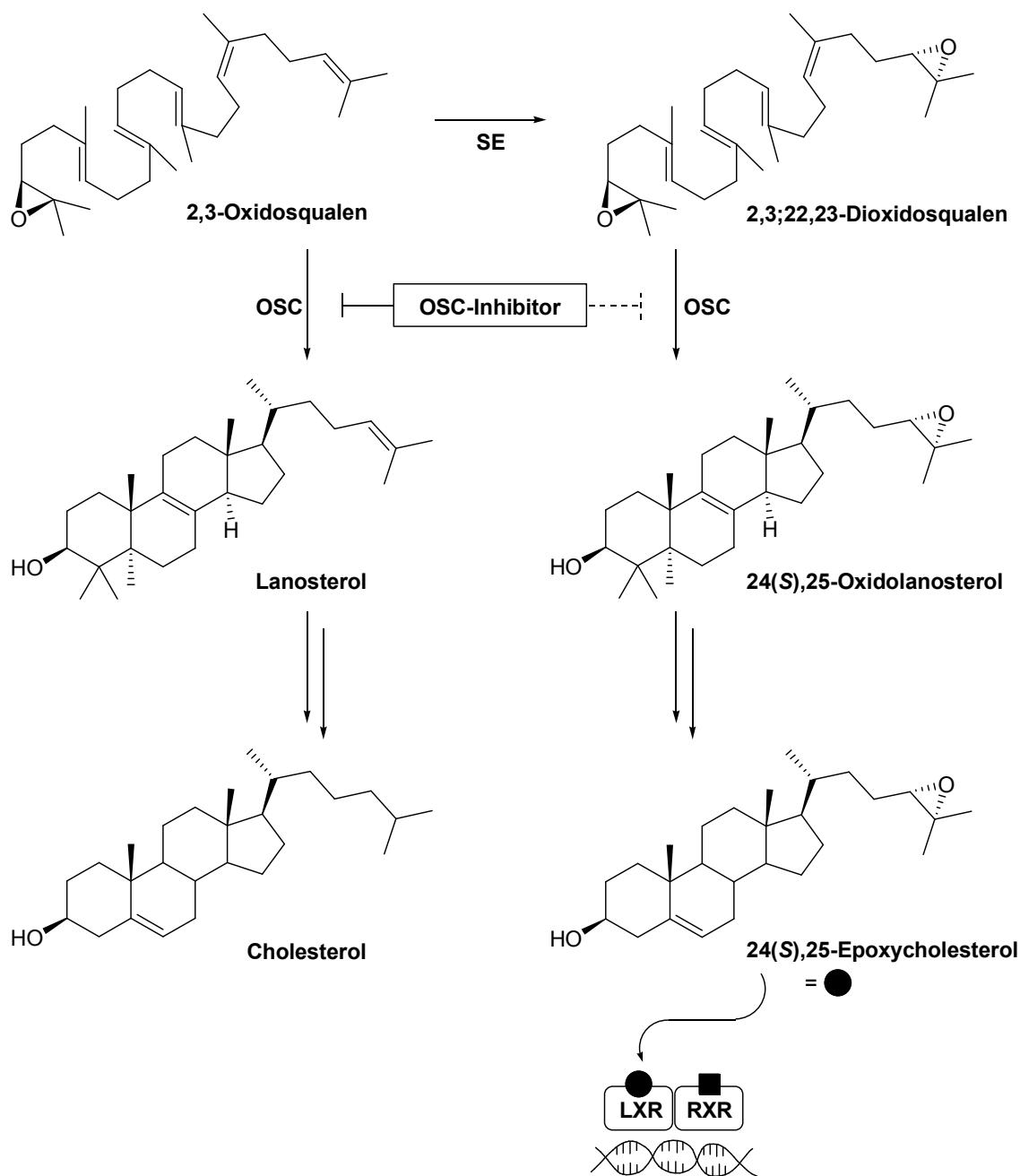


Abbildung 12: Cholesterolsynthese und alternativer Oxysterolsyntheseweg (vereinfacht) ausgehend von 2,3-Oxidosqualen

Inhibitoren der Squalenepoxidase aus den Gruppen der Allylamine und der Thiocarbamate werden therapeutisch eingesetzt (Abbildung 13). Als Beispiele für Thiocarbamate sind hier Tolnaftat und Tolciclat abgebildet, beides Antimykotika zur topischen Anwendung (Abbildung 13). Zur Gruppe der Allylamine werden die Wirkstoffe Naftifin und Terbinafin gezählt, die zur Behandlung von Mykosen beim Menschen angewandt werden. Naftifin ist ein Breitspektrum-Antimykotikum, das topisch gegen Dermatophyten angewendet wird. Terbinafin kann topisch oder

systemisch angewendet werden und ist ein Standardtherapeutikum bei schwerwiegenden Onycho- und Dermatomykosen. Terbinafin und Naftifin sind erfolgreich eingesetzte Antimykotika aufgrund ihrer bemerkenswerten Selektivität zur fungalen im Gegensatz zur tierischen SE (etwa Faktor 1000). Sie sind reversible, nicht-kompetitive Inhibitoren der fungalen SE und reversible, kompetitive Inhibitoren des tierischen Enzyms.

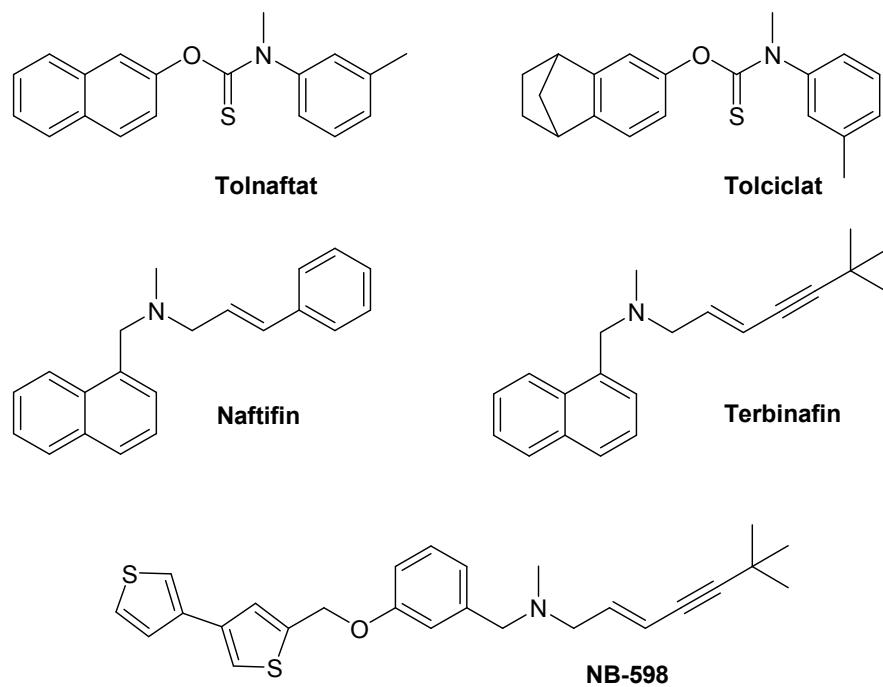


Abbildung 13: Inhibitoren der Squalenepoxidase (Auswahl)

Das ebenfalls gezeigte Allylamin NB-598 ist ein selektiver Inhibitor der mammalen SE mit großem Potential als Serumcholesterol-senkender Wirkstoff, der allerdings noch nicht therapeutisch eingesetzt wird.⁵¹ Die Struktur-Aktivität-Beziehungen der antifungalen Allylamine zeigen mehrere strukturelle Anforderungen an Inhibitoren der fungalen SE, wie ein 1-substituierter Naphthalenrest und ein tertiäres Allylamin mit einer Methyl- oder Ethylgruppe und einer Z-konfigurierten variablen Seitenkette. Die verschiedenen Gruppen müssen je nach SE in bestimmten Abständen voneinander liegen, die auch die unterschiedliche Selektivität in Bezug auf das mammale und fungale Enzym erklären könnten.²⁴ Ryder postuliert einen dualen Mechanismus der Inhibition durch die Allylamine.⁵² Die SE bindet mit geringer Affinität den Naphthalenrest in der Bindungstasche des Squalens während die Seitenkette mit niedriger Affinität in einer lipophilen Tasche gebunden wird. Die kombinierten Effekte

ergeben gemeinsam eine hoch-affine entropische Bindung des Inhibitors. Durch Docking-Studien von Terbinafin und der SE von *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor in der bevorzugten Position konformationelle Änderungen der SE indiziert, die eine Bindung des Substrates verhindern und ebenfalls den nicht-kompetitiven Mechanismus erklären.⁵³ Die stärkste Interaktion scheint jedoch aus der Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe von Tyr90 und dem Aminstickstoff zu resultieren.⁵² Die Thiocarbamate wurden als Analoga der Allylamin-Inhibitoren mit vergleichbarem inhibitorischem Mechanismus eingeordnet.³

1.2.3 Die Ergosterolbiosynthese ab Lanosterol

In insgesamt neun enzymkatalysierten Schritten wird in Pilzen Ergosterol aus Lanosterol erhalten (Abbildung 14). Ausgehend von Lanosterol katalysiert das membranständige Cytochrom P₄₅₀-Enzym C-14-Demethylase (14-DM) die oxidative Demethylierung zu 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol. Im nächsten Schritt wird die Δ^{14} -Doppelbindung durch die Δ^{14} -Reduktase (Δ^{14} -RED) reduziert. Das dabei entstehende 4,4-Dimethylzymosterol wird durch den Sterol-C-4-Demethylase-Komplex (4-DM) sukzessive an C-4 zweifach demethyliert. Zymosterol wird wiederum durch die C-24-Sterol-Methyltransferase (SMT) an C-24 zu Fecosterol methyliert. Die $\Delta^{8,7}$ -Isomerase ($\Delta^{8,7}$ -ISO) katalysiert die Isomerisierung der Δ^8 -Doppelbindung, um Episterol zu erhalten. In Ring B entsteht ein Dien-System durch die Einführung der Δ^5 -Doppelbindung durch die C-5-Desaturase (5-DES). Das Cytochrom P₄₅₀-Enzym C-22-Desaturase (22-DES) führt die Δ^{22} -Doppelbindung in Ergosta-5,7,24(28)-trienol ein zum 24(28)-Dehydroergosterol, in dem nur noch die $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung durch die $\Delta^{24(28)}$ -Reduktase ($\Delta^{24(28)}$ -RED) reduziert werden muss, um Ergosterol zu erhalten.

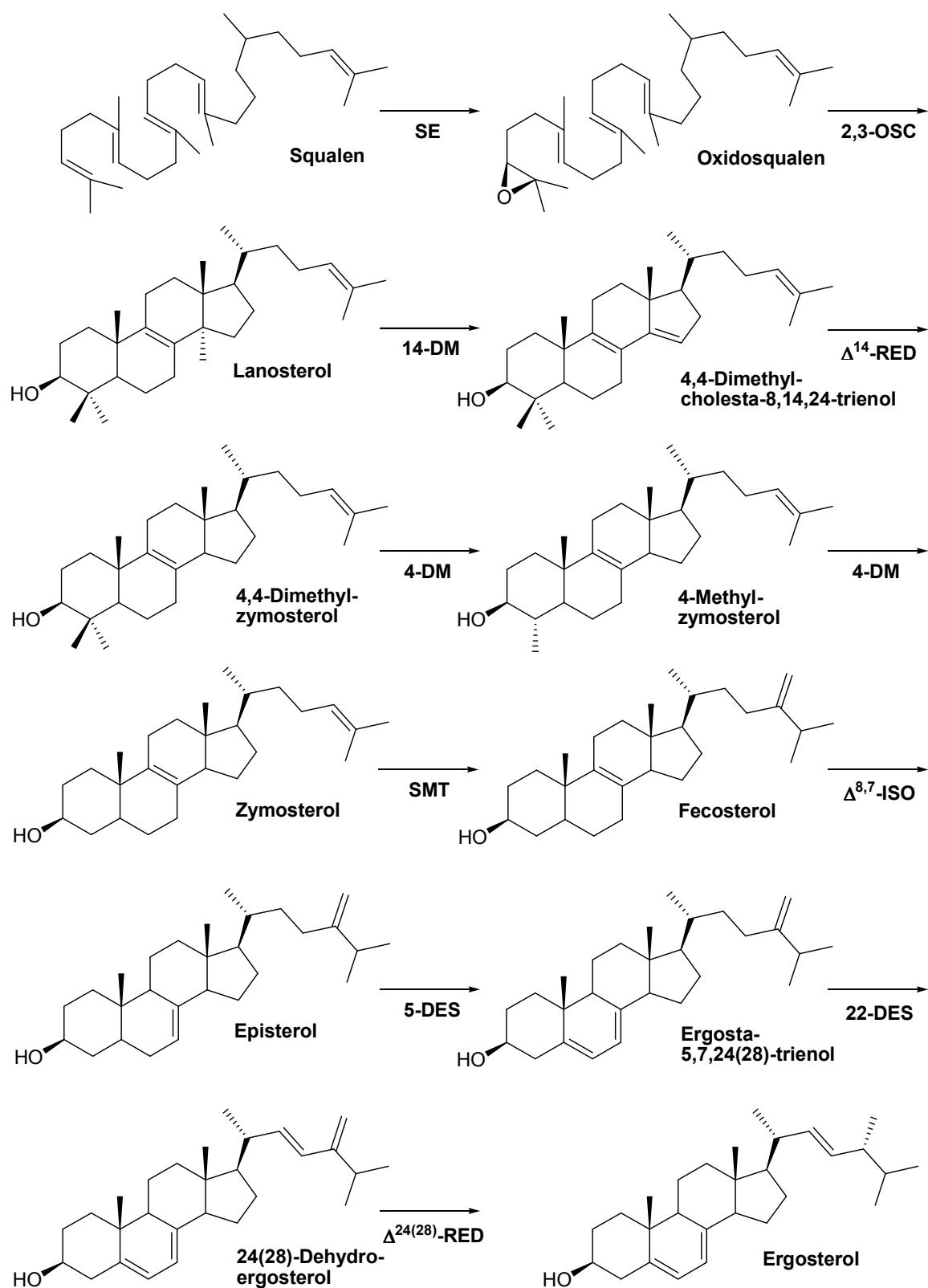


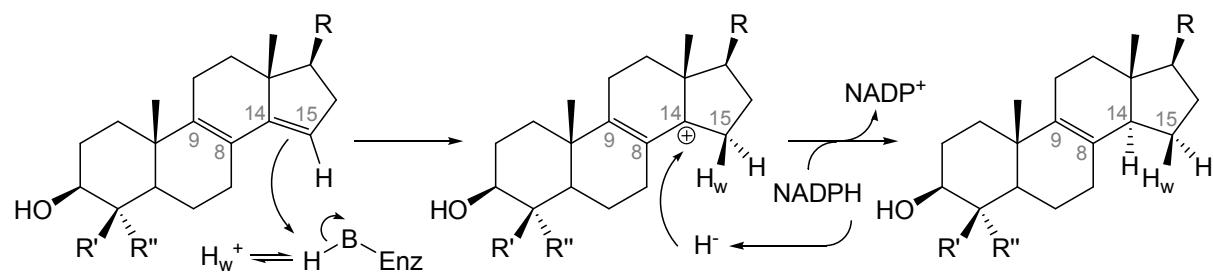
Abbildung 14: Ergosterolbiosynthese ab Lanosterol (Überblick)

1.2.4 Inhibitoren des Postsqualenabschnitts der Ergosterolbiosynthese

Eine Vielzahl von Inhibitoren diverser Enzyme des Postsqualenabschnitts sind bekannt und publiziert²⁴, allerdings sind unter den im Handel erhältlichen Antimykotika nur vier Substanzklassen vertreten. Dazu zählen Verbindungen der bereits besprochenen Allylamine und Thiocarbamate (Kapitel 1.2.2) sowie der Morpholine und der Azole.

Die unter dem Begriff der Morpholine zusammengefassten Wirkstoffe hemmen sowohl die Δ^{14} -Reduktase als auch die $\Delta^{8,7}$ -Isomerase. Die fehlende Selektivität der Inhibition lässt sich durch die Betrachtung der postulierten Mechanismen beider Enzyme leicht ersehen (Abbildung 15).

Δ^{14} -Reduktase



R = Seitenkette

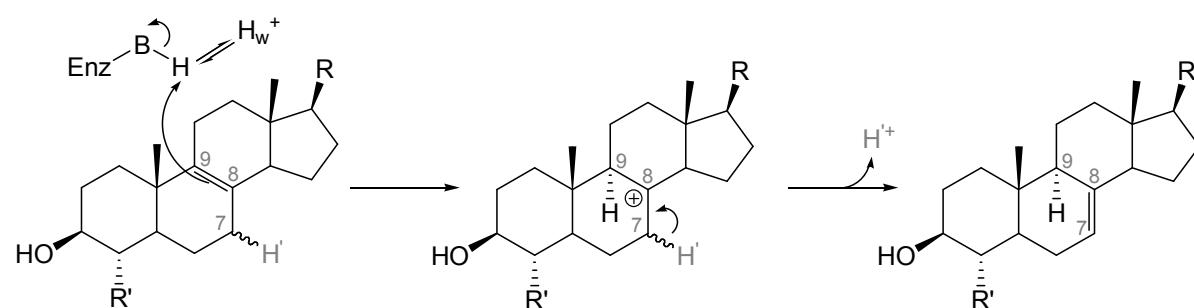
R' = R'' = CH₃ bei Pilzen und Tieren

R' = CH₃, R'' = H bei höheren Pflanzen

H_w⁺ = Proton im wässrigen Milieu

H_w = Proton aus dem wässrigen Milieu

$\Delta^{8,7}$ -Isomerase



R = Seitenkette

R' = H bei Tieren und Pilzen

R' = CH₃ in höheren Pflanzen

H' = 7α-Proton bei Pilzen

H' = 7β-Proton bei Tieren und höheren Pflanzen

Abbildung 15: Postulierte Mechanismen der Reaktionen der Δ^{14} -Reduktase und der $\Delta^{8,7}$ -Isomerase

Die Δ^{14} -Reduktase katalysiert in allen Organismen bevorzugt unter Verbrauch von NADPH als Reduktionsmittel die Reduktion der $\Delta^{8(14)}$ -Doppelbindung. Die $\Delta^{8,7}$ -Isomerase katalysiert zu einem späteren Zeitpunkt in der Ergosterol-Biosynthese die Isomerisierung der Δ^8 -Doppelbindung zu einer Δ^7 -Doppelbindung. Beide Reaktionen werden durch den nukleophilen Angriff eines Protons initialisiert.²⁴ Dies führt zur Bildung von *High Energy Intermediates*, wobei die formalen Positionen der positiven Ladung dieser Carbokationen relativ nah beieinander liegen (C-8 und C-14). Die räumliche Nähe der positiven Ladungen, noch verstärkt durch den Effekt der Delokalisierung der Ladung, führt dazu, dass beide Enzyme inhibiert werden, wenn der Inhibitor ein strukturelles oder elektronisches Mimetikum eines der Carbokationen ist.²⁴ Allerdings haben die verschiedenen Inhibitoren unterschiedliche Affinitäten zu den Enzymen. In der Humantherapie wird aus dieser Substanzklasse ausschließlich Amorolfin genutzt (Abbildung 16). Andere Antimykotika dieser Klasse, wie beispielsweise Fenpropimorph, Fenpropidin oder Tridemorph, kommen nur in der Tiermedizin oder als Pflanzenschutzmittel zum Einsatz.

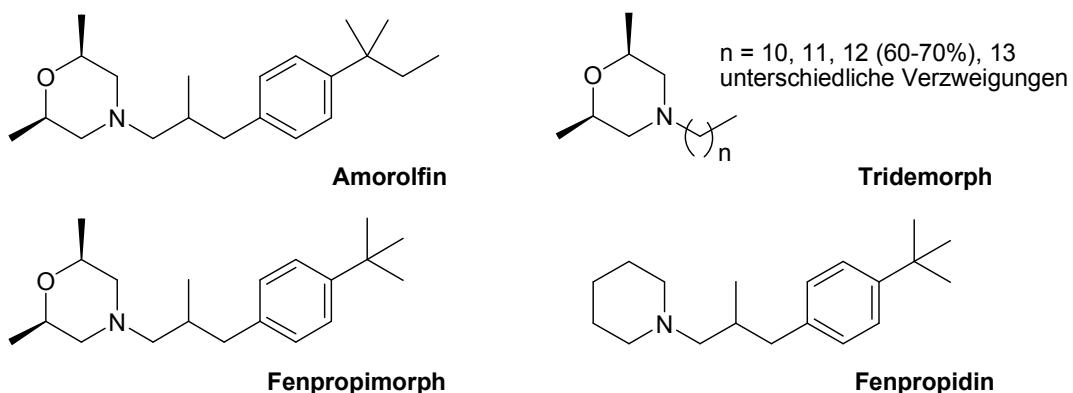


Abbildung 16: Duale Inhibitoren der Δ^{14} -Reduktase und der $\Delta^{8,7}$ -Isomerase (Auswahl)

Gemeinsam ist allen diesen Verbindungen, dass sie Morphinol- bzw. Piperidinderivate mit einem großen, lipophilen Rest am Stickstoff des Heterozyklus sind. Der Pilz stirbt bei Einsatz von Morphinolinen nicht durch die Akkumulation der Substrate oder alternativ gebildeter Sterole ab, sondern durch die Abnahme von Ergosterol und eine dadurch verursachte erhöhte Permeabilität der Pilz-Zellmembran.⁵⁴

Die Gruppe der Azole, die Triazol- und Imidazolderivate zusammenfasst, ist am stärksten vertreten unter den Antimykotika und wurde intensiv erforscht.²⁴ Die Azole sind Inhibitoren der C-14-Demethylase, einer NADPH-CytochromP₄₅₀-Oxidoreduktase, und werden deswegen auch unter der Bezeichnung C-14-Demethylase-Inhibitoren (DMIs) zusammengefasst. Die Demethylierung von C-14 findet über vier Stufen statt, von denen die ersten drei NADPH- und Sauerstoff-abhängig sind: Die Oxidation der 14 α -Methylgruppe zu einer 14 α -Hydroxymethylgruppe, die Weiteroxidation dieser Gruppe zu einer 14 α -Formylgruppe und schließlich die Oxidation der 14 α -Formylgruppe zu einer 14 α -Formyloxygruppe im Sinne einer *Baeyer-Villiger*-Oxidation. Im letzten Schritt wird die 14 α -Formyloxygruppe gemeinsam mit dem 15 α -Proton als Ameisensäure abgespalten und die Δ^{14} -Doppelbindung im Produkt 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol erhalten (Abbildung 17).²⁴

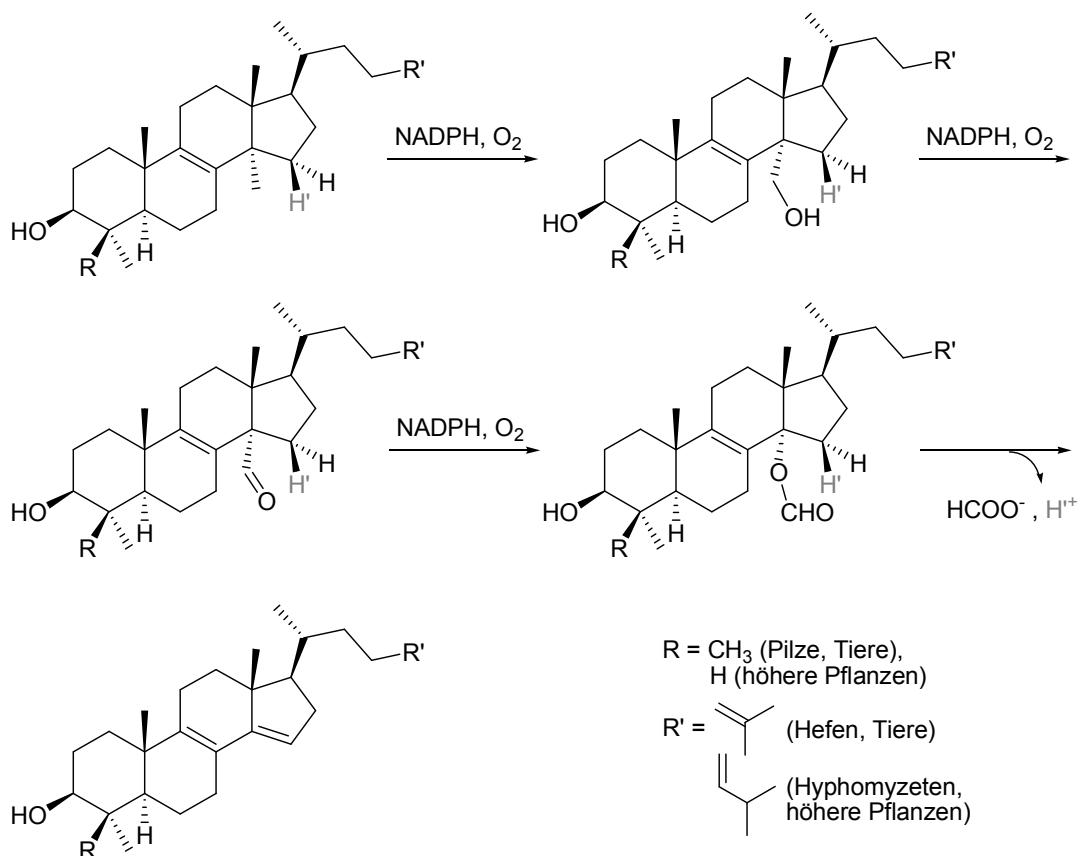


Abbildung 17: Mechanismus der 14 α -Demethylierung (allgemein)

Die Cytochrom P₄₅₀-Δ¹⁴-Demethylasen befinden sich in mikrosomalen Membranen in Assoziation mit einem Flavoprotein, das den sukzessiven Transfer zweier Elektronen zum Protohäm-Eisen katalysiert. Das Eisen des Protohäms liegt als Komplex mit den vier Stickstoffen der Pyrrolringe des Porphyrinrings, einem Schwefel eines Cysteinrests zur Bindung an das Apoenzym und Sauerstoff während dem katalytischen Zyklus bzw. Wasser im inaktiven Zustand vor. Die Inhibitoren dieses Enzyms bilden mit dem freien Elektronenpaar des *meta*-Stickstoff-Atoms des Heterozyklus eine koordinative Bindung zum positiv geladenen Protohäm-Eisen aus und inhibieren dadurch das Enzym.²⁴ Einige repräsentative Vertreter dieser Substanzklasse sind in Abbildung 18 gezeigt.

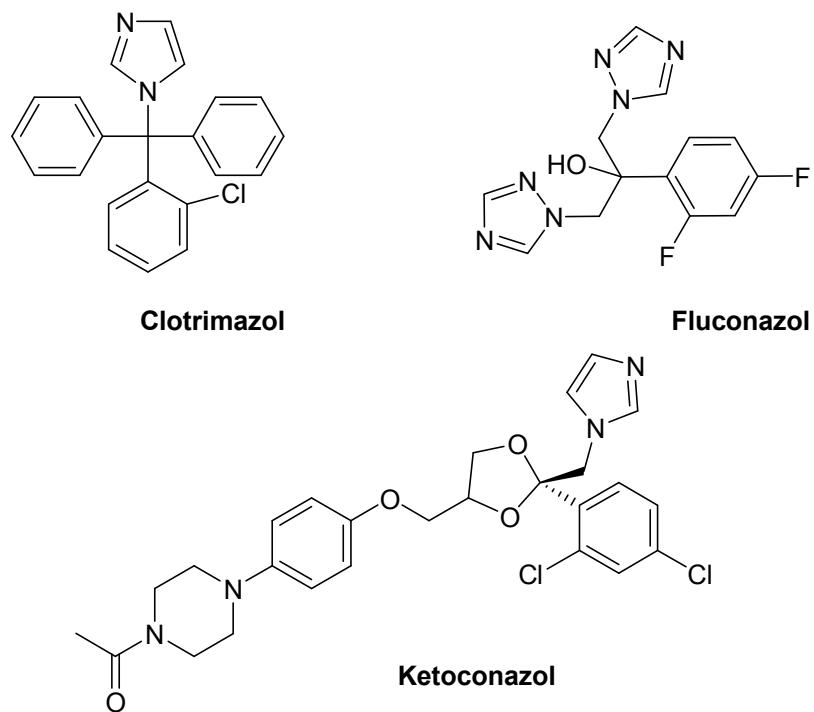


Abbildung 18: Inhibitoren der C-14-Demethylase (Auswahl)

1.2.5 Die Cholesterolbiosynthese ab Lanosterol

Der Postsqualenabschnitt der Cholesterolbiosynthese beginnt ebenfalls mit der Epoxidierung des Squalens zu 2,3-Oxidosqualen und der nachfolgenden Zyklisierung zu Lanosterol. Ausgehend von Lanosterol sind hier unterschiedliche Synthesewege möglich, der sogenannte Bloch-Weg und der Kandutsch-Russel-Weg (Abbildung 19).

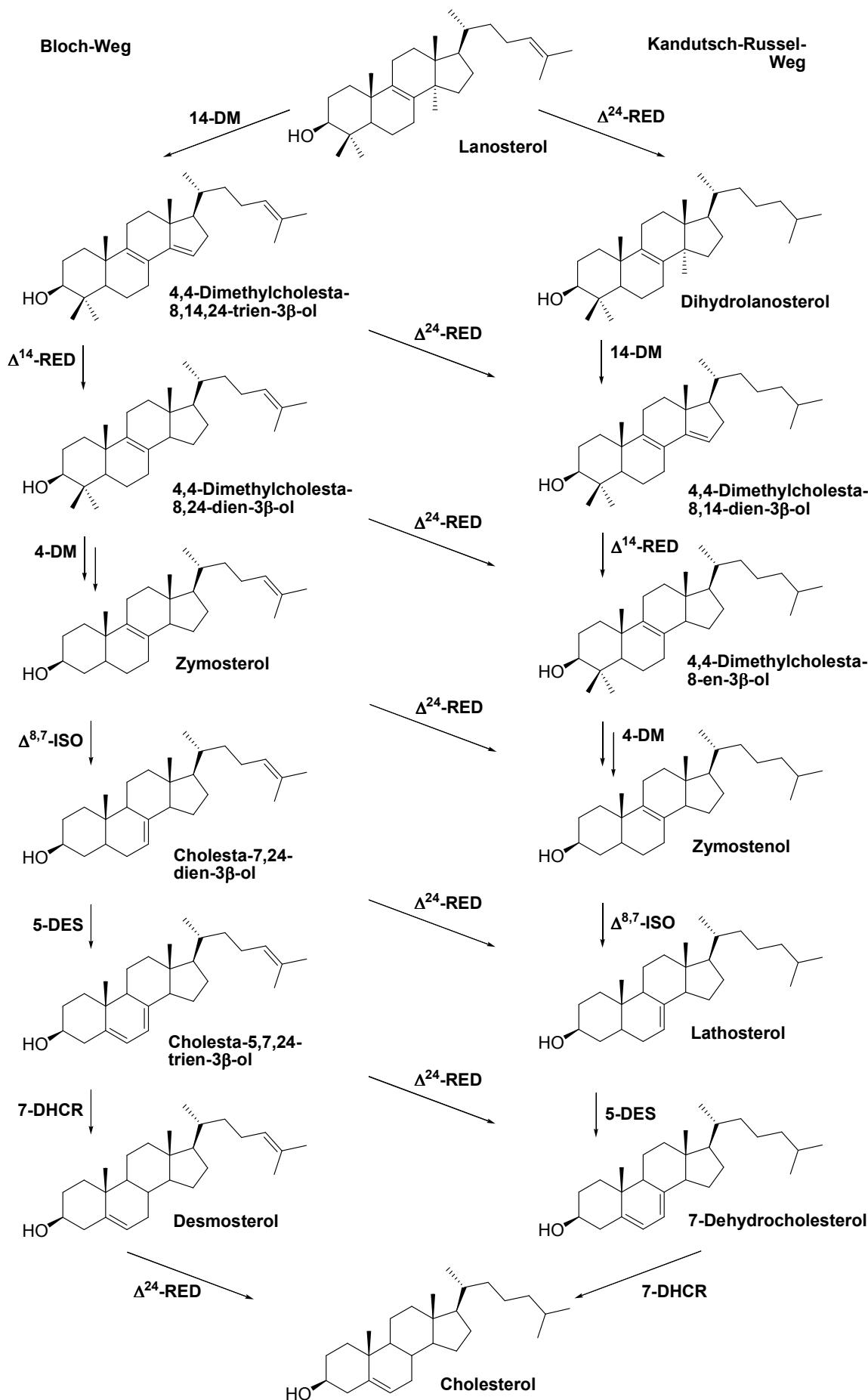


Abbildung 19: Postsqualenabschnitt der Cholesterolsynthese (Überblick)

Die Verknüpfung zwischen beiden Wegen stellt die Δ^{24} -Reduktase (Δ^{24} -RED) dar, sie reduziert die Δ^{24} -Doppelbindung der jeweiligen Substrate zu ihren gesättigten Analoga. Aufgrund der geringen Substratspezifität der Δ^{24} -Reduktase können alle Zwischenstufen des Bloch-Wegs in die entsprechenden, in der Seitenkette abgesättigten, Analoga des Kandutsch-Russel-Wegs überführt werden. Im Bloch-Reaktionsweg ist Desmosterol die direkte Synthesevorstufe des Cholesterols und die Reduktion der Δ^{24} -Doppelbindung der letzte Schritt der Biosynthese. Diese Reaktion hat im Kandutsch-Russel-Reaktionsweg bereits früher stattgefunden und hier wird im letzten Schritt 7-Dehydrocholesterol durch die 7-Dehydrocholesterol-Reduktase (7-DHCR) zum Cholesterol reduziert. Der Bloch-Weg startet mit der Demethylierung von Lanosterol an C-14 durch die Sterol-C-14-Demethylase (14-DM) zum 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trien-3 β -ol, das durch die Δ^{14} -Reduktase (Δ^{14} -RED) zu 4,4-Dimethylcholesta-8,24-dien-3 β -ol umgesetzt wird. Aus diesem Sterol werden die 4 α - und 4 β -Methylgruppen sukzessive durch den C-4-Demethylase-Komplex (4-DM) entfernt und es entsteht Zymosterol. Durch die $\Delta^{8,7}$ -Isomerase ($\Delta^{8,7}$ -ISO)-katalysierte Isomerisierung der Δ^8 -Doppelbindung wird Zymosterol in Cholesta-7,24-dien-3 β -ol überführt. Die C-5-Desaturase (5-DES, Lathosteroloxidase) katalysiert die Einführung der Δ^5 -Doppelbindung zu Cholesta-5,7,24-trien-3 β -ol, das durch die 7-Dehydrocholesterol-Reduktase zu Desmosterol reduziert wird. Der letzte Schritt ist die Reduktion der Δ^{24} -Doppelbindung durch die Δ^{24} -Reduktase (Δ^{24} -RED) zu Cholesterol. Der Kandutsch-Russell-Weg beginnt mit der Reduktion der Δ^{24} -Doppelbindung und die folgenden Reaktionsschritte verlaufen analog der bereits für den Bloch-Weg beschriebenen Reihenfolge.

1.2.6 Inhibitoren des Postsqualen-Abschnitts der Cholesterolbiosynthese

Die in der Humantherapie angewandten Medikamente zur Senkung des Cholesterolspiegels durch Inhibition der Cholesterolbiosynthese beschränken sich auf die bereits beschriebenen Statine (Kapitel 1.1.2), obwohl diverse Inhibitoren verschiedener Enzyme des Postsqualenabschnitts der Cholesterolbiosynthese bekannt sind.²⁴ Ein Vertreter der Gruppe der Azole, das Azalanstat (RS-21607), weist beispielsweise eine deutlich höhere Affinität zur humanen C-14-Demethylase

als zum fungalen Äquivalent auf ($IC_{50} = 6.5$ nM, HepG2-Zellen).⁵⁵ Ebenso gibt es Inhibitoren der $\Delta^{8,7}$ -Isomerase, die gegenüber dem fungalen und dem mammalen Enzym unterschiedliche Affinitäten zeigen. Damit ergeben sich hier auch die gleichen Probleme in der Enzym-Spezifität, wie auch bei der Inhibierung der fungalen $\Delta^{8,7}$ -Isomerase und Δ^{14} -Reduktase (Kapitel 1.2.4). Einige der bekannteren Inhibitoren, die unter anderem die $\Delta^{8,7}$ -Isomerase hemmen, sind AY9944 und U18666A (Abbildung 20).^{56,57} Der erste spezifische Inhibitor der humanen Δ^{14} -Reduktase wurde erst 2001 identifiziert und stammt aus dem Extrakt von *Corydalis turtschaninowii* Besser.⁵⁸ Das aus dieser orientalischen Heilpflanze entstammende Alkaloid 7,8,13,13a-Tetrahydrocoridalin und seine Derivate sind selektive Δ^{14} -Reduktase-Inhibitoren (Abbildung 20). Als selektiver Inhibitor der 7-Dehydrocholesterol-Reduktase soll noch BM15.766 der Firma Boehringer Mannheim gezeigt werden, der jedoch nur einen IC_{50} -Wert im mikromolaren Bereich zeigt.⁵⁹

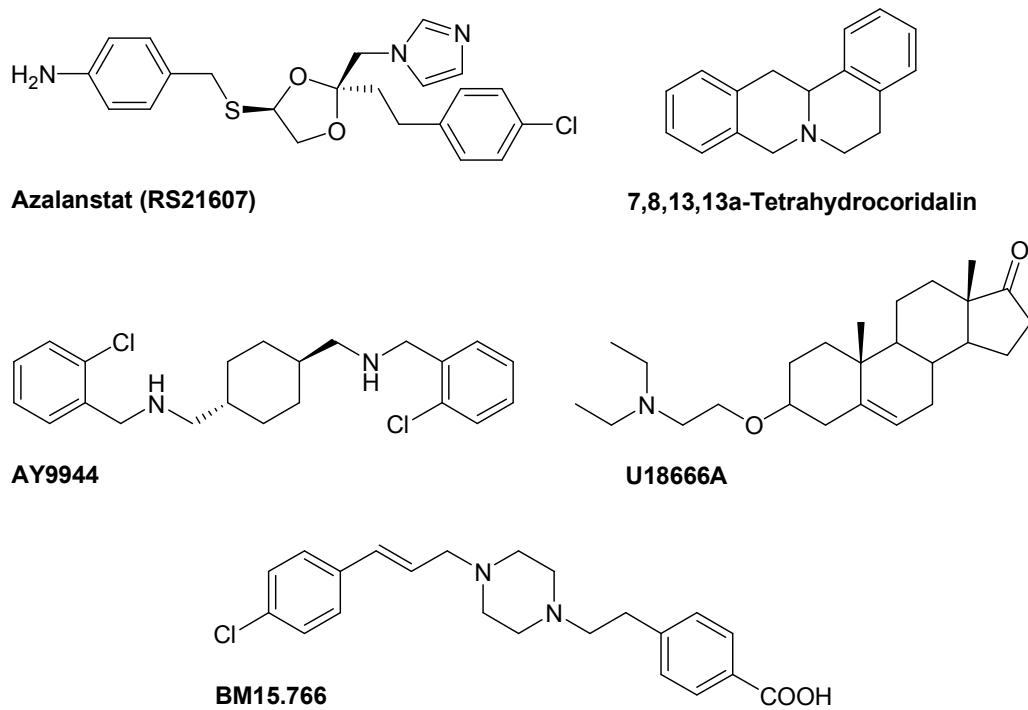


Abbildung 20: Inhibitoren des Postsqualenabschnitts der Cholesterolsynthese (Auswahl)

Im Postsqualenabschnitt der Cholesterolsynthese bleibt noch sehr viel Potential für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren mit potentielltem Einsatz in der Behandlung Cholesterolsynthese-assozierter Krankheiten. Die bislang als Cholesterolsenker auf dem Markt befindlichen Statine zeigen durchaus

Nebenwirkungen und sind beispielsweise für Schwangere als kontraindiziert eingestuft. In Standarddosierungen zeigen sich zwar üblicherweise keine nennenswerten Nebenwirkungen, aber in höheren Dosen ist nicht nur die Cholesterolbiosynthese sondern auch die Proteinprenylierung und die Synthese von anderen Isoprenoiden wie Coenzym Q₁₀ (Ubichinon) betroffen.²⁴ Q₁₀ ist als Elektronen- und Protonen-Carrier des mitochondrialen und bakteriellen Elektronentransports an der ATP-Synthese beteiligt, und fungiert in der reduzierten Form Ubichinol als Antioxidans für biologische Membranen, Membranproteine, LDL und DNA.⁶⁰ Organe mit sehr hohem Energiebedarf, wie Herz, Lunge und Leber, weisen eine sehr hohe Q₁₀-Konzentration auf und ein Mangel kann zu Lebererkrankungen führen⁶¹. Außerdem wurde im Tierversuch nachgewiesen, dass einige Statine bei Verabreichung überhöhter Dosen eine Trübung der Augenlinse (grauer Star) induzieren.^{62,63} Die Langzeitbehandlung von Menschen mit therapeutischen Dosen vergrößert das Risiko einer Kataraktbildung jedoch nicht, außer bei gemeinsamer Einnahme von Simvastatin und Erythromycin, ein Antibiotikum das gleichfalls ein potenter Inhibitor des Simvastatin-Metabolismus ist.⁶³ Diese Nebenwirkungen könnten durch die Entwicklung neuer Wirkstoffe möglicherweise verhindert werden.

1.3 Kovalent bindende und irreversible Inhibitoren

In der pharmazeutischen Industrie werden üblicherweise Wirkstoffe gesucht, die das jeweilige Target-Enzym über nicht-kovalente Bindungen inhibieren.⁶⁴ Dabei wird auf potentiell irreversibel bindende Kandidaten in den Screenings meist verzichtet, da deren reaktive Gruppen auch Bindungen mit anderen Proteinen, der DNA oder Glutathion eingehen können und dadurch toxische Effekte verursachen könnten. Diese nicht-spezifische Ausbildung kovalenter Bindungen sollte bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe vermieden oder minimiert werden. Nichtsdestotrotz haben sich nicht nur Anwendungen im Pflanzenschutz wie beispielsweise Parathion (E-605) oder Metathion, beides Inhibitoren der Acetylcholin-Esterase, sondern auch in der Medizin etabliert. Obwohl die Entwicklung meist nicht strategisch auf der Suche nach einem kovalenten Inhibitor aufgebaut ist, kann es durchaus von Vorteil sein, wenn das Target-Enzym für die Dauer des Lebenszyklus des Enzyms gehemmt ist. In der

folgenden Tabelle sind einige medizinisch eingesetzte kovalent bindende Enzymhibitoren zusammengefasst (Tabelle 1).

Mechanismus	Wirkstoff	Target	Indikation
Acylierung	β-Lactam-Antibiotika	D-Ala-D-Ala-Carboxypeptidase (Serin-Typ)	Bakterielle Infektion
	β-Lactamase-Inhibitoren	β-Lactamase	Bakterielle Infektion (kombiniert mit β-Lactam-Inhibitoren)
	Acetylsalicylsäure	Cyclooxygenase	Schmerzen, Thrombozyten-aggregationshemmer
	Disulfiram	Aldehyd-Dehydrogenase	Alkoholismus
Alkylierung	Fosfomycin	UDP-N-Acetylglucosamin-1-carboxyvinyl-Transferase	Bakterielle Infektion
Disulfid-Bindung	Omeprazol	H ⁺ /K ⁺ -ATPase	Magen-/Zwölffingerdarmgeschwüre, Refluxösophagitis
	Clopidogrel	P2Y ₁₂ -Rezeptor	Thrombozyten-aggregationshemmer
Michael-Addition	Selegilin/Rasagilin	MAO-B	Parkinson
	Fluoruracil	Thymidylat-Synthase	Krebs
Pinner-Reaktion	Vildagliptin	Dipeptidyl-Peptidase 4	Diabetes
Thioether	Eflornithin	Ornithin-Decarboxylase	Schlafkrankheit; Hirsutismus
Phosphor-säureester	Diisopropylfluorophosphat	Serin-Proteasen	Glaukom

Tabelle 1: Therapeutisch eingesetzte kovalent bindende und irreversible Inhibitoren^{64,65}

Die sogenannten *small molecule drugs* können also in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Sie reagieren nach unterschiedlichsten Reaktionsmechanismen mit ihrem Target über irreversible und reversible kovalente Bindungen sowie

langsamer Dissoziation vom Enzym. Ein wichtiges Prinzip der irreversiblen Enzyminhibition ist hierbei die sogenannte Suizid-Inhibition oder auch Mechanismus-gestützte Inhibition. Dabei bindet ein Enzym ein Substratanalogon und bildet im Lauf der normalen katalytischen Reaktion irreversibel ein Addukt über eine kovalente Bindung. Diese Inhibitoren haben eine besondere Bedeutung in der Entwicklung neuer Wirkstoffe, da sie außerhalb des aktiven Zentrums keine Wirkung haben, aber spezifische Target-Enzyme hemmen können.⁶⁴ Dies ist ein besonders effektives Konzept in Zellen, die sich aufgrund hochaktiver Enzyme oft und schnell teilen, wie beispielsweise Krebszellen oder parasitäre Protisten. Einige der gezeigten Beispiele (Tabelle 1) gehören zu den Suizid-Inhibitoren, wie Eflornithin⁶⁵ oder Fluoruracil⁶⁴. Am Beispiel des Eflornithins wird die Mechanismus-gestützte Inhibition gezeigt (Abbildung 21).

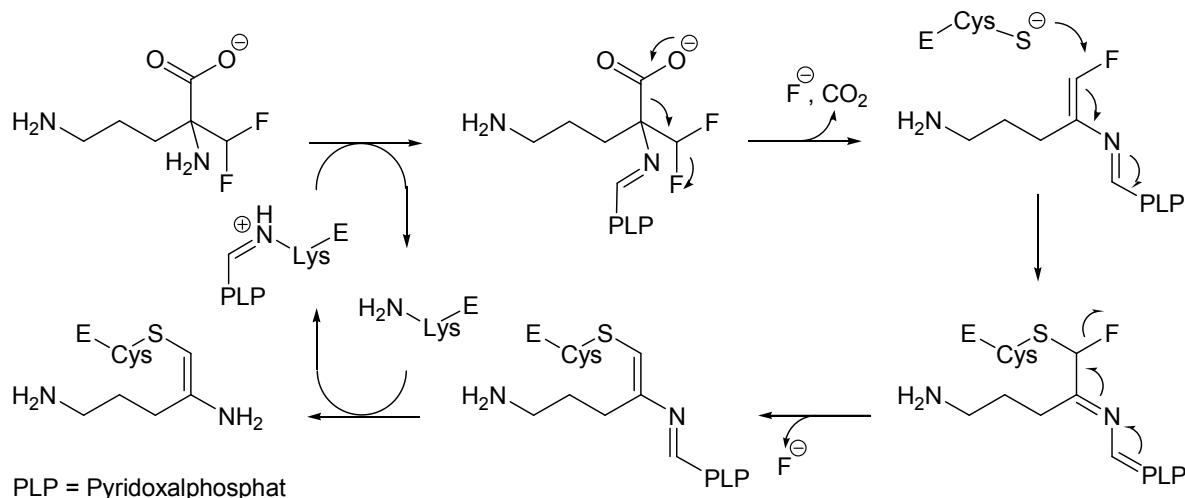


Abbildung 21: Mechanismus der irreversiblen Inhibition der Ornithin-Decarboxylase durch Eflornithin

Nicht alle irreversibel wirkenden Inhibitoren bilden kovalente Addukte mit den Target-Enzymen. Einige Inhibitoren binden an das Enzym aufgrund starker van-der-Waals-Wechselwirkungen, metallchelatisierender Wirkung oder irreversibler Reorganisation des Enzyms. Inhibitoren dieser Wirkweise binden schnell an ihr Target zu einem EI-Komplex, allerdings nur mit geringer Affinität (Abbildung 22).

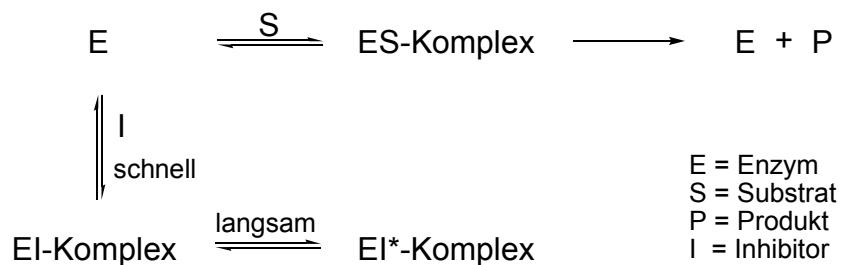


Abbildung 22: Mechanismus der nicht-kovalenten, irreversiblen Inhibition

Dieser Komplex durchläuft dann eine langsamere Umlagerung zu einem sehr stark gebundenen EI*-Komplex.⁶⁶ Oft schließt sich das Enzym um den Inhibitor, ändert dabei die Konformation und ist dadurch irreversibel inhibiert. Einige Beispiel für solche Wirkstoffe sind Allopurinol⁶⁷, Methotrexat⁶⁶ und die aktivierte Form von Aciclovir⁶⁸.

Auch kovalent bindende oder irreversible Inhibitoren haben demnach durchaus Potential für die Entwicklung therapeutisch einsetzbarer Wirkstoffe. Da Moleküle mit reaktiven Gruppen jedoch häufig von vornherein aus den Screenings ausgeschlossen werden, ist hier noch sehr viel Raum für die Entwicklung.

2 ZIELSETZUNG UND SYNTHESEPLANUNG

2.1 Zielsetzung

In den vergangenen Jahrzehnten ist die Anzahl immunsupprimierter Patienten stetig gestiegen. Dazu zählen Patienten mit angeborenen oder erworbenen Störungen der Immunabwehr sowie Patienten nach Transplantationen oder während und nach einer Chemotherapie. Bei einer vorübergehenden oder irreversiblen Schwächung der Abwehrfunktion, also der Fähigkeit, sich gegen eindringende Krankheitserreger zu wehren, treten in der Folge gehäuft Infektionskrankheiten auf, die zudem besonders schwer verlaufen können. Damit geht ein deutlich zunehmender Einsatz von Breitspektrumantibiotika und -antimykotika einher, der auch zu zunehmenden Resistenzen von pathogenen Keimen führt. Hieraus ergibt sich ein steigender Bedarf an neuen Wirkstoffen mit neuen Wirkprinzipien, um die Resistenzen zu umgehen. Sterolbiosyntheseinhibitoren sind allgemein von Interesse als Antimykotika, Antiprotozoenmittel und Lipidsenker. Im Arbeitskreis von Professor Franz Bracher wird hierbei der Entwicklung von Antimykotika durch Hemmung des fungalen Enzyms Oxidosqualencyclase (OSC) eine besondere Bedeutung beigemessen. Es gibt verschiedene Strategien bei der Entwicklung von Enzyminhibitoren wie die Synthese von Substratanaloga, Mimetika der *HEIs* oder Mechanismus-gestützten Inhibitoren. Bisher wurden in diesem Arbeitskreis verschiedene Strukturen entwickelt, die als OSC-Inhibitoren identifiziert werden konnten (Abbildung 23).

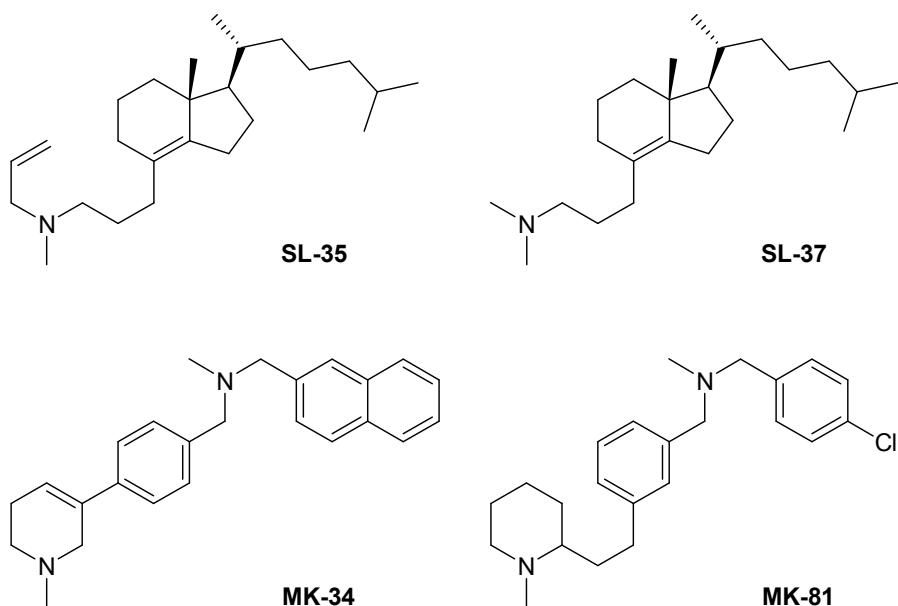


Abbildung 23: OSC-Inhibitoren (Auswahl; **SL**: Lange⁶⁹, **MK**: Keller⁷⁰)

Diese sind grundsätzlich als *HEI*-Analoga verschiedener Intermediate der OSC-katalysierten Zyklisierung von Oxidosqualen zu Lanosterol einzuordnen, da sie unter physiologischen Bedingungen am Stickstoff protoniert vorliegen. Die im Arbeitskreis entwickelten Inhibitoren anderer Enzyme der Ergosterolbiosynthese zeigen jedoch eine deutlich größere Strukturvielfalt. Daraus ließen sich einige Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) ableiten. Bei kondensierten Ringsystemen müssen die Ringe in all-*trans*-Verknüpfung vorliegen und es muss ein strukturelles Äquivalent zur Seitenkette der Sterole vorhanden sein (*Hantelmann*⁷¹). Da bei diversen Funktionalisierungen von Grundmanns Keton eine Epimerisierung an C-3a auftrat (*Lange*⁶⁹), die zur *cis*-Verknüpfung der Ringe C und D und damit zu einem Aktivitätsverlust führte, ist dieser Grundkörper nicht uneingeschränkt geeignet (Abbildung 24).

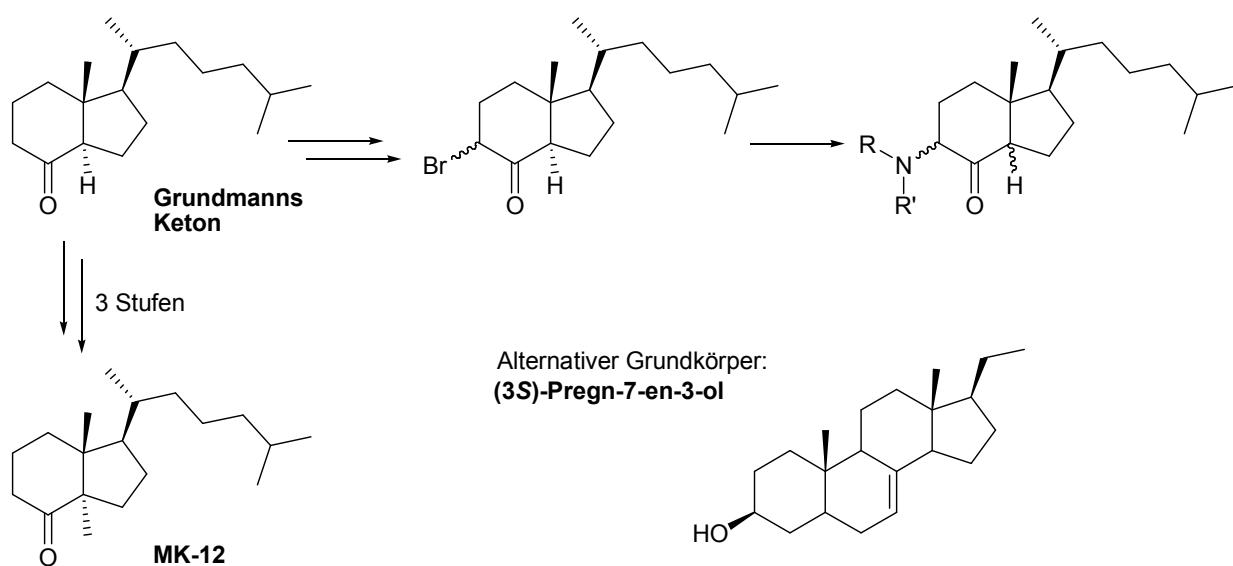


Abbildung 24: Synthese der α -Aminoketone bei *Lange*⁶⁹ mit auftretenden Epimerisierungen, methylierter Grundkörper bei *König*⁷² (MK-12), alternativer Grundkörper (3S,20S)-Pregn-7-en-3-ol

Es lässt sich zwar stereoselektiv eine Methylgruppe an C-3a einführen (*König*⁷²), aber dadurch ergeben sich auch zusätzliche komplexe Syntheseschritte. Andere Möglichkeiten, dieses Problem zu umgehen sind Synthesen von nicht-anellierten frei drehbaren Ringsystemen (*Keller*⁷⁰, Abbildung 23) oder von Sterolderivaten ohne vergleichbare CH-azide Position. Die Eignung eines Sterolgrundkörpers zur Entwicklung von Sterolbiosyntheseinhibitoren konnte in diesem Arbeitskreis bereits in den Dissertationen von *Renard*⁷³ und *Giera*⁷⁴ gezeigt werden. Thoma et al.³⁹ konnten Cokristallisationen der humanen OSC mit einem Inhibitor (Ro 48-8071) aber auch mit Lanosterol realisieren und die räumliche Struktur des Enzyms mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse untersuchen. Dies verdeutlicht auch, wie fest Sterolverbindungen im aktiven Zentrum der OSC gebunden werden können (Abbildung 25).

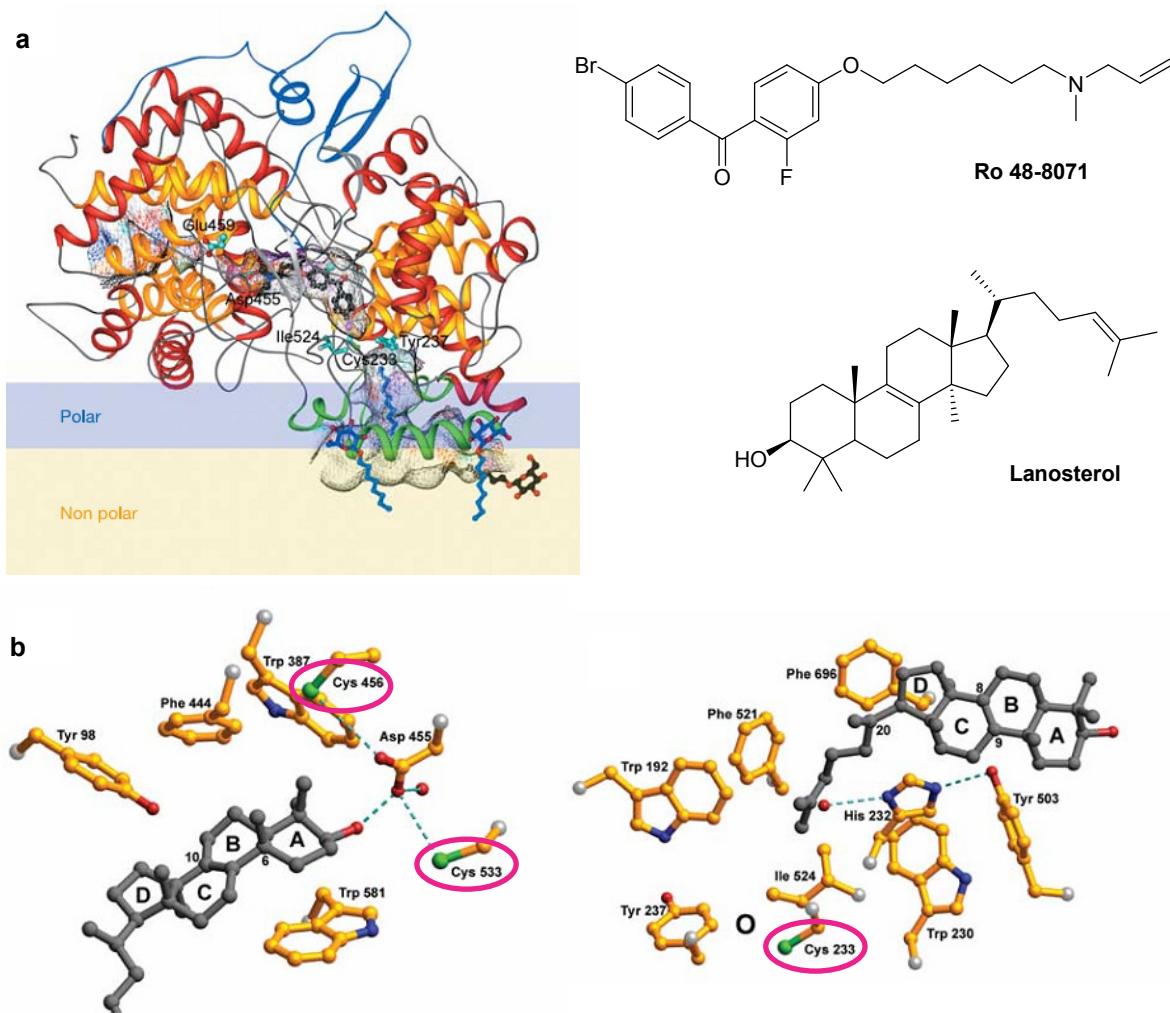


Abbildung 25: Humane OSC, Ro 48-8071 und Lanosterol³⁹; **a:** Cokristall der humanen OSC mit Ro 48-8071, Darstellung als Ribbon-Diagramm mit membrangebundener Region, **b:** Cokristall der humanen OSC mit Lanosterol aus zwei verschiedenen Blickwinkeln, aktives Zentrum mit Hervorhebung von Cys233, Cys456 und Cys533

Die Kristallstrukturen ermöglichen einen detaillierten Blick auf das aktive Zentrum des Enzyms. So konnten beispielsweise einige mechanistische Vorgänge während der Zyklisierung von Oxidosqualen belegt werden (Kapitel 1.2.1), aber auch die Position von drei in die Bindungstasche ragenden Cysteinresten wurde ersichtlich. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, durch die Einführung von gegenüber Thiolresten reaktiven Gruppen, potentiell irreversibel bindende Inhibitoren der OSC zu entwickeln. So wurde in der Dissertation von Mayer⁷⁵ versucht, durch Einführung reaktiver Gruppen an Grundmanns Keton, die in der direkten Nähe zur Bindungsstelle des Rings A von Lanosterol liegenden Thiolgruppen von Cys456 und Cys533 irreversibel kovalent zu binden (Abbildung 26). Bei keiner dieser Strukturen konnte jedoch inhibitorische Aktivität im Cholesterol- oder Ergosterolbiosynthese-Assay nachgewiesen werden.

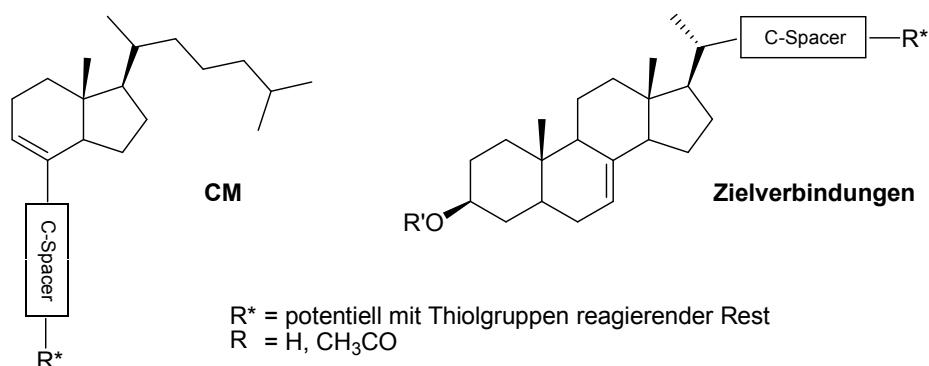


Abbildung 26: Potentiell irreversible Inhibitoren der OSC basierend auf Grundmanns Keton und (3S)-Pregn-7-en-3-ol (**CM**: Mayer⁷⁵)

Durch Einführung reaktiver Gruppen in der Seitenkette eines Sterols könnte die in der direkten Nähe zur Bindungsstelle der Seitenkette von Lanosterol liegende Thiolgruppe von Cys233 erreicht werden. Die Synthese Seitenketten-modifizierter Sterole mit potentiell gegenüber Thiolen reaktiven Gruppen ist das erste Ziel dieser Arbeit. Der Sterolgrundkörper soll hierbei als etablierter Grundkörper im Bereich der Sterolbiosyntheseinhibitoren eingesetzt werden, der nicht der bei Grundmanns Keton zu beobachtenden Isomerisierung unterliegt.^{72,73,74} Dabei wird auf in der Forschung bereits etablierte Funktionalitäten zurückgegriffen, sowie die Etablierung weiterer potentiell reaktiver Gruppen zur Bildung von kovalenten Enzym-Substrat-Komplexen angestrebt. Maleinimide, Disulfide und Nitrile gehören beispielsweise zu den bereits etablierten Substrat-Funktionalitäten bei der Synthese potentiell irreversibel bindender Inhibitoren.⁶⁴ Maleinimid-Gruppen können *Michaeli*-Additionen mit Thiolen eingehen, während Disulfide in Form eines Thiol-Disulfidaustausches reagieren können (Abbildung 27). Beide Gruppen erlauben so die irreversible kovalente Bindung von Enzym und Inhibitor. Nitrile hingegen gehen in einer *Pinner*-Reaktion reversible kovalente Bindungen ein. Die Synthese eines Maleinimidderivats ist bereits während meiner Forschungszeit zur Master Thesis gelungen.⁷⁶ Ziele der vorliegenden Arbeit blieben aber die Darstellung von Disulfid- und Nitrilderivaten. Interessant sind selbstverständlich auch die Synthesen weiterer potentiell gegenüber Thiolen reaktiver Gruppen wie Epoxide, einfache α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen, Thioester oder Hydroxymethylpyrrole.

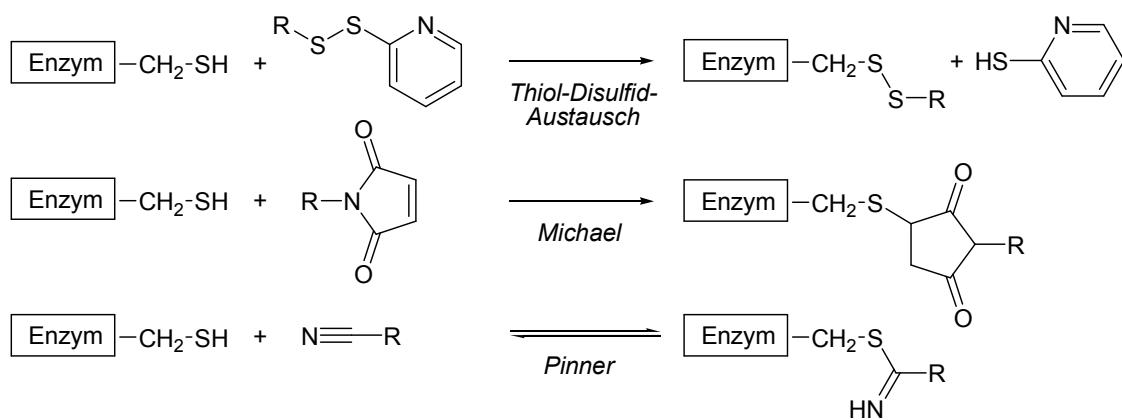


Abbildung 27: Prinzipien zur kovalenten Inhibition der OSC, Auswahl

Die Reaktion von reduzierenden Zuckern mit Aminen, die nicht-enzymatische Bräunungsreaktion oder *Maillard*-Reaktion, wird vor allem in der Lebensmittelchemie intensiv erforscht. Neben anderen Produkten entstehen dabei auch Pyrrole mit Hydroxyalkyl-Seitenketten, die vermutlich an der Quervernetzung von Proteinen sowie an der Bildung polymerer Produkte beteiligt sind.⁷⁷ Die Hydroxylgruppen in α -Stellung zum Pyrrol werden leicht durch Mercaptane, Alkohole und Sulfit, jedoch weniger leicht durch Amine substituiert. Bei der Erwärmung von Glukose mit Propylamin in neutraler oder leicht saurer wässriger Lösung entsteht 5-(Hydroxymethyl)-1-propyl-1*H*-pyrrol-2-carbaldehyd als ein Hauptprodukt.⁷⁷ Mit primären Aminen können Formylgruppen derartiger Pyrrole leicht zu Schiff'schen Basen reagieren. Eine Quervernetzung von Proteinen könnte demnach über Lysin- und Cysteinreste erfolgen (Abbildung 28).⁷⁷

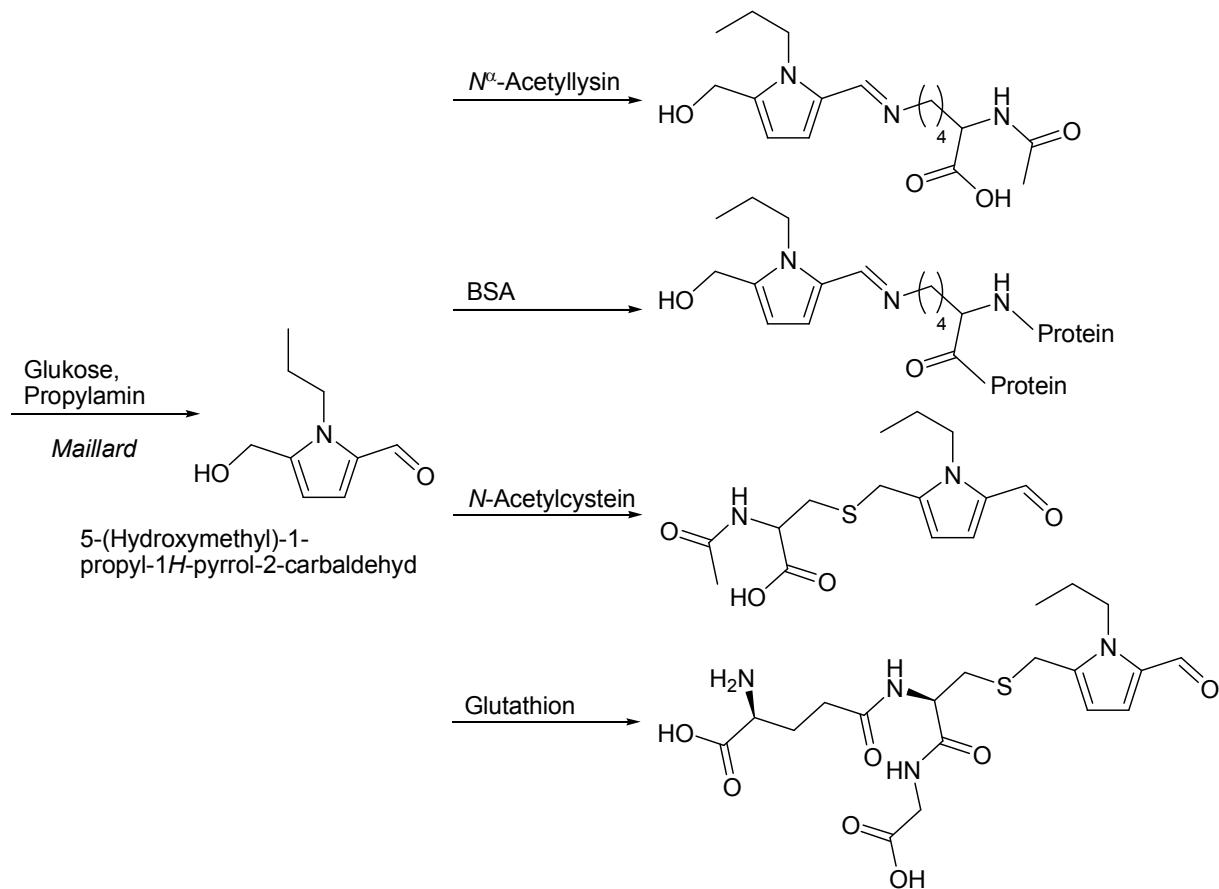


Abbildung 28: Reaktivität von 5-Hydroxymethyl-1-propyl-1*H*-pyrrol-2-carbaldehyd gegenüber Amin- und Thiolderivaten^{77,78}

Insbesondere die Reaktivität derartiger Bausteine gegenüber Thiolen ist für diese Arbeit von großem Interesse, da es durch die bekannte Reaktivität gegenüber *N*-Acetylcystein und Glutathion sehr wahrscheinlich ist, dass Hydroxymethylpyrrole auch mit Cysteinresten in Proteinen eine irreversible kovalente Bindung eingehen können.⁷⁸ Prinzipiell erscheinen hier zwei Möglichkeiten sinnvoll, um diesen Baustein mit der Sterolseitenkette zu verknüpfen (Abbildung 29).

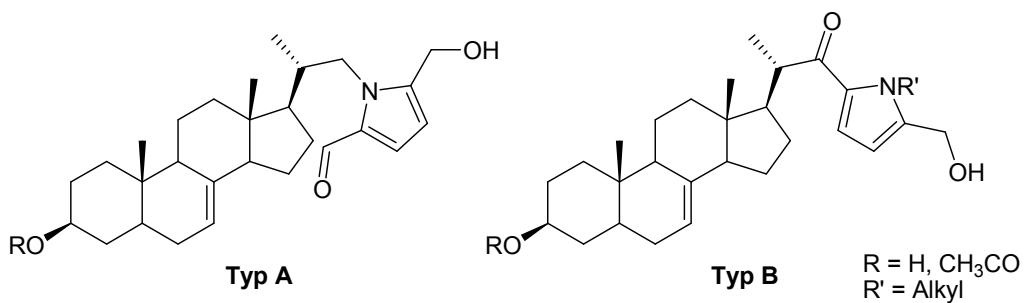


Abbildung 29: Mögliche Verknüpfungen eines Sterolgrundkörpers mit Hydroxymethylpyrrol-Bausteinen (Auswahl)

Durch die Arbeit an seitenkettenmodifizierten Sterolen ergeben sich jedoch noch weitere interessante Möglichkeiten. So wurde als ein weiteres Ziel dieser Arbeit gewählt, die von *Giera*⁷⁴ aufgestellten SAR der sogenannten Seitenkettenamide in Bezug auf ihre inhibitorischen Fähigkeiten an verschiedenen Enzymen der Sterolbiosynthese durch die Synthese und biologische Testung potentieller Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase zu erweitern (Abbildung 30).

R	R'	Inhibiertes Enzym
H oder Acetyl	H, Methyl	Δ^{24} -RED
	Ethyl, Propyl	Δ^{24} -RED + 5-DES
	ⁿ Butyl, ⁱ Butyl, ^t Butyl, Pentyl	5-DES

Abbildung 30: Seitenkettenamide (Giera) als Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase (Δ^{24} -RED) und der C-5-Desaturase (5-DES)⁷⁴

Schließlich sollten noch potentielle Inhibitoren der C-22-Desaturase dargestellt werden, die ein interessantes Target zur Entwicklung von Breitspektrum-Antimykotika ist. Die Einführung der Δ^{22} -Doppelbindung findet im Verlauf der Sterolbiosynthese von Pflanzen und Pilzen statt, jedoch nicht in der Cholesterolbiosynthese. Außerdem gehört die C-22-Desaturase zu einer bei Ergosterol-herstellenden Pilzen hochkonservierten Cytochrom P₄₅₀-Superfamilie.⁷⁷ Inhibitoren dieses Enzyms hätten also in einer therapeutischen Anwendung zwei Vorteile: Die C-22-Desaturase kommt nicht in der Cholesterolbiosynthese vor, so dass Nebenwirkungen durch eine

möglicherweise eingeschränkte Cholesterolbiosynthese verhindert werden können und die hohe Konservierung der kodierenden Gene sorgt dafür, dass die Enzyme bei allen Ergosterol-produzierenden Pilzen sehr ähnlich sind. Die C-22-Desaturase gehört wie die C-14-Demethylase zu den mitochondrialen Cytochrom P₄₅₀-Monooxygenasen. Bei Tests an der isolierten C-22-Desaturase konnte nachgewiesen werden, dass einige Azol-Antimykotika, die als Inhibitoren der C-14-Demethylase gelten, ebenfalls die C-22-Desaturase effektiv inhibieren.⁷⁹ Imidazol- und Triazolgruppen als Strukturmerkmale dieser bedeutendsten Klasse der therapeutisch eingesetzten Antimykotika zeichnet ein hohes Potential aus, CYP-Enzyme der Sterolbiosynthese aufgrund der Komplexierung des Protohäm-Eisens zu inhibieren (Kapitel 1.2.4), und sollten deswegen in die Seitenkette eines Sterolgrundkörpers eingebracht werden.

Ebenso sind Hydroxamsäuregruppen etablierte Funktionalitäten in der Wirkstoffentwicklung. Unter den Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAC-Inhibitoren) finden sich Beispiele wie Vorinostat (Suberoylanilid-hydroxamsäure, SAHA) oder Trichostatin A. Hydroxamsäuregruppen bilden bidentale Chelatkomplexe mit dem Zink der zinkreichen katalytischen Domain der HDACs.⁸⁰ Auch bei allgemeiner Betrachtung von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren finden sich einige Hydroxamate, die neben Carboxylaten, Thiolen und Phosphor-basierten Gruppen als Zink-chelatisierende Gruppen eingesetzt werden.⁸¹ Da die Gruppe also nachweislich als Chelatbildner an Proteinen eingesetzt werden kann, sollte diese Funktionalität auch in der Seitenkette der Sterole eingeführt werden. Es ist möglich, dass auch das zentrale Eisen von Protohämgruppen komplexiert werden kann und damit CYP-Enzyme gehemmt werden könnten.

2.2 Syntheseplanung

Zur Einführung der geplanten Funktionalitäten konnte auf einen bereits in diesem Arbeitskreis etablierten Synthesebaustein zurückgegriffen werden.^{82, 83} In drei Stufen kann aus Ergosterol der Aldehyd (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-ylacetat (**3**) erhalten werden (Abbildung 31).

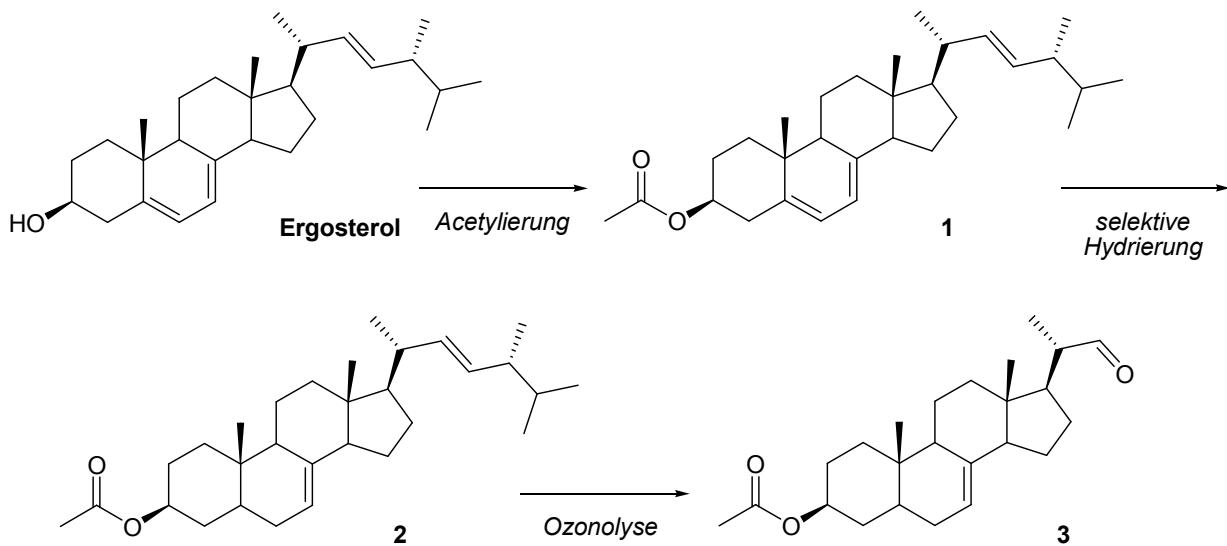


Abbildung 31: Synthese von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-ylacetat (**3**) aus Ergosterol

Aldehyd **3** sollte direkt zu potentiell reaktiven Derivaten umgesetzt werden wie einem Nitril **4** oder einem Epoxid **5** im Sinne einer *Corey-Chaykovsky*-Epoxidierung (Abbildung 34).

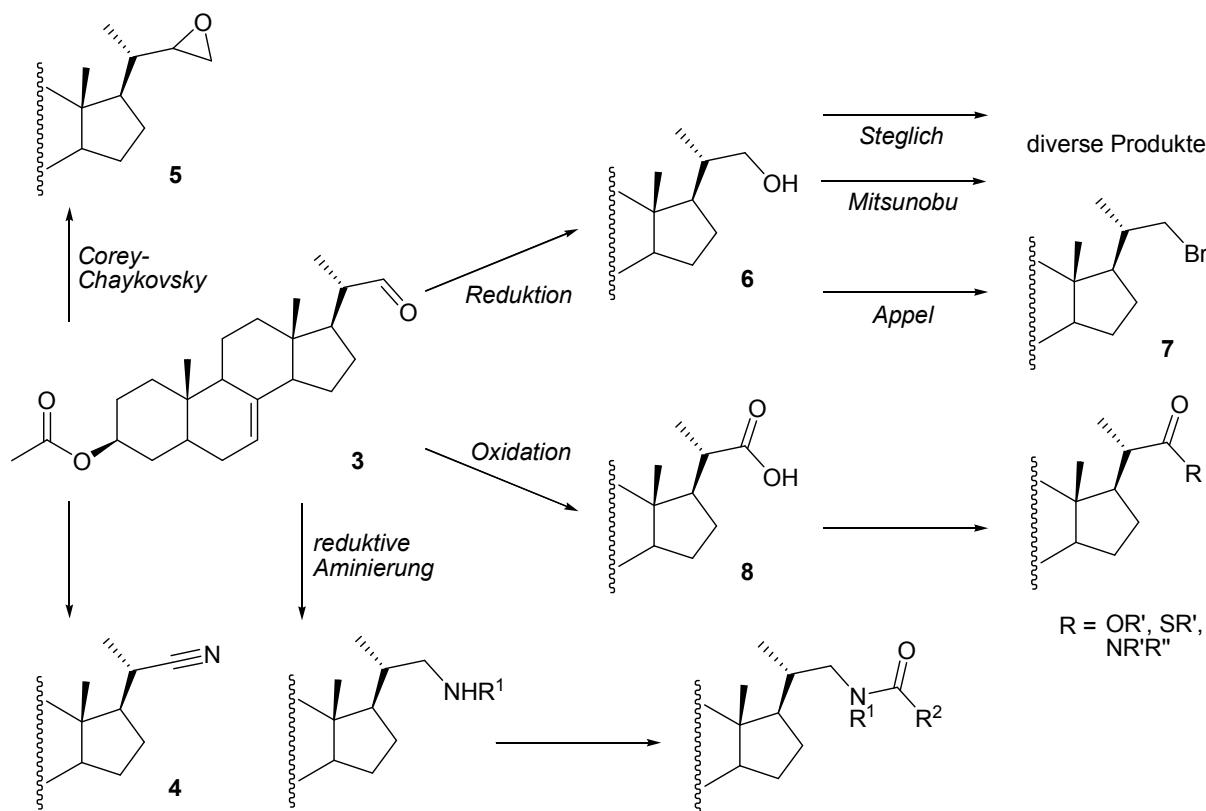


Abbildung 32: Geplante Umsetzungen von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-ylacetat (3), Auswahl

Der Aldehyd sollte jedoch ebenfalls in unterschiedlichsten Reaktionen zu vielseitig verwendbaren Intermediaten umgesetzt werden, wie beispielsweise durch Oxidation zur entsprechenden Carbonsäure **8**, Reduktion zum primären Alkohol **6** oder in Form einer reduktiven Aminierung zum primären oder sekundären Amin. Diese Zwischenstufen sollten weiter umgesetzt werden mit potentiell gegenüber Thiolen oder Thiolaten reaktiven Gruppen oder zu weiteren vielfältig einsetzbaren Zwischenstufen wie dem Alkylbromid **7**. Zur Darstellung der Disulfide konnte auf einen bereits bekannten Synthesebaustein **9**⁷⁶ zurückgegriffen werden (Abbildung 33).

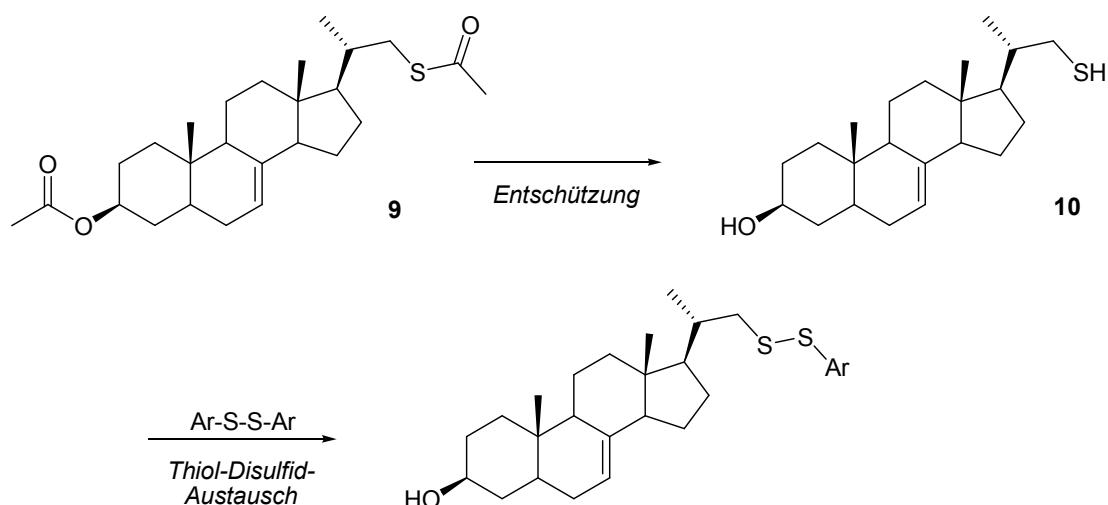


Abbildung 33: Geplante Synthese der Disulfidderivate

Das bekannte Thioacetat **9** sollte durch simultane Entschützung der Hydroxy- und der Thiolgruppe zum freien Thiol **10** umgesetzt werden, das mit symmetrischen Disulfiden in Form eines Thiol-Disulfid-Austausches zu den angestrebten unsymmetrischen Disulfiden umgesetzt werden sollte.

Durch die Möglichkeit Hydroxy-, Amin- und Carboxyfunktionen in der Seitenkette einzuführen kann auch eine große Vielfalt an Estern, Amiden und Thioestern dargestellt werden, um die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Lathosteroloxidase- und Δ^{24} -Reduktase-Inhibitoren von *Giera*⁷⁴ und *Renard*⁷³ zu erweitern. Gleichzeitig reagieren Thioester im Sinne des Additionsschrittes der nativen chemischen Ligation potentiell irreversibel mit Thiolen.

Einfache α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen sollten über eine Veresterung des primären Alkohols **6** mit ungesättigten Carbonsäurechloriden oder alternativ auf der Oxidationsstufe des Ketons in einer *Wittig*- oder einer *Grignard*-Reaktion zugänglich sein (Abbildung 34). Aus dem Carbonsäurechlorid **11** sollte *in situ* ein Phosphorylid dargestellt werden, das in einer *Wittig*-Reaktion mit Acetaldehyd reagieren sollte.

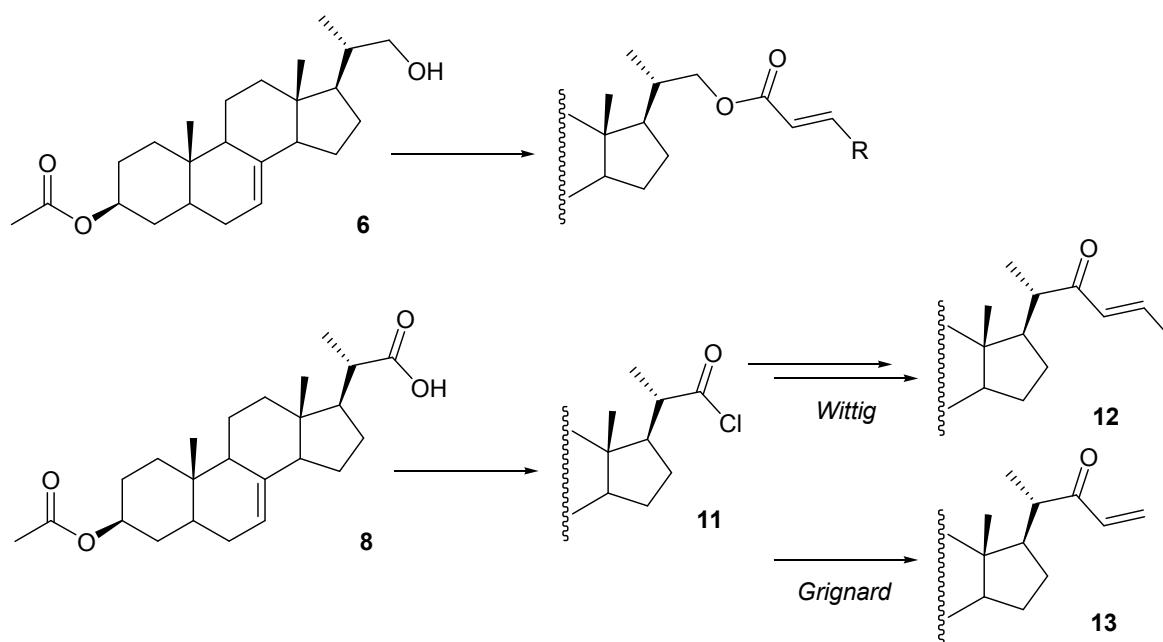


Abbildung 34: Geplante Synthese einfacher Michael-Systeme

Hydroxymethylpyrrole sollte auf zweierlei Art in die Seitenkette integriert werden. Der Pyrrolbaustein **16** sollte mit Hilfe des Alkylbromids **7** *N*-alkyliert werden. Das Acylpyrrol **15** sollte in einer *Stille*-Reaktion des Stannans **17** mit dem Säurechlorid **11** dargestellt werden.

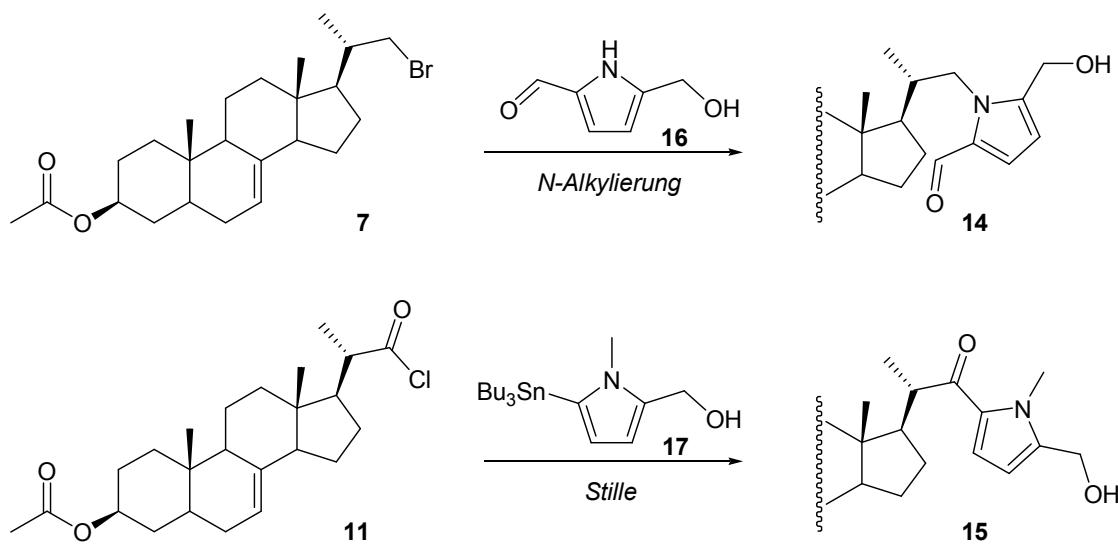


Abbildung 35: Geplante Synthese der Hydroxymethylpyrroloderivate

Für die Einführung der Imidazol- und Triazolreste sollte das Alkylbromid **7** mit den entsprechenden Heteroaromaten unter basischen Bedingungen im Sinne einer nukleophilen Substitution^{84,85} umgesetzt werden zu den Derivaten **19** und **20** (Abbildung 36). Zudem gibt es die Möglichkeit, aus dem Aldehyd **3** mit Glyoxal und Ammoniumhydrogencarbonat im Sinne einer *Radziszewski*-Reaktion⁸⁶ den über C-2 angebundenen Imidazolring neu aufzubauen zum Imidazolderivat **18**.

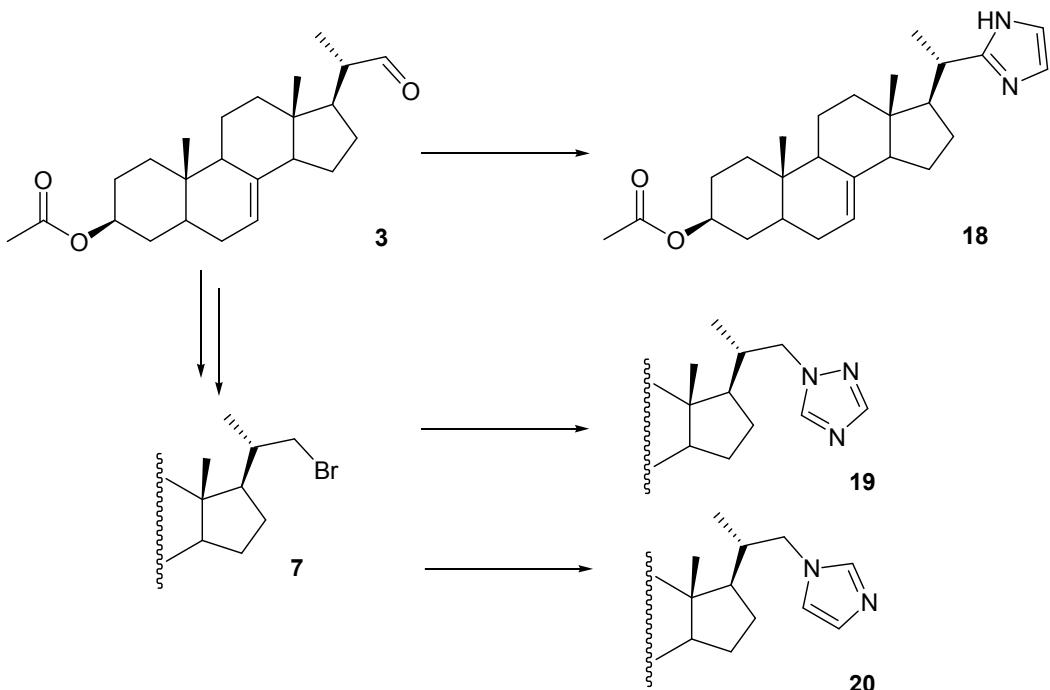


Abbildung 36: Geplante Synthese der Imidazol- und Triazolderivate

Die auch zu den potentiellen C-22-Desaturase-Inhibitoren gehörigen Hydroxamsäurederivate sollten über die Reaktion eines Aktivesters der Carbonsäure **8** mit Hydroxylamin und nachfolgende Alkylierung der Hydroxyfunktion dargestellt werden (Abbildung 37).^{87,88}

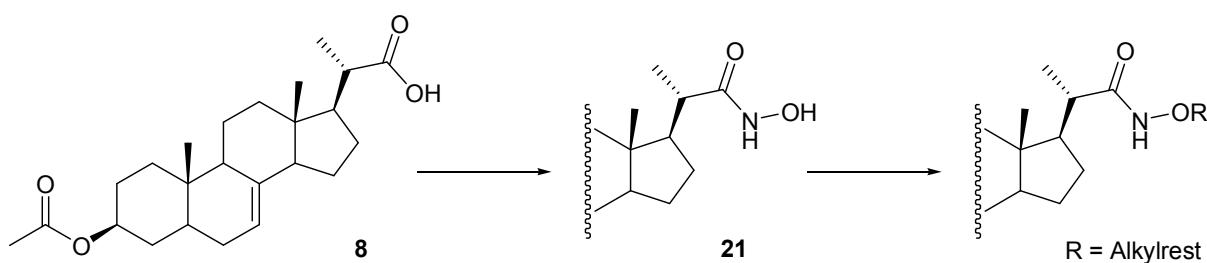


Abbildung 37: Geplante Synthese der Hydroxamsäurederivate

3 SYNTHESEN

3.1 Synthese von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (3)

Die Seitenkettenfunktionalisierten Sterole dieser Arbeit werden alle ausgehend von der zentralen Zwischenstufe (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (3) dargestellt, die über drei Stufen aus Ergosterol gewonnen werden kann. Ergosterol (Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) ist ein biochemisch wichtiger Naturstoff aus der Gruppe der Sterine, der hauptsächlich in den Zellmembranen von Pilzen und Mykoplasmiden vorkommt. Benannt wurde das Mycosterin nach Ergot, einer gebräuchlichen Bezeichnung für die Pilze der Gattung *Claviceps* (Mutterkornpilze), aus denen Ergosterol das erste Mal isoliert werden konnte.⁸⁹

Um die zentrale Zwischenstufe dieser Dissertation zu erhalten, wird Ergosterol in drei Reaktionsschritten zum (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (3) umgesetzt (Abbildung 38).

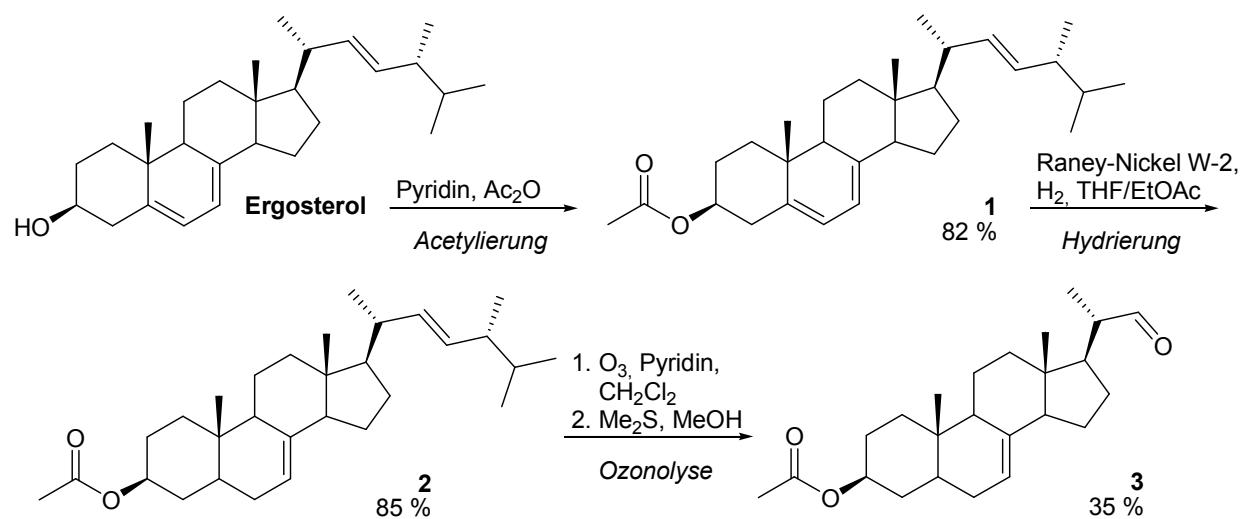


Abbildung 38: Synthese von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (3)

Ergosterol wird unter basischen Bedingungen mit Acetanhydrid zu Ergosterylacetat (**1**) umgesetzt. Die selektive Hydrierung der $\Delta^{5(6)}$ -Doppelbindung katalysiert durch Raney-Nickel W-2^{90,91,92} liefert 5 α ,6-Dihydroergosterylacetat (**2**) mit einer Ausbeute von 70 % über beide Schritte. Die nachfolgend durchgeführte Ozonolyse der $\Delta^{22(23)}$ -Doppelbindung führt nach reduktiver Aufarbeitung des Reaktionsgemisches mit Methanol und Dimethylsulfid zur zentralen Zwischenstufe (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (**3**).

Dieses Reaktionsschema, um ausgehend von Ergosterol das gewünschte (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (**3**) in drei Schritten zu erhalten, ist in der Arbeitsgruppe von Franz Bracher bereits etabliert.^{82,83} Sowohl die Einführung der Acetylschutzgruppe als auch die selektive Hydrierung der $\Delta^{5(6)}$ -Doppelbindung konnte in sehr guten Ausbeuten reproduziert werden. Die Ozonolyse führte zu ebenso mäßigen Ausbeuten wie bei früheren Mitarbeitern.^{71,73}

In dieser Dissertation wurde kein Versuch unternommen, die Ausbeuten der Ozonolyse zu steigern, da bereits in mehreren anderen Arbeitsgruppen die selektive Ozonolyse der $\Delta^{22(23)}$ -Doppelbindung von 5 α ,6-Dihydroergosterylacetat (**2**) untersucht wurde und nie bessere Ausbeuten als 40 % erzielt wurden.^{93,94,95} Außerdem wurde von *Hantelmann*⁷¹ und *Renard*⁷³ bereits versucht, durch Änderung verschiedener Parameter zu besseren Ausbeuten zu gelangen. Da in vorhergehenden Versuchen dieser Dissertationen auch keine alternative Strategie zum gewünschten Aldehyd **3** führte, wurde die Entstehung von Nebenprodukten so weit wie möglich eingedämmt, um so viel Edukt wie möglich, neben dem gewünschten Produkt in akzeptabler Ausbeute, zurückzugewinnen.^{71,73}

Mit dem erhaltenen Aldehyd **3** können verschiedenste Reaktionen durchgeführt werden, wie in der Übersicht bei der Syntheseplanung (Abbildung 32, Kapitel 2.2) bereits skizziert.

3.2 Synthese potentiell irreversibler Inhibitoren

3.2.1 Synthese der Disulfidderivate

Der Prozess der Thiol-Disulfid-Reorganisation, bekannt als Disulfidaustausch, ist die hauptsächlich auftretende Reaktion zur Bildung und Umordnung von Disulfidbindungen in Proteinen. Dabei ändert sich nicht die Anzahl der Disulfidbindungen innerhalb eines Proteins, sondern ausschließlich deren Lage. Dieser Austausch ist im Allgemeinen deutlich schneller als Oxidations- oder Reduktionsreaktionen, was das große Potential dieser Reaktion ausmacht.⁹⁶ Auch *in vivo* findet die Oxidation oder Reduktion von proteinogenen Disulfidbindungen üblicherweise in Form von Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktionen mit Thiolen wie Glutathion oder DTT statt.⁹⁷

Folglich sollte eine synthetische Verbindung, die eine Disulfidbindung mit einer guten Abgangsgruppe enthält, diese Austauschreaktion ebenso eingehen (Abbildung 39).



Abbildung 39: Thiol-Disulfid-Austausch als Reaktionsprinzip zur Inhibition von Enzymen

Gerade Pyridyldisulfidderivate sind zur Darstellung von kovalent gebundenen Enzym-Inhibitor-Komplexen in der Forschung bereits etabliert. Sterol-Disulfidderivate, als potentiell kovalent bindende Inhibitoren, können ausgehend von der bereits während der Forschungszeit zur Master Thesis erfolgreich dargestellten Zwischenstufe **9** erhalten werden.⁷⁸ Diese kann in sehr guten Ausbeuten aus der zentralen Zwischenstufe **3** in zwei Stufen, einer Reduktion zum primären Alkohol **6** und einer nachfolgenden *Mitsunobu*-Reaktion mit Thioessigsäure zum Thioacetat **9**, dargestellt werden (Abbildung 40).

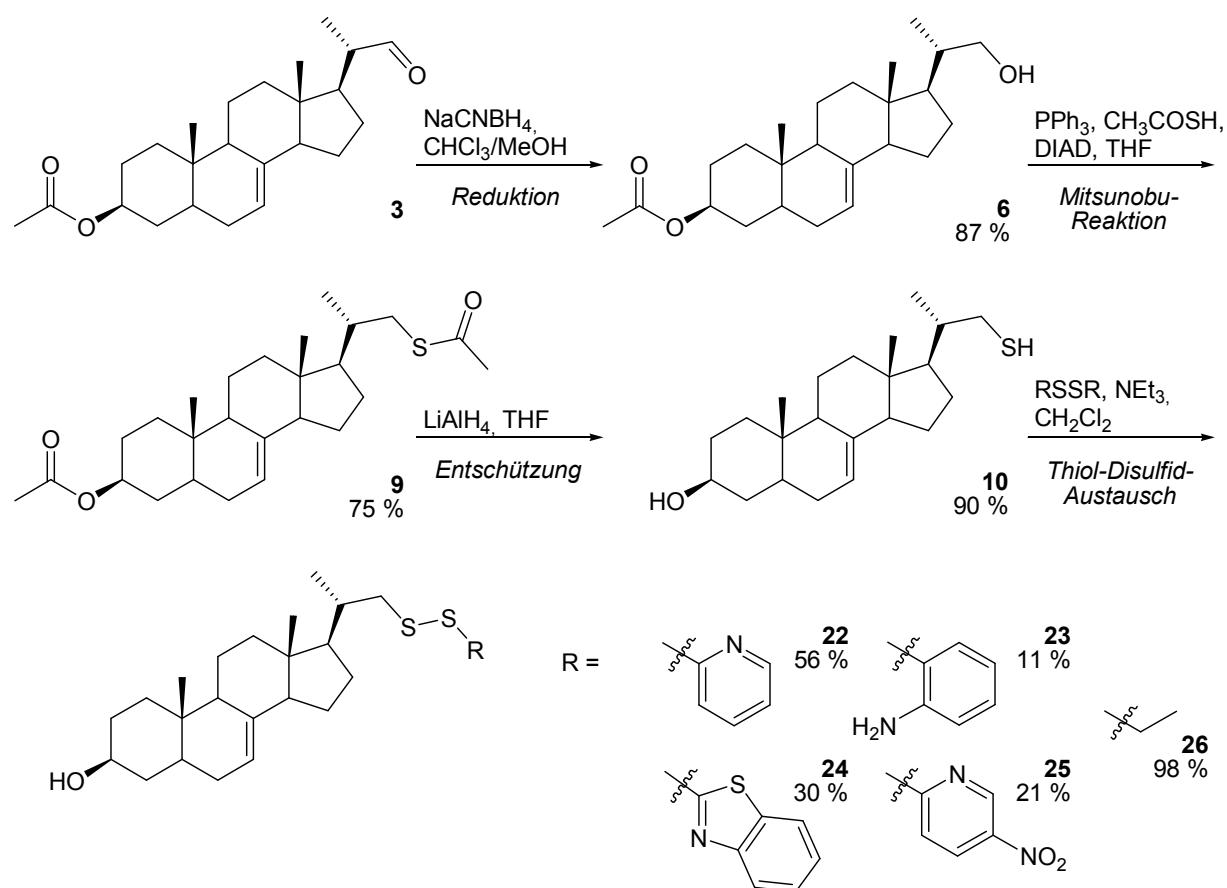


Abbildung 40: Synthese der unsymmetrischen Disulfide **22** - **26**

Die Hydroxygruppe an C-3 und die Thiolfunktion in der Seitenkette des bekannten Thioacetats **9** können in einem einzigen Schritt mit Lithiumaluminiumhydrid in sehr guten Ausbeuten entschützt werden. Das primäre Thiol **10** kann im Sinne eines Thiol-Disulfid-Austausches mit symmetrischen aromatischen Disulfiden⁹⁸ zu den unsymmetrischen Disulfiden **22** - **25** mit aromatischen Resten umgesetzt werden. Diese Reaktion gelingt ausschließlich unter basischen Bedingungen in Ausbeuten zwischen 11 % und 56 %. Das Anilinderivat **23** ist im Gegensatz zu den anderen Disulfiden mit aromatischen Resten nicht stabil und zersetzt sich vor allem in Lösung schnell. In einer analogen Reaktion kann das unsymmetrische Alkyldisulfid **26** im Sinne eines Thiol-Disulfid-Austausches mit Diethyldisulfid in nahezu quantitativer Ausbeute dargestellt werden.

Es gelang weiterhin die Synthese eines homologen unsymmetrischen Pyridyldisulfids **32** (Abbildung 41). Aus dem bekannten Aldehyd **3** konnte in einer *Wittig*-Reaktion der bekannte Methylether **27**⁸³ dargestellt werden, der wiederum zum homologen

Aldehyd **28** sauer hydrolysiert wurde. Der Aldehyd **28** kann in der für die unsymmetrischen Disulfide erarbeiten Synthesestrategie über die Reduktion zum primären Alkohol **29**, eine *Mitsunobu*-Reaktion zum Acetylthioderivat **30** und die Entschützung zum freien Thiol **31** zum umsymmetrischen Disulfid **32** umgesetzt werden (Abbildung 41).

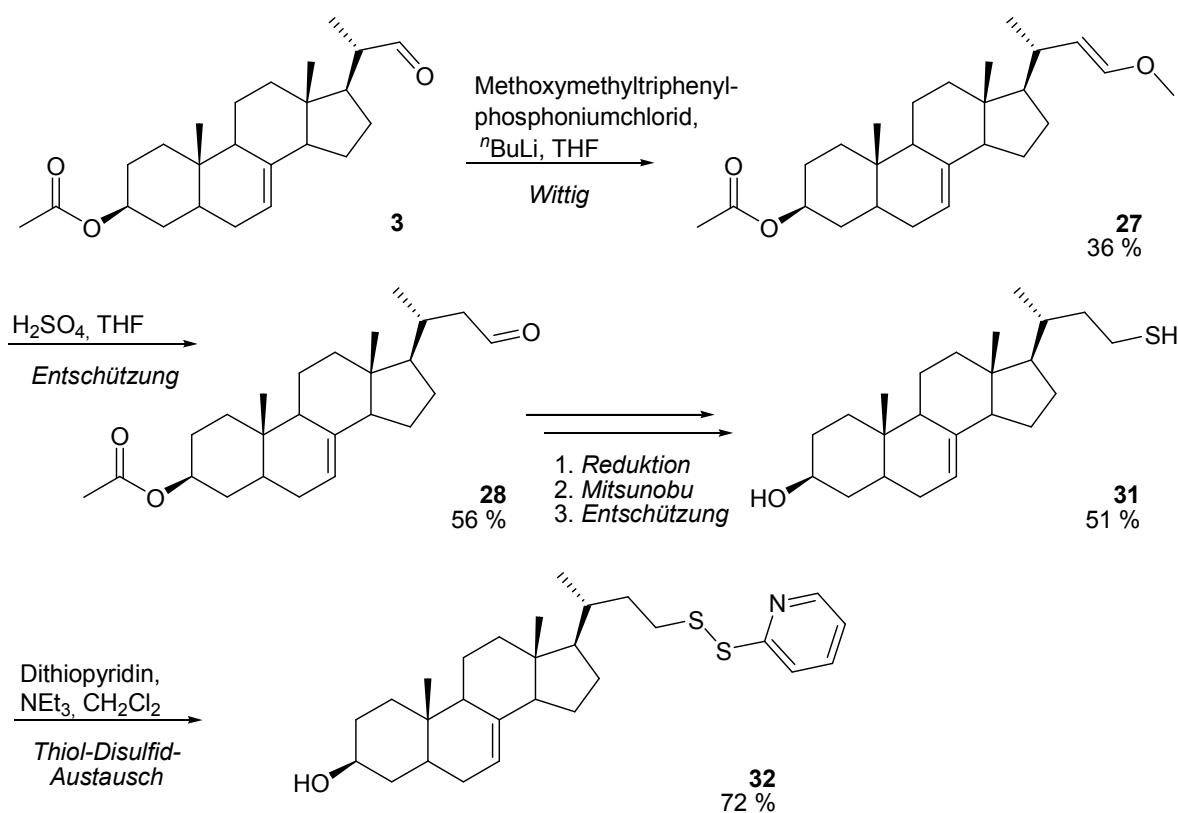


Abbildung 41: Synthese des unsymmetrischen Disulfids **32**

Da das homologe Disulfid **32** keine Veränderung oder Verbesserung der enzyminhibitorischen Wirkung in den biologischen Testsystemen zeigte, wurde es bei diesem einen Beispiel belassen.

3.2.2 Synthese der Thioester

In den letzten Jahren hat das Interesse an Verfahren zum Proteinaufbau sehr stark zugenommen.⁹⁹ Dazu gehört auch das Prinzip der nativen chemischen Ligation, das bereits 1953 von *Wieland*¹⁰⁰ entdeckt und 1994 von *Kent*¹⁰¹ neu aufgegriffen wurde.

Dabei werden chemoselektiv in neutraler wässriger Lösung zwei ungeschützte Peptidbausteine miteinander verknüpft (Abbildung 42).

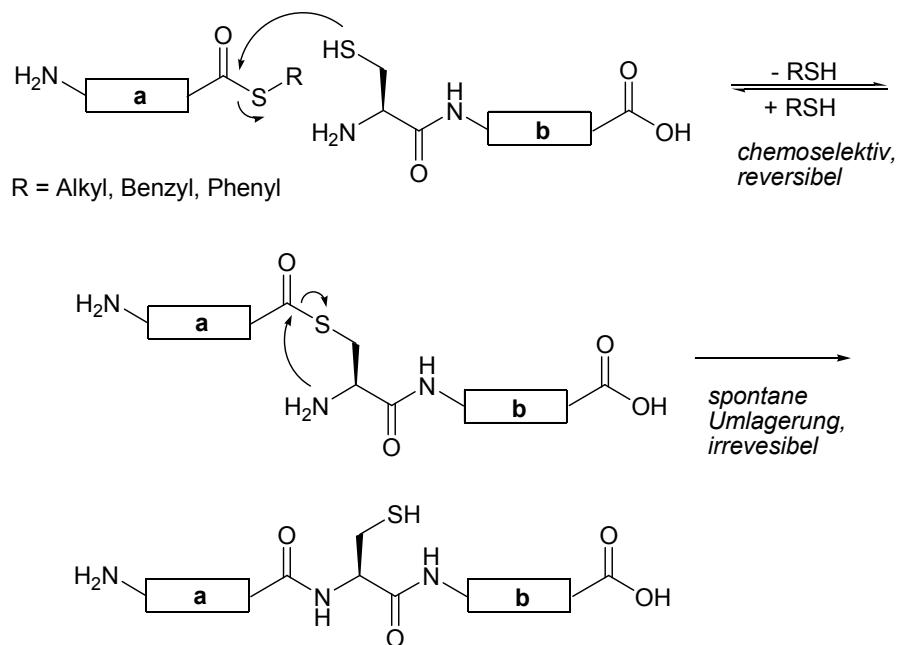


Abbildung 42: Mechanismus der nativen chemischen Ligation^{3,95}

Der Peptidbaustein **a** enthält einen C-terminalen Thioester und Baustein **b** einen N-terminalen Cysteinrest. Der initiale Schritt ist der nukleophile Angriff der N-terminalen Thiolgruppe am α -Thioester des Peptids **a**, wodurch es zu einer reversiblen Thioumesterung kommt. Das entstehende Intermediat **c** lagert spontan irreversibel zu einer Peptidbindung um.

Dieses wichtige Konzept sollte auch in dieser Dissertation durch die Synthese von Thioesterderivaten angewandt werden. Inhibitoren, die eine Thioesterfunktionalität enthalten, könnten mit einem Cysteinrest im aktiven Zentrum eines Enzyms im Sinne einer reversiblen Thioumesterung reagieren, und somit eine reversible kovalente Bindung zum Enzym ausbilden.

Zur Darstellung der gewünschten Derivate wurde in einem ersten Schritt die zentrale Zwischenstufe **3** nach einer etablierten Vorschrift mit Kaliumpermanganat im Sauren zur Carbonsäure **8** oxidiert (Abbildung 43).⁸²

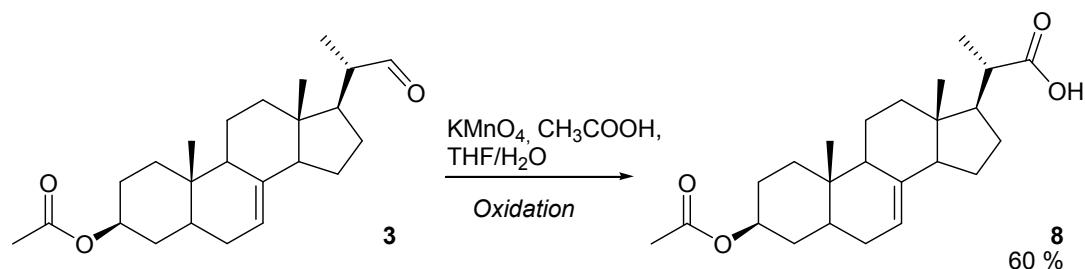


Abbildung 43: Synthese von (3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäure (8)

Die Carbonsäure sollte mit entsprechenden Thiolen im Sinne einer *Steglich-Veresterung* umgesetzt werden (Abbildung 44). Dafür wurden Standardbedingungen¹⁰² gewählt, unter denen Carbonsäuren mit DCC und DMAP in Dichlormethan zu sogenannten Aktivestern umgesetzt werden. Diese reagieren mit einem Überschuss an Thiol bei niedrigen Temperaturen zu den entsprechenden Thioestern. Am Sterolgrundkörper konnte auch bei längeren Reaktionszeiten und größerem Überschuss eines Thiols nur eine sehr geringe Umsetzung festgestellt werden. Der *iso*-Butyl-Thioester **33** konnte nur in 5 % Ausbeute erhalten werden.

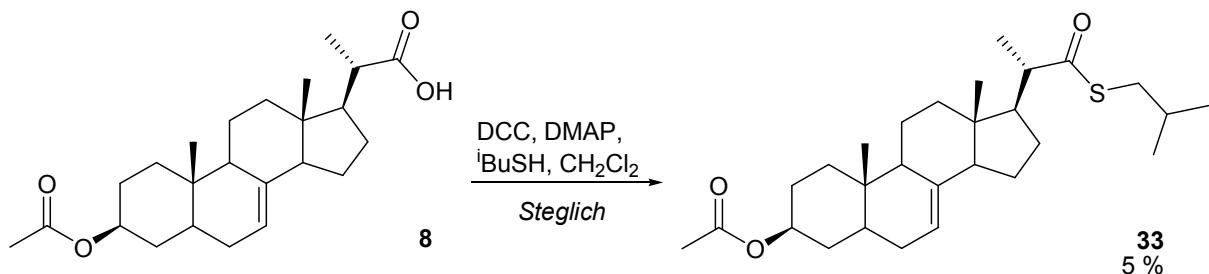


Abbildung 44: Synthese von (3*S*,20*S*)-20-(*t*Butylsulfanylcarbonyl-methyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**33**) nach Steglich

Als Alternative wurde das reaktive Säurechlorid **11** unter Standardbedingungen^{74,103} dargestellt und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt. Für die Umsetzung wurden die Reaktionsbedingungen der *Einhorn*-Variante der *Schotten-Baumann*-Reaktion gewählt (Abbildung 45).¹⁰⁴ Bei dieser Variante dient Pyridin als Base und aktivierendes Agens. Es reagiert zunächst mit Säurechloriden zu reaktiven *N*-Acyl-Pyridiniumverbindungen, die nukleophil angegriffen werden können. Der dabei entstehende Chlorwasserstoff wird als Pyridiniumchlorid gebunden. Unter diesen Bedingungen konnte der Thioester **33** auch nur in 11 % Ausbeute erhalten werden.

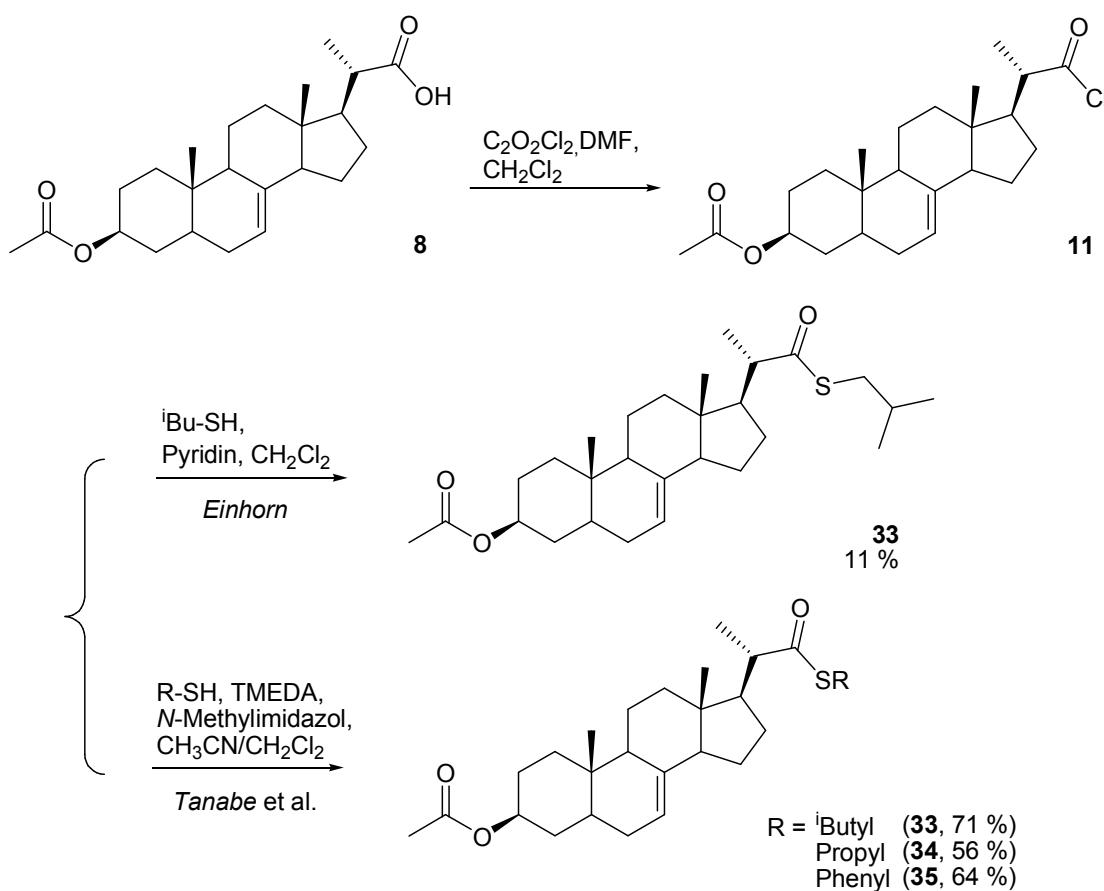


Abbildung 45: Synthese von (3S,20S)-20-($^i\text{Butylsulfanylcarbonyl-methyl})$ -pregn-7-en-3-ylacetat (33) nach Schotten-Baumann (Einhorn-Variante) und der Thioester 33 - 35 nach Tanabe et al.¹⁰⁵

Es zeigte sich jedoch, dass eine Umsetzung des Säurechlorids ähnlich der von Tanabe et al.¹⁰⁵ publizierten Methode zur Darstellung verschiedener Thioester am besten geeignet ist. Hierbei konnte das Säurechlorid 11 mit den entsprechenden Thiolen unter Zugabe von äquimolaren Mengen N -Methylimidazol und N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin (TMEDA) zu den Thioestern 33 - 35 in Ausbeuten zwischen 56 % und 71 % umgesetzt werden. TMEDA wird hier als billige und gut verfügbare Hilfsbase eingesetzt.¹⁰³ N -Methylimidazol dient ebenfalls als Scavenger für freiwerdenden Chlorwasserstoff und aktiviert gleichzeitig das Carbonsäurechlorid 11 effektiv durch die Bildung eines reaktiven N -Acylammoniumsalzes.¹⁰⁶

3.2.3 Synthese der Epoxide

Epoxide sind Bestandteil vieler biologisch aktiver Naturstoffe, wie Trapoxin B¹⁰⁷, Epoxomicin¹⁰⁸, Fumagillin¹⁰⁹ oder die Steroide der Gruppe der Withanolide¹¹⁰. Sie bilden in vielen Fällen mit ihren Target-Proteinen über eine nukleophile Öffnung des Epoxidrings kovalente Bindungen aus (Abbildung 46).¹¹¹ Die gegenüber Epoxiden reaktivsten Nukleophile, die in Proteinen vorkommen, sind freie Thiolgruppen.¹¹²

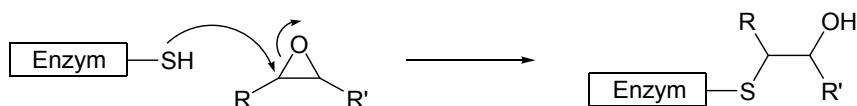


Abbildung 46: Nukleophile Öffnung eines Epoxids als Reaktionsprinzip zur Inhibition von Enzymen

Es gibt viele Methoden, Epoxide darzustellen, wie beispielsweise die *Corey-Chaykovsky*-Reaktion oder auch die *Prilezhaev*-Reaktion, die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden. In der *Corey-Chaykovsky*-Epoxidierung werden Schwefel-Ylide mit Carbonylverbindungen zu Epoxiden umgesetzt. Die Ylide werden *in situ* durch Deprotonierung von Sulfoniumsalzen mit starken Basen dargestellt. Unter den hier gezeigten Reaktionsbedingungen wird in einem ersten Schritt DMSO durch Dimethylsulfat zum Trimethylsulfoxonium-methylsulfat methyliert. Diese Zwischenstufe kann durch Kaliumhydroxid zum reaktiven Dimethyloxosulfonium-methylid deprotoniert werden, das formal eine Methylengruppe auf eine Carbonylgruppe überträgt (Abbildung 47).

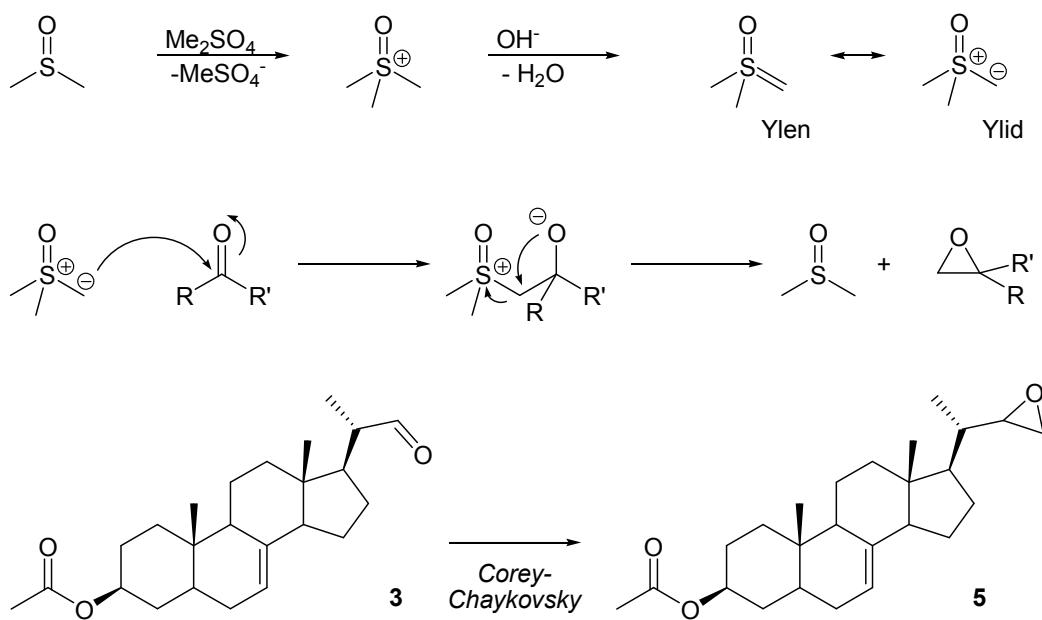


Abbildung 47: Corey-Chaykovsky-Epoxidierung, Mechanismus und Anwendung

Die Masse des gewünschten Produktes **5** konnte im Rohprodukt massenspektrometrisch nachgewiesen werden, und auch die Fragmentierung ließ auf die Entstehung des gewünschten Produkts schließen. Allerdings ließ sich das Rohprodukt durch chromatographische Verfahren nicht aufreinigen, so dass keine detaillierte Analytik möglich war. Die Beobachtung mittels DC-Analytik während der Aufreinigung legte die Vermutung nahe, dass die Epoxidfunktion sowohl auf Kieselgel als auch auf Aluminiumoxid in verschiedenen Laufmittelgemischen nicht stabil ist und in unterschiedliche Verbindungen zerfällt oder umlagert.

Die *Prilezhaev*-Reaktion ermöglicht die *syn*-selektive Epoxidierung von Alkenen zu Oxiranen mit Hilfe von Persäuren, meistens mit der aufgrund ihrer Stabilität kommerziell erhältlichen *meta*-Chlorperbenzoësäure (*m*CPBA). Um diese Reaktion in der Seitenkette der Pregn-7-en-derivate anwenden zu können musste zuerst eine Doppelbindung eingeführt werden, die nachfolgend epoxidiert werden kann. Setzt man den Aldehyd **3** unter *Wittig*-Bedingungen mit Ethyltriphenylphosphoniumbromid um, ist das Alken **30** in mäßiger Ausbeute darstellbar (Abbildung 48).

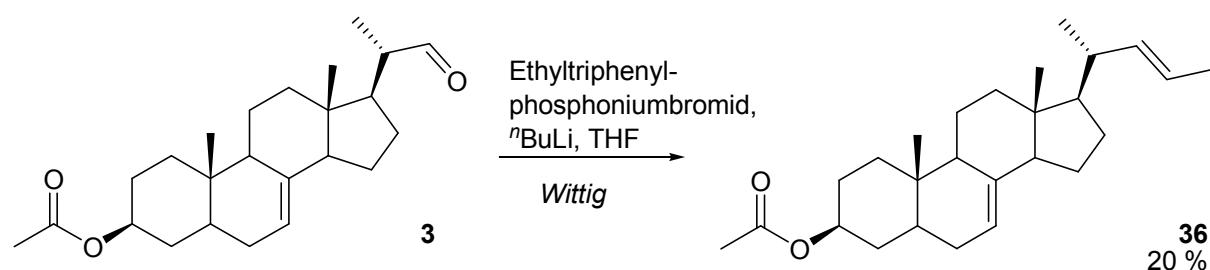


Abbildung 48: Synthese von (3S,20S)-20-((E)-Prop-1-enyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**36**)

Für die Epoxidierung mit *m*CPBA wurde die Persäure nur äquimolar eingesetzt und entgegen der Standardvorschrift das Alken vorgelegt und nicht *m*CPBA, um die Epoxidierung an der zweiten Doppelbindung im Ring B möglichst weitgehend zu vermeiden (Abbildung 49).

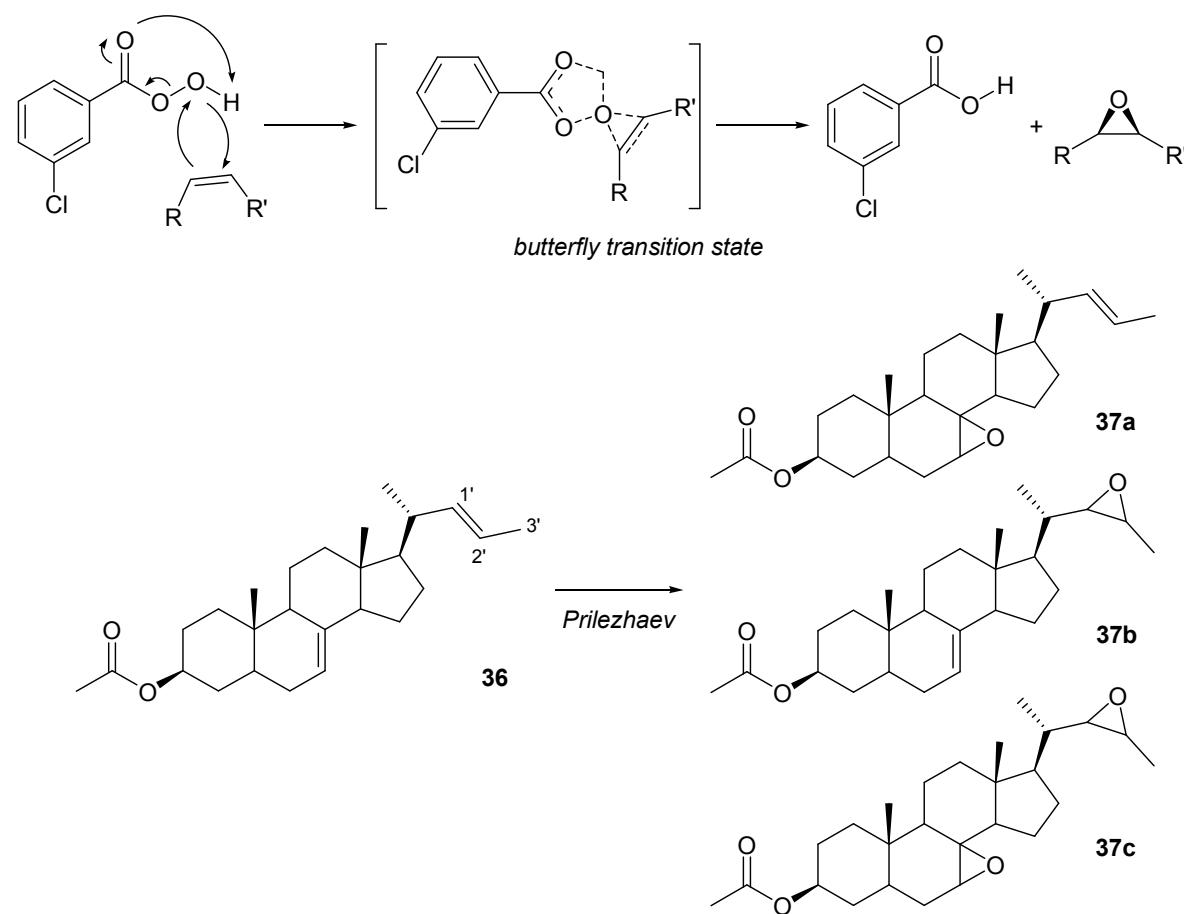


Abbildung 49: Prilezhaev-Epoxidierung, Mechanismus und Anwendung

Die Doppelbindung in der Seitenkette sollte hierbei bevorzugt angegriffen werden, da die Doppelbindung des B-Rings des Sterolgrundgerüstes aus sterischen Gründen

nicht gut zugänglich ist. Nichtsdestotrotz entstand ein Gemisch aus zweifach und einfach epoxidierten Produkten, das sich ebenfalls in chromatographischen Verfahren nicht vollständig aufréinigen ließ. Auch hier scheint es, dass sich die epoxidierten Verbindungen durch die Anwendung chromatographischer Verfahren in Lösung zersetzen oder umlagern.

Da sich Epoxide in der Seitenkette von Sterolderivaten also offensichtlich nicht in der Darstellung sondern bezüglich der Aufréinigung sowie der Stabilität in Lösung als problematisch erweisen, wurde darauf verzichtet, dieses Thema weiter zu verfolgen. Gerade die Zersetzung der Epoxide in Lösung macht Derivate dieser Verbindungsklasse uninteressant, da so auch keine biologische Testung mit relevanten Ergebnissen möglich ist.

3.2.4 Synthese der Nitrile

Nitrilgruppen sind in mehreren therapeutisch relevanten Wirkstoffen zu finden, die als nicht-kompetitive Antagonisten verschiedener Enzyme wirken, wie beispielsweise Vildagliptin (Diabetes), Etravirin (HIV) oder Rilpivirin (HIV). Nitrile können im Sinne einer *Pinner*-Reaktion reversible kovalente Bindungen mit Thiolgruppen eingehen (Abbildung 50).

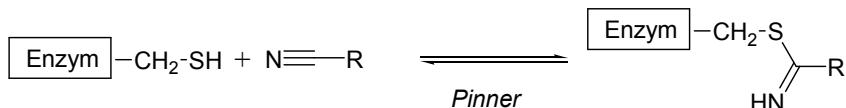


Abbildung 50: *Pinner*-Reaktion als Reaktionsprinzip zur Inhibition von Enzymen

In dieser Dissertation war die Synthese eines ersten Seitenketten-Nitrils durch direkte Umsetzung des Aldehyds **3** geplant. Dafür wurde (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (**3**) unter mehreren unterschiedlichen Bedingungen umgesetzt, bis eine Methode erarbeitet werden konnte, die sowohl die Löslichkeit des Edukts und der Reagenzien als auch den kontrollierten Ablauf der Reaktion gewährleistet (Tabelle 2).

Reaktionsbedingungen	Ergebnis
Hydroxylamin-O-sulfonsäure, Wasser, 3 h, RT ¹¹³	Keine Reaktion
Hydroxylamin-O-sulfonsäure, Wasser, 3 h, Rückfluss	Keine Reaktion
Hydroxylamin-O-sulfonsäure, DMSO, 48 h, RT	Produkt massenspektrometrisch nachweisbar
Hydroxylamin-O-sulfonsäure, DMSO/Wasser, 48 h, RT	Produkt massenspektrometrisch nachweisbar
Hydroxylamin-Hydrochlorid, Ameisensäure, 30 min, Rückfluss ¹¹⁴	Produkt massenspektrometrisch nachweisbar
Hydroxylamin-Hydrochlorid, Ameisensäure/DMSO, 2 h, Rückfluss	Produkt isolierbar (Ausbeute: 28 %)

Tabelle 2: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Nitrils **4** aus dem Aldehyd **3**

Erfolgreich war hier mit mäßiger Ausbeute die Umsetzung von **3** mit Hydroxylamin-Hydrochlorid in einem Lösungsmittelgemisch von Ameisensäure und DMSO, das zum Rückfluss erhitzt wurde (Abbildung 51).

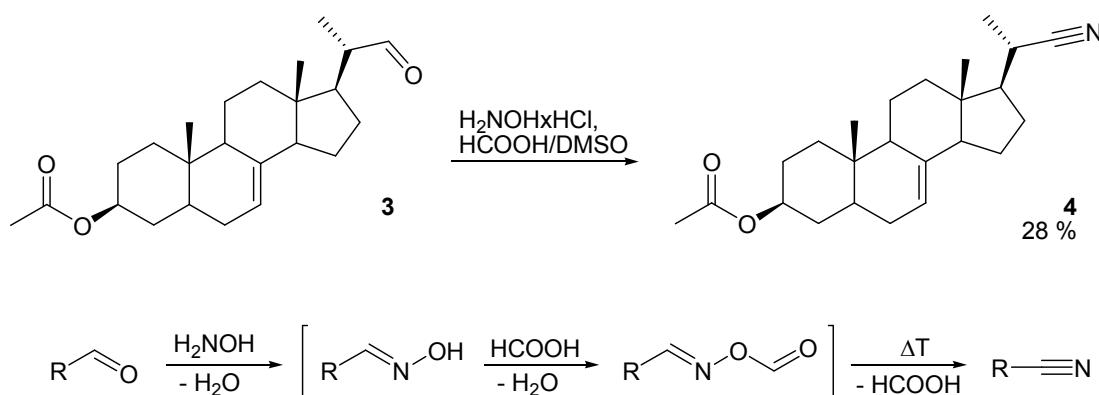


Abbildung 51: Synthese von (3S,20S)-20-Cyanopregn-7-en-3-ylacetat (**4**) und Reaktionsmechanismus⁸¹

Der Mechanismus dieser Reaktion verläuft vermutlich über die Kondensation des Aldehyds mit Hydroxylamin zu einem Aldoxim. Daraus kann intermediär ein Aldoximformiat gebildet werden, dass bei Erhitzen Ameisensäure abspaltet, so dass gleichzeitig der Kohlenstoff oxidiert wird.

In einem weiteren Ansatz wurde das bereits bekannte Alkylbromid **7** in einer *Kolbe*-Nitrilsynthese mit Kaliumcyanid in Aceton umgesetzt. Diese Reaktion führt zu dem homologen Nitrit **38** in akzeptabler Ausbeute (Abbildung 52).

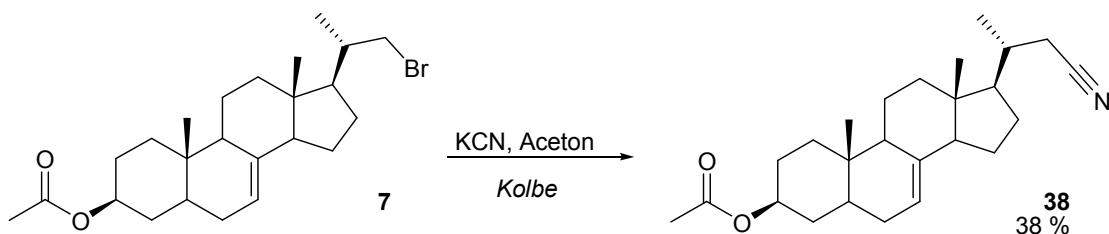


Abbildung 52: Synthese von (3S,20S)-20-Cyanomethylpregn-7-en-3-ylacetat (**38**)

3.2.5 Synthese der *Michael*-Systeme

Die chemoselektive *Michael*-Addition von Schwefel-Nukleophilen an α,β -ungesättigte Carbonylderivate wie beispielsweise Maleinimide ist eine bewährte Konjugationstechnik zur kovalenten Modifizierung von Proteinen (Abbildung 53). Üblicherweise werden dabei Fluorophore unter physiologischen Bedingungen (pH 7, Raumtemperatur) an biologisch relevanten Molekülen verankert. Obwohl die Selektivität dieser Reaktion durch weitere Cysteinreste im Molekül potenziell beeinträchtigt wird, findet diese Reaktion breite Anwendung,¹¹⁵ vor allem für selektive Funktionalisierungen von Proteinen, die nur ein solvensexponiertes Cystein aufweisen.¹¹⁶

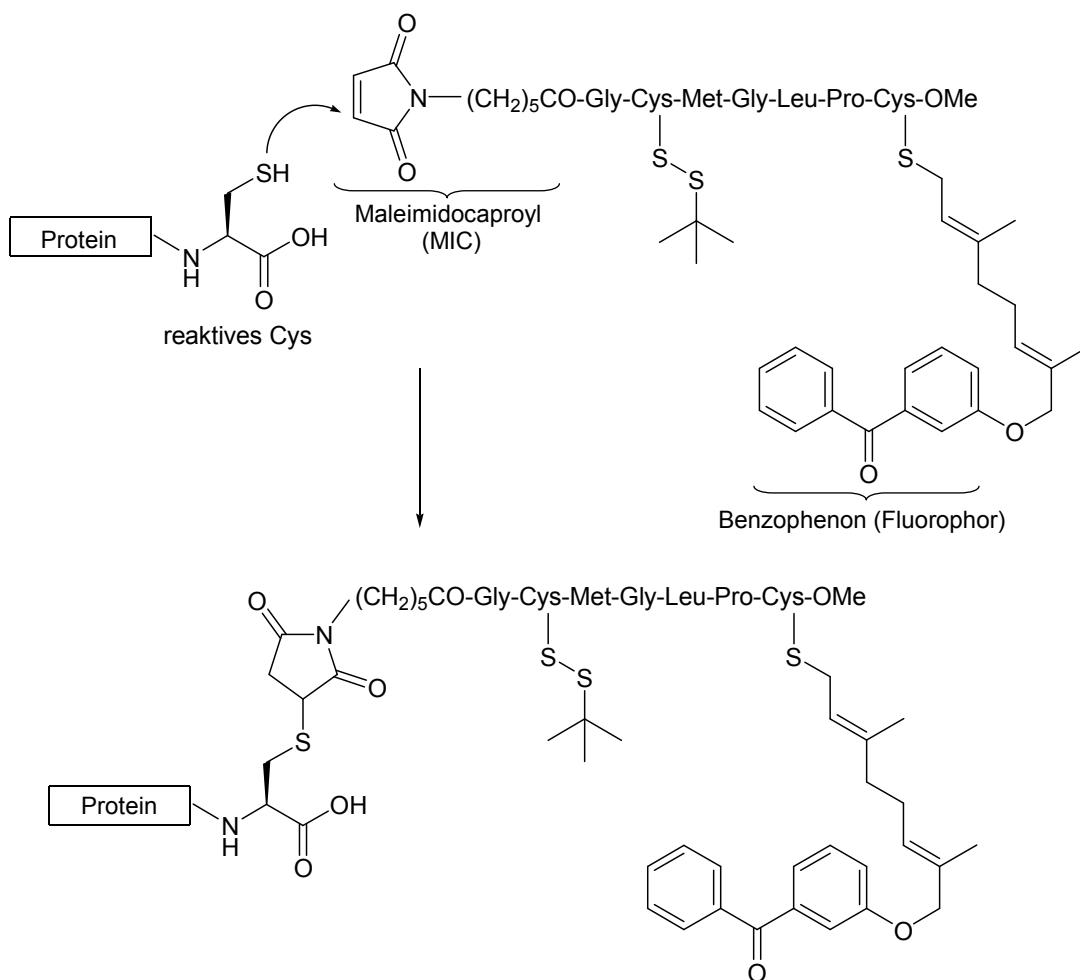


Abbildung 53: Ligation von Fluorophoren an Proteine, MIC-Strategie (Beispiel)¹¹⁷

Mit der Einführung α,β -ungesättigter Carbonylgruppen in die Seitenkette des Sterols können potentiell kovalent bindende Verbindungen dargestellt werden, die bei geeignetem Strukturdesign gleichzeitig die Seitenkette sehr gut imitieren. Deshalb sollte der Steroidalkohol **6** in α,β -ungesättigte Ester überführt werden, die von der Größe des Acylrestes her die Steroidseitenkette möglichst gut imitieren.

Zur Darstellung α,β -ungesättigter Ester kann der primäre Alkohol **6** mit entsprechenden Säurechloriden oder anderen aktivierten Carbonsäuren umgesetzt werden. Die gewünschten drei Derivate konnten allerdings nicht nach einem einzigen Standardprotokoll dargestellt werden (Abbildung 54).

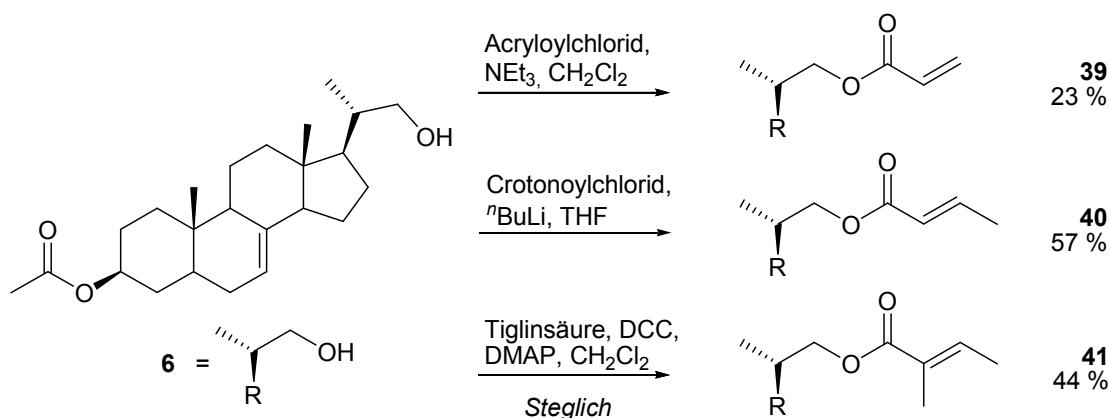


Abbildung 54: Synthese der α,β -ungesättigten Ester **39**, **40** und **41**

Die Umsetzung des primären Alkohols **6** mit Acryloylchlorid konnte mit Triethylamin als Hilfsbase mit einer relativ schlechten Ausbeute durchgeführt werden. Für die Umsetzung von **6** mit Crotonoylchlorid hingegen wurde die Base Triethylamin durch *n*BuLi ersetzt¹¹⁸, was zu einer deutlich besseren Ausbeute führte. *n*BuLi wird hier in äquimolaren Mengen zu einer gekühlten Lösung des primären Alkohols **6** gegeben, so dass in einem ersten Schritt ein Lithiumalkoholat entsteht. Dieses kann mit dem anschließend zugegebenen Crotonoylchlorid mit einer Ausbeute von 57 % reagieren. Tiglinsäure wurde hier nicht in Form eines Säurechlorids aktiviert sondern mit dem primären Alkohol **6** im Sinne einer *Steglich*-Veresterung umgesetzt. Die Carbonsäure wird hier durch die Zugabe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zu einem O-Acylisoharnstoff umgesetzt, dessen Reaktivität mit dem entsprechenden Anhydrid der Säure vergleichbar ist. 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) wird in katalytischen Mengen als Acyltransferreagenz zugegeben, um die Nebenreaktion in Form einer 1,3-Umlagerung des O-Acylisoharnstoffs zu einem *N*-Acylharnstoff zu verhindern. Das durch die Reaktion mit DMAP entstehende reaktive *N*-Acylpyridiniumsalz reagiert mit dem Steroidalkohol **6** zum Ester **41** in akzeptabler Ausbeute.

In einem ersten Ansatz zur Veresterung des primären Alkohols **6** mit Tiglinsäure wurden allerdings Reaktionsbedingungen in Anlehnung an ein US-amerikanisches Patent gewählt. In Anwesenheit äquimolarer Mengen Orthoameisensäuretrimethylester und katalytischer Mengen *para*-Toluolsulfonsäure sollen Carbonsäuren besonders effektiv mit Alkoholen umgesetzt werden. Der unter diesen

Reaktionsbedingungen entstehende Ameisensäureester **42**, deutet jedoch auf eine Nebenreaktion hin (Abbildung 55).

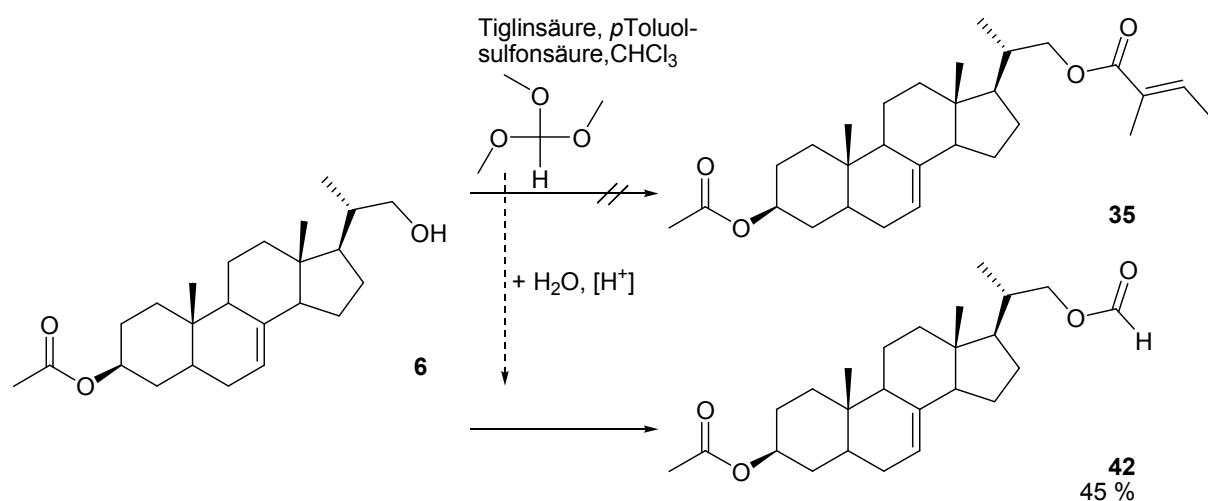


Abbildung 55: Entstehung von (3S,20S)-20-(Formyloxymethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**42**)

Sauer katalysiert kommt es zu einer Nebenreaktion des primären Alkohols **6** mit Orthoameisensäuretrimethylster und der Ameisensäureester **42** entsteht in signifikanten Mengen. Der Alkohol kann dabei entweder direkt mit dem Orthoameisensäuretrimethylster reagieren und anschließend sauer hydrolysiert werden oder mit dem durch Hydrolyse des Hilfsreagenzes entstehenden Ameisensäuremethylester.

Aza-peptidyl-*Michael*-Akzeptoren der generellen Struktur Cbz-Ala-Ala-AAsn-*trans*-CH=CHCOR wurden 2008 als neue Klasse potenter und selektiver Inhibitoren der Asparagyl-Endopeptidase (Leguminosen) vorgestellt.¹¹⁹ Der katalytische Cysteinrest des Enzyms greift die Doppelbindung des *Michael*-Systems nukleophil an und bindet so den Inhibitor irreversibel kovalent (Abbildung 56).

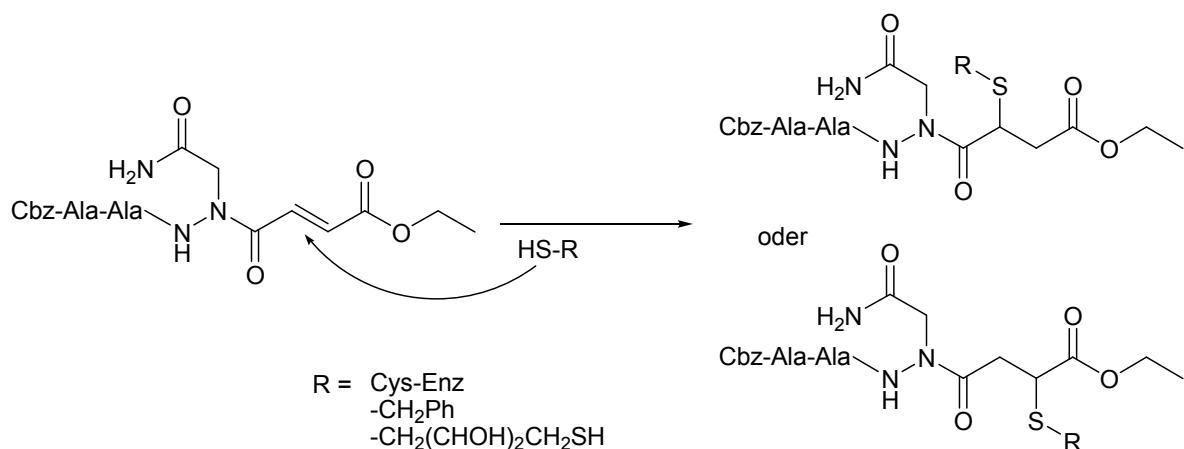


Abbildung 56: Thioalkylierung eines Inhibitors aus der Gruppe der Aza-peptidyl-Michael-Akzeptoren (Beispiel)¹¹⁷

Da Derivate der Fumarsäure also nachweislich mit Cysteinresten reagieren, ist diese Funktionalität eine interessante Ergänzung der seitenkettenfunktionalisierten Sterolderivate mit potentieller Reaktivität gegenüber Thiolen. Besonders interessant ist hierbei auch das Einbringen einer Amidfunktion. Amide können als Sauerstoffbasen protoniert werden, so dass eine positive Ladung in der Seitenkette generiert werden kann.^{120,121} Dadurch könnte der potentielle Inhibitor auch kationische HEIs imitieren, die während eines Enzymkatalysezyklus auftreten, und damit affiner oder auch selektiver gegenüber bestimmten Enzymen sein. Derartige kationische HEIs treten in der Sterolbiosynthese häufig auf, beispielsweise bei den von der C-24-Sterol-Methyltransferase, Δ^{24} -Reduktase oder OSC katalysierten Reaktionen.²⁴ Aufgrund dieser Tatsache sollten zwei verschiedene Verknüpfungen von Fumarsäureamiden mit dem Sterolgrundkörper realisiert werden, die die Amidfunktion jeweils an unterschiedlichen Positionen tragen (Abbildung 57).

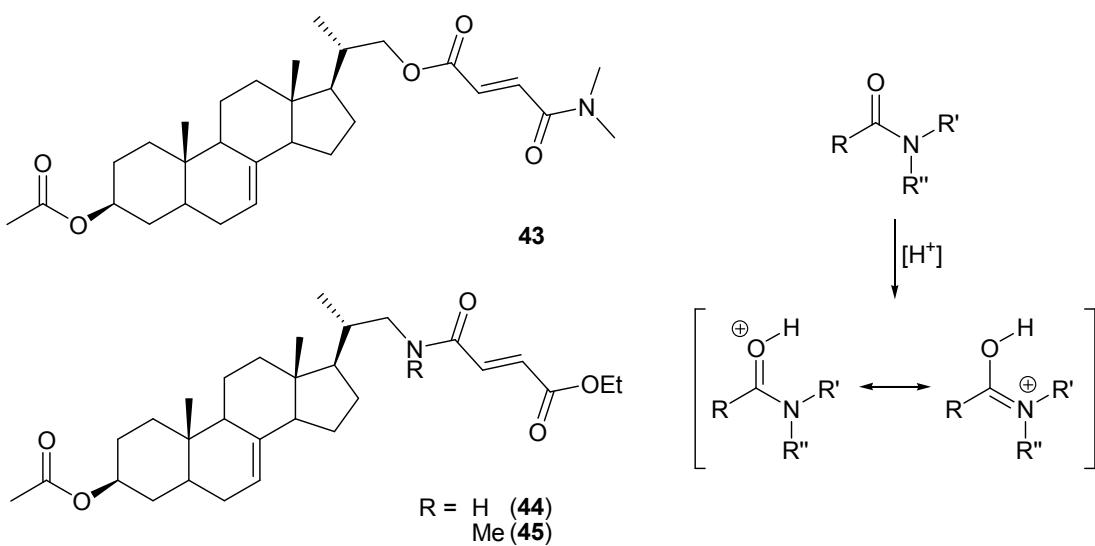
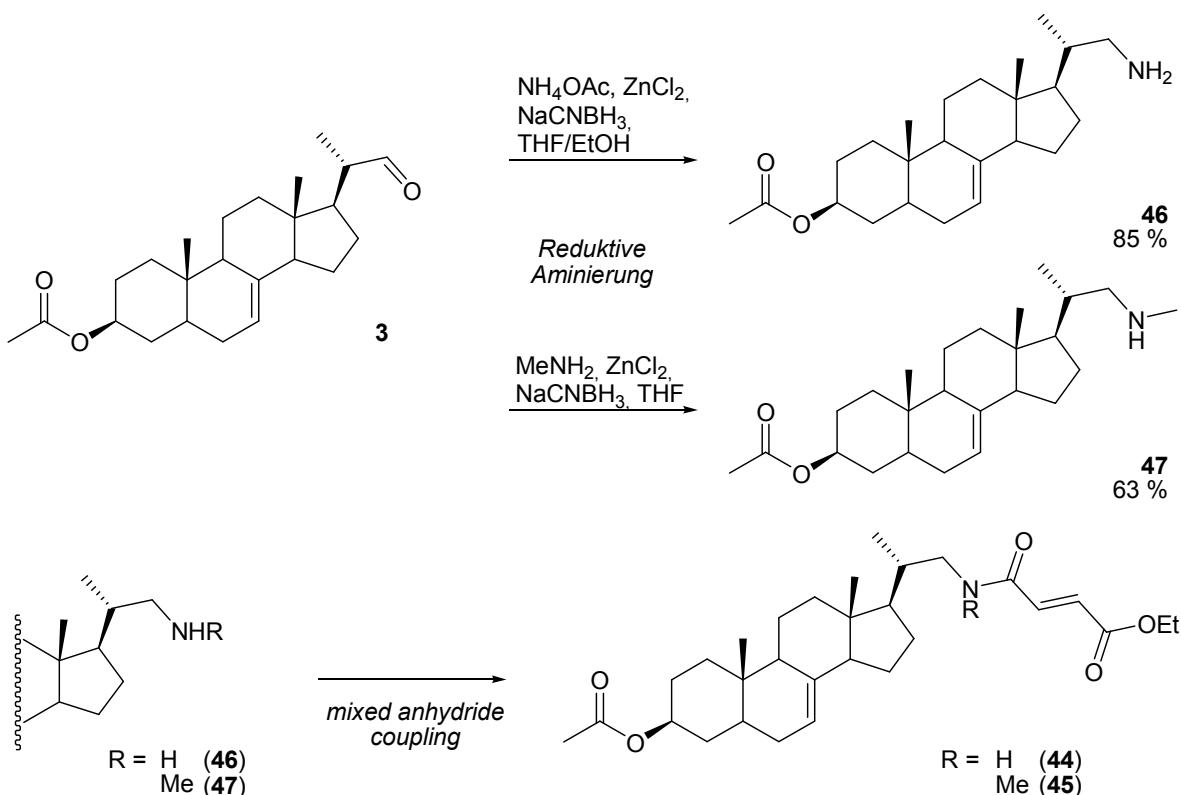


Abbildung 57: Fumarsäurederivate und Protonierung eines Amids

Die Synthese der Fumarsäurederivate **44** und **45** war ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Monoethylfumarat und den über eine reduktive Aminierung aus dem Aldehyd **3** darstellbarem primären Amin **46** bzw. dem bekannten sekundären Amin **47**⁸³ geplant. Die Amine sind in einer Variante der reduktiven Aminierung mit Zink-modifiziertem Cyanoborhydrid¹²² in guten Ausbeuten darstellbar (Abbildung 58). Das durch eine 2:1-Mischung aus Natriumcyanoborhydrid und Zinkchlorid zugängliche Reagenz ist ein selektives und vielseitiges Reduktionsmittel, das gleichzeitig die Kontrolle des pH-Werts unnötig macht.¹²² Zur Darstellung des primären Amins **46** wurde Ammoniumacetat als Ammoniakquelle verwendet, so dass in wasserfreiem Medium und ohne gasförmigen Ammoniak gearbeitet werden konnte. Für die anschließende Kupplung der Sterolamine mit Monoethylfumarat sollte die freie Carbonsäure als gemischtes Anhydrid aktiviert werden. Sowohl *N*-Methylpiperidin (NMP) als auch *N*-Methylmorpholin (NMM) reagieren mit dem jeweils eingesetzten Chloroformiat zu einem Acylammoniumchlorid. Das dadurch aktivierte Formiat kann von Carbonsäuren nukleophil angegriffen werden, so dass ein Anhydrid entsteht, das in einem weiteren Schritt unter Abspaltung von Kohlendioxid und einem Alkohol mit Aminen zu Amiden reagieren kann. Da die Kupplung nur in sehr schlechten Ausbeuten gelingt, wenn Benzylchloroformiat eingesetzt wird, wurde letzteres durch das sterisch weniger anspruchsvolle Ethylchloroformiat ersetzt. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte das sekundäre Amid **44** in einer deutlich besseren Ausbeute von 85 % dargestellt werden.



Reaktionsbedingungen	Ergebnis
Benzylchloroformiat (1 eq.), Monoethylfumarat (1 eq.), NMP (1 eq.), CH_2Cl_2	44: keine Reaktion
Benzylchloroformiat (2 eq.), Monoethylfumarat (2 eq.), NMP (2 eq.), CH_2Cl_2	44: 11 %
Benzylchloroformiat (2 eq.), Monoethylfumarat (2 eq.), NMM (2 eq.), CH_2Cl_2	44: 15 % 45: 17 %
Ethylchloroformiat (2 eq.), Monoethylfumarat (2 eq.), NMM (2 eq.), CH_2Cl_2	44: 85 % 45: 60 %

Abbildung 58: Synthese der Fumarsäurederivate **44** und **45**

Die Verknüpfung über eine Carbonsäureesterfunktionalität zum isomeren Amid **43** konnte mit Hilfe einer Acylierung des primären Alkohols **6** mit einem aktivierten Derivat des Fumarsäuremonoamids realisiert werden. Monoethylfumarat wurde hierzu unter den für die Derivate **44** und **45** erarbeiteten Reaktionsbedingungen mit Dimethylamin zum (*E*)-3-(Dimethylcarbamoyl)-acrylsäureethylester (**48**) umgesetzt. Der Ester wurde in einem zweiten Schritt alkalisch hydrolysiert und die freie Säure **49** mit Hilfe von Oxalylchlorid und DMF (*Vilsmeier-Haack-Reagenz*) unter

Standardbedingungen zum entsprechenden Säurechlorid **50** umgesetzt. Dieses konnte ohne weitere Aufreinigung in einer akzeptablen Ausbeute im Sinne der *Einhorn*-Variante der *Schotten-Baumann*-Reaktion mit dem Steroidalkohol **6** zum Fumarsäurederivat **43** umgesetzt werden (Abbildung 59).

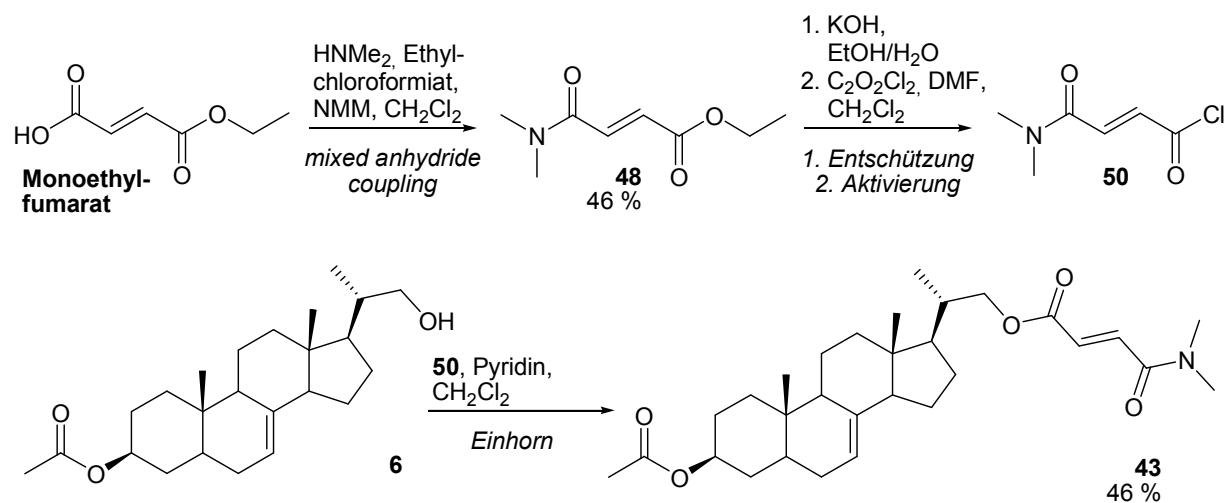


Abbildung 59: Synthese von *(E)*-(3*S*,20*S*)-20-(*N,N*-Dimethylamino-1,4-dioxobut-2-enylcarboxy-methyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**43**)

Eine weitere Möglichkeit, α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen in die Seitenkette des Sterols einzuführen, ist die Darstellung eines *Michael-Akzeptors* auf der Oxidationsstufe des Ketons. Prinzipiell sind hierfür zwei Methoden denkbar. Carbonsäurechloride können im Sinne einer *Wittig*-Reaktionen oder alternativ einer *Grignard*-Reaktion zu α,β -ungesättigten Ketonen umgesetzt werden. Das α,β -ungesättigte Keton **12** konnte *trans*-selektiv über eine *Wittig*-Reaktion des stabilisierten Ylids **A** mit Acetaldehyd in einer Ausbeute von 9 % dargestellt werden (Abbildung 60). Das Ylid wurde *in situ* aus dem etablierten Säurechlorid **11** und Methyltriphenylphosphoniumbromid unter Zugabe von 2 Äquivalenten ^7Li generiert.

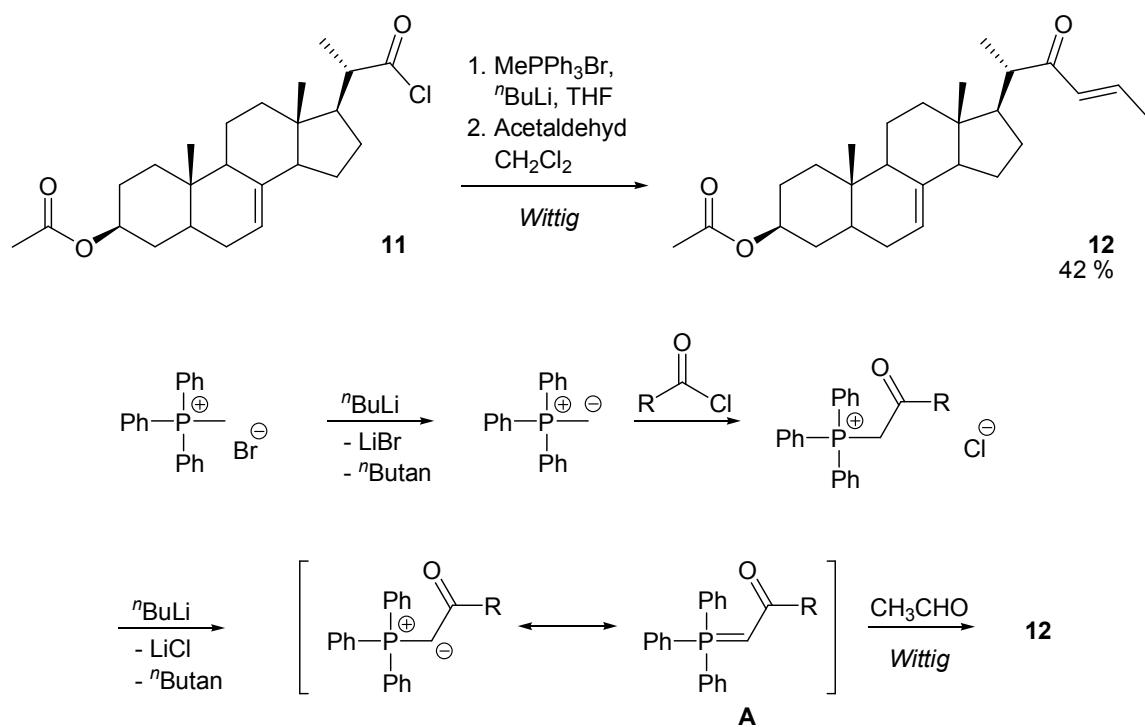


Abbildung 60: Synthese von (E) -((3S,20S)-3-Acetoxypregn-7-en-20-yl)-but-2-en-1-on (**12**) und Mechanismus der Reaktionsfolge

Die *Grignard*-Reaktion des Säurechlorids **11** mit Vinylmagnesiumbromid zum Vinylketon **13** gelang unter Standardbedingungen¹⁰³ nicht (Abbildung 61).

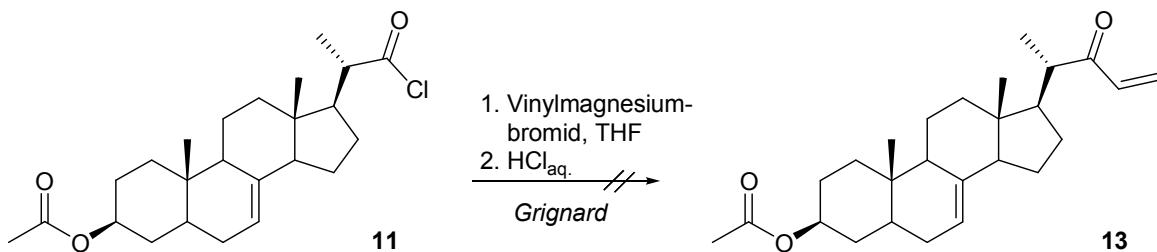


Abbildung 61: Versuch zur Synthese von (3S,20S)-20-(1-Oxoprop-2-en-1-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**13**) nach *Grignard*

Man kann hier durchaus die Reaktionszeit verlängern, allerdings ist eine Änderung des Lösungsmittels zur Erhöhung der Reaktionstemperatur oder die Zugabe eines Überschusses *Grignard*-Reagenz nicht sinnvoll. *Grignard*-Reaktionen sollten in koordinierenden Lösungsmitteln wie Diethylether oder THF durchgeführt werden. Die Zugabe eines Überschusses von Vinylmagnesiumbromid könnte zu einem zweiten Angriff an dem dadurch entstehenden Keton zum tertiären Alkohol oder eventuell

sogar zu Nebenreaktionen an der Acetylschutzgruppe führen. Da auch bei Reaktionszeiten von 72 h keine Reaktion zu beobachten war, wurde auf diese Strategie im Weiteren verzichtet und eine Alternative erarbeitet.

Eine alternative Syntheseroute zum gewünschten *Michael*-System **13** ging vom TBDMS-geschützten Derivat **51** (Kapitel 3.3) aus (Abbildung 62). Der Aldehyd **51** konnte in einer *Grignard*-Reaktion mit Vinylmagnesiumbromid in akzeptabler Ausbeute zum sekundären Alkohol **52** umgesetzt werden. Dadurch wird in der Seitenkette ein neues Chiralitätszentrum erhalten, das jedoch vernachlässigt werden kann, da es in der nachfolgenden Oxidation zum α,β -ungesättigten Keton **53** wieder zerstört wird. Die Oxidation kann in einer Variante der *Albright-Goldman*-Oxidation,^{123,124} in der Cyanurchlorid anstelle von Acetanhydrid eingesetzt wird, in guter Ausbeute erreicht werden. Diese milde Methode, primäre und sekundäre Alkohole in die korrespondierenden Aldehyde bzw. Ketone zu überführen, findet vor allem bei sterisch gehinderten Alkoholen Anwendung.¹²⁵

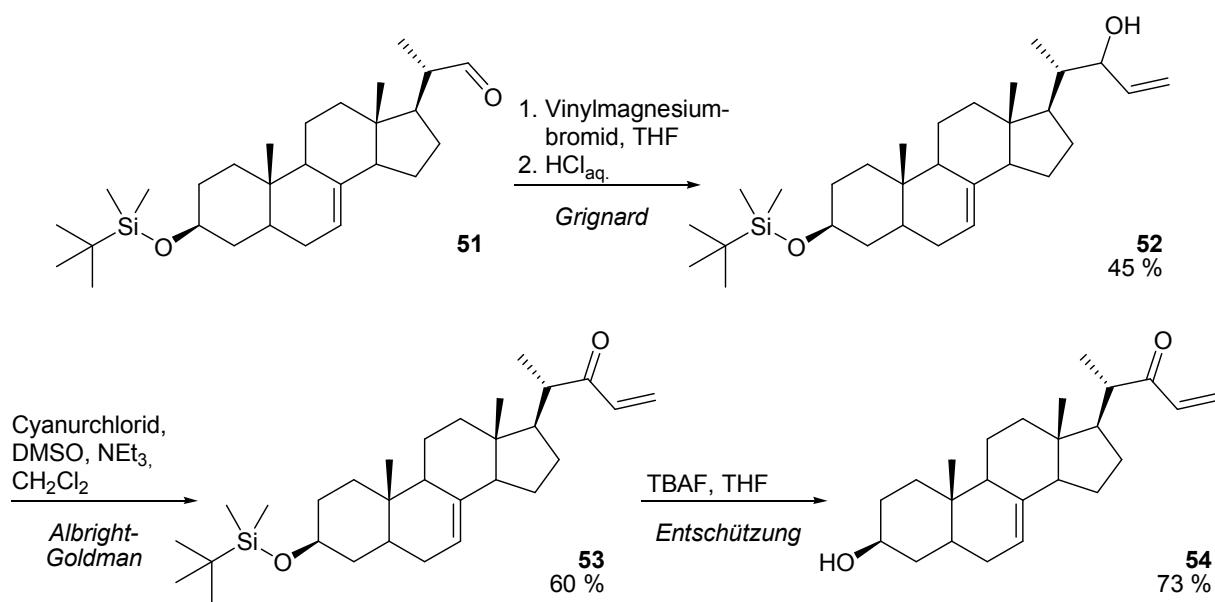


Abbildung 62: Synthese von (3S,20S)-20-(1-Oxoprop-2-en-1-yl)-pregn-7-en-3-ol (**54**)

Im Gegensatz zur Acetylschutzgruppe, die in lebenden Organismen metabolisiert werden kann,⁷⁴ sind TBDMS-geschützte Derivate nicht als *Prodrugs* der Inhibitoren zu verstehen. Die sterisch anspruchsvolle Silylgruppe sollte also in jedem Fall entfernt werden, auch um die Löslichkeit in den Systemen der biologischen Testung

zu erhöhen. Nach einer Standardvorschrift mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) konnte die Silylschutzgruppe hier in guten Ausbeuten selektiv entfernt werden.¹²⁶ Man erhält über diese Strategie also grundsätzlich Derivate mit freier Hydroxygruppe an C-3. Sollte man einen Vergleich mit acetylgeschützten Derivaten anstreben, müsste hier also in einem weiteren Schritt diese Schutzgruppe wieder eingeführt werden.

3.2.6 Synthese der Pyrrolderivate

Die bekannte Reaktivität bestimmter Hydroxymethylpyrrole gegenüber Glutathion und *N*-Acetylcystein⁷⁸ zeigte Möglichkeiten auf, vergleichbare Funktionalitäten für die Entwicklung potentiell kovalent bindender Inhibitoren zu nutzen. Geplant war im Rahmen dieser Arbeit die Darstellung zweier unterschiedlich in der Seitenkette verknüpfter Pyrrolderivate (Abbildung 63).

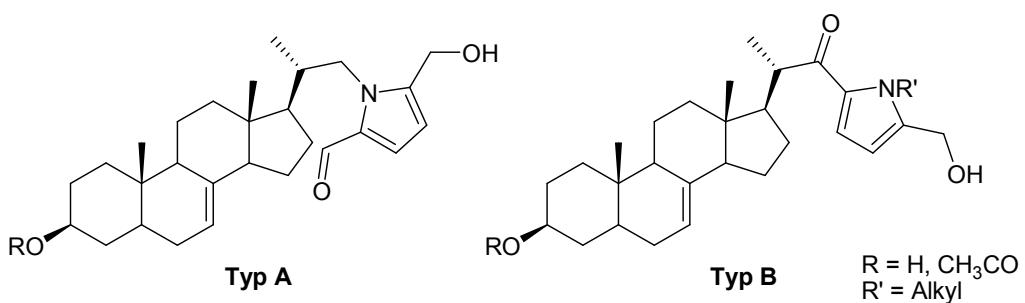


Abbildung 63: Mögliche Verknüpfungen eines Sterolgrundkörpers mit Hydroxymethylpyrrol-Bausteinen (Auswahl)

Die Verknüpfung zum Sterolderivat vom **Typ A** sollte durch *N*-Alkylierung von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol **16** erreicht werden. Der Pyrrolbaustein lässt sich in einer vierstufigen literaturbekannten Synthese ausgehend von 2-Formylpyrrol darstellen (Abbildung 64).¹²⁷ Dieser soll unter basischen Bedingungen, durch die Zugabe von vier Äquivalenten Kalium-*tert*-butylat (KO^tBu) zu einer Lösung eines Alkylbromids und des Pyrrolbausteins **16** in DMF, zu *N*-alkylierten Derivaten umgesetzt werden können.¹²⁸

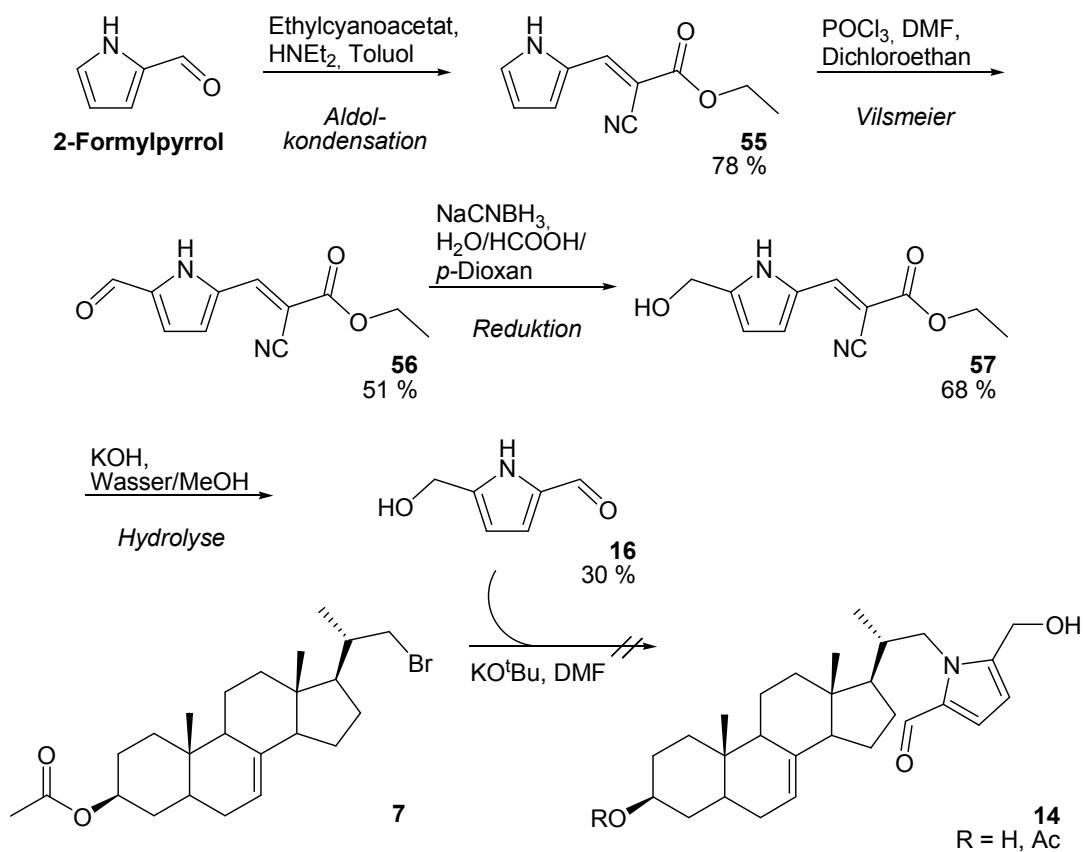


Abbildung 64: Synthese von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol **16**¹²⁶ und Versuch zur *N*-Alkylierung

Die Darstellung des dafür verwendeten (3S,20S)-20-Brommethylpregn-7-en-3-ylacetat (**7**) aus (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**) im Sinne einer Appel-Reaktion ist bereits bekannt,⁷⁶ konnte aber durch längere Reaktionszeiten die Ausbeute betreffend verbessert werden. Obwohl die *N*-Alkylierung von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol (**16**) literaturbekannt¹²⁷ ist, und auch in einem Testansatz mit dem sterisch weniger anspruchsvollen Propylbromid gelang, ist sie mit dem Alkylbromid **7** nicht durchführbar. Es wurde hierbei das Lösungsmittel, die Base, die Reaktionstemperatur sowie die Reaktionszeit variiert. Weitere Versuche, den Pyrrolbaustein unter analogen Bedingungen mit dem reaktiveren bekannten Alkyliodid **58**⁸³ umzusetzen, gelangen ebenfalls nicht. Dabei entstand nie das gewünschte Produkt **14**. Es konnten entweder die Edukte bzw. ein Alkylbromid mit freier Hydroxygruppe an der C-3-Position zurückgewonnen werden, oder es entstanden unlösliche, dunkelbraune, viskose Gemische. Interessanterweise lässt sich das Alkylbromid **7** unter den literaturbekannten Reaktionsbedingungen¹²⁷ mit dem kommerziell erhältlichem Pyrrol-2-carbaldehyd in akzeptablen Ausbeuten umsetzen (Abbildung 65). Allerdings entsteht hier ein Gemisch aus

acetylgeschütztem Steroid **59** und einem Produkt **60** mit freier Hydroxygruppe in C-3-Position.

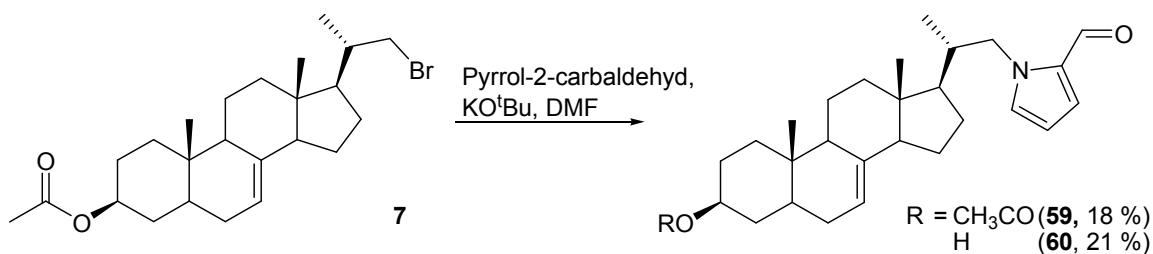


Abbildung 65: Umsetzung von (3S,20S)-20-Brommethyl-pregn-7-en-3-ylacetat (7) mit Pyrrol-2-carbaldehyd

Die Umsetzung von **7** mit der Zwischenstufe (*E*)-2-Cyano-3-(5-formyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-acrylsäureethylester **56** (Abbildung 64) gelang allerdings unter literaturbekannten Bedingungen¹²⁷ ebenfalls nicht. Allerdings konnte nach einigen Optimierungen die gewünschte Zwischenstufe **61** in einer *Mitsunobu*-Reaktion des primären Alkohols **6** mit dem Pyrrolbaustein **56** mit einer mäßigen Ausbeute dargestellt werden (Abbildung 66). Hier sollte nun die Reduktion des Aldehyds zum primären Alkohol der nächste Schritt sein. Jedoch kam es dabei je nach Wahl des Lösungsmittels, des Reduktionsmittels und der Reaktionszeit wahlweise zu keiner Reaktion oder zur Bildung von komplexen Produktgemischen. Aufgrund der Konsistenz und des Aussehens sollte man hier von der bei Verwendung reaktiver Pyrrolbaustenen nicht unwahrscheinlichen Bildung von Polymeren ausgehen.

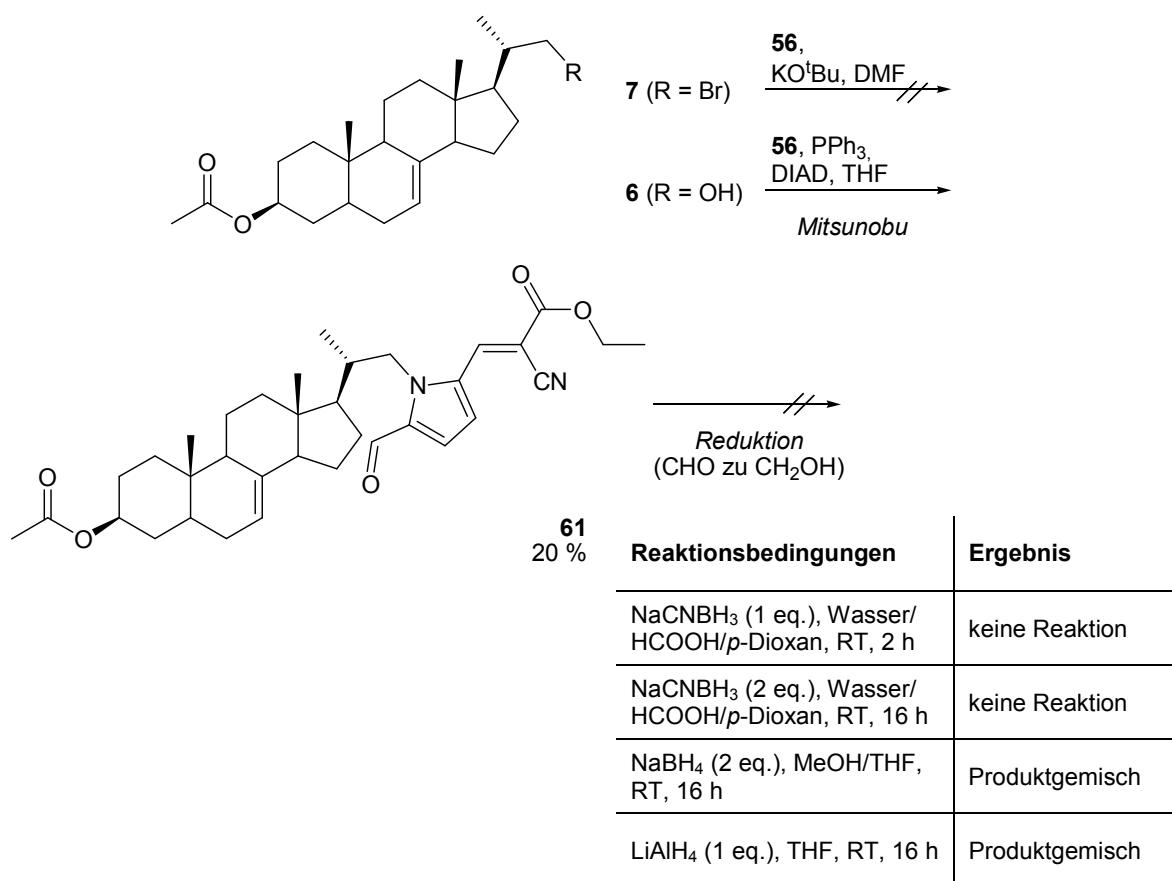


Abbildung 66: Darstellung von **61** und Versuche zur weiteren Umsetzung

Als weitere Möglichkeit verblieb noch die *N*-Alkylierung des Pyrrolbausteins **16** (Abbildung 64) in THF unter Phasentransfer-Katalyse, indem [18]-Krone-6 als Katalysator und Kalium-*tert*-butylat als Base eingesetzt wurden.¹²⁹ Bei Wahl dieser Reaktionsbedingungen konnte das gewünschte Produkt **14** mit gleichzeitiger Hydrolyse der Estergruppe in C-3-Position dann doch noch, wenn auch mit einer schlechten Ausbeute, dargestellt werden (Abbildung 67).

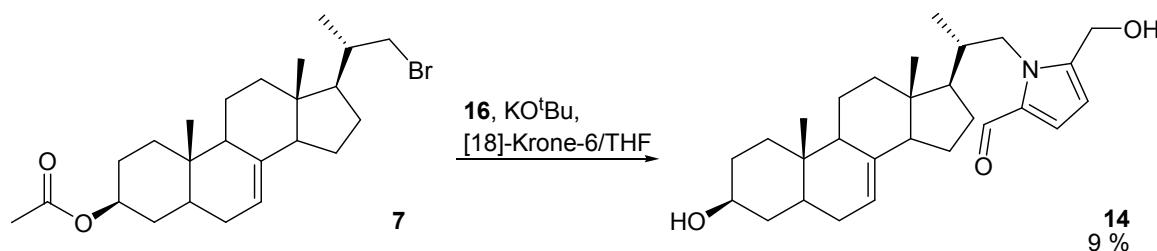


Abbildung 67: Synthese von (3*S*,20*S*)-20-[1-(2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrolyl)-methyl]-*pregn*-7-en-3-ol (**14**)

Eine alternative Verknüpfung des Sterolgrundgerüsts mit Hydroxymethylpyrrolen zu Sterolderivaten vom **Typ B** (Abbildung 63) war ebenfalls geplant. Es sollte in einem ersten Schritt das Säurechlorid **11** mit dem literaturbekannten 2-Tributylstannyln-N-methylpyrrol-5-carboxaldehyd (**17**)¹³⁰ in einer *Stille*-Kupplung umgesetzt werden. Ein weiterer Schritt sah die selektive Reduktion der Aldehydfunktion der Pyrrolgruppe vor (Abbildung 68). Das Stannan kann in einer literaturbekannten Synthese aus *N*-Methylpyrrol-2-carboxaldehyd dargestellt werden.¹³¹ Dafür wurde in einem ersten Schritt durch die Zugabe äquimolarer Mengen ⁷Butyllithium zu einer gekühlten Lösung von *N*-Methylpiperazin das benötigte Lithium-*N*-methylpiperazid (LNMP) *in situ* dargestellt. LNMP kann genutzt werden um die Aldehydfunktion als α -Aminoalkoxid zu schützen. Durch Zugabe der Stickstoffbase TMEDA und eines weiteren Äquivalents ⁷Butyllithium erfolgt Ringlithiierung an C-5, da die α -Aminoalkoxidfunktion für den Aldehyd als Schutzgruppe vor dem metallorganischen Reagenz fungiert. Der lithiierte Aromat kann nun durch Reaktion mit Tributylstannylchlorid und nachfolgende Hydrolyse des α -Aminoalkoxids zum in 5-Position stannylierten 2-Carboxaldehyd **17** umgesetzt werden.

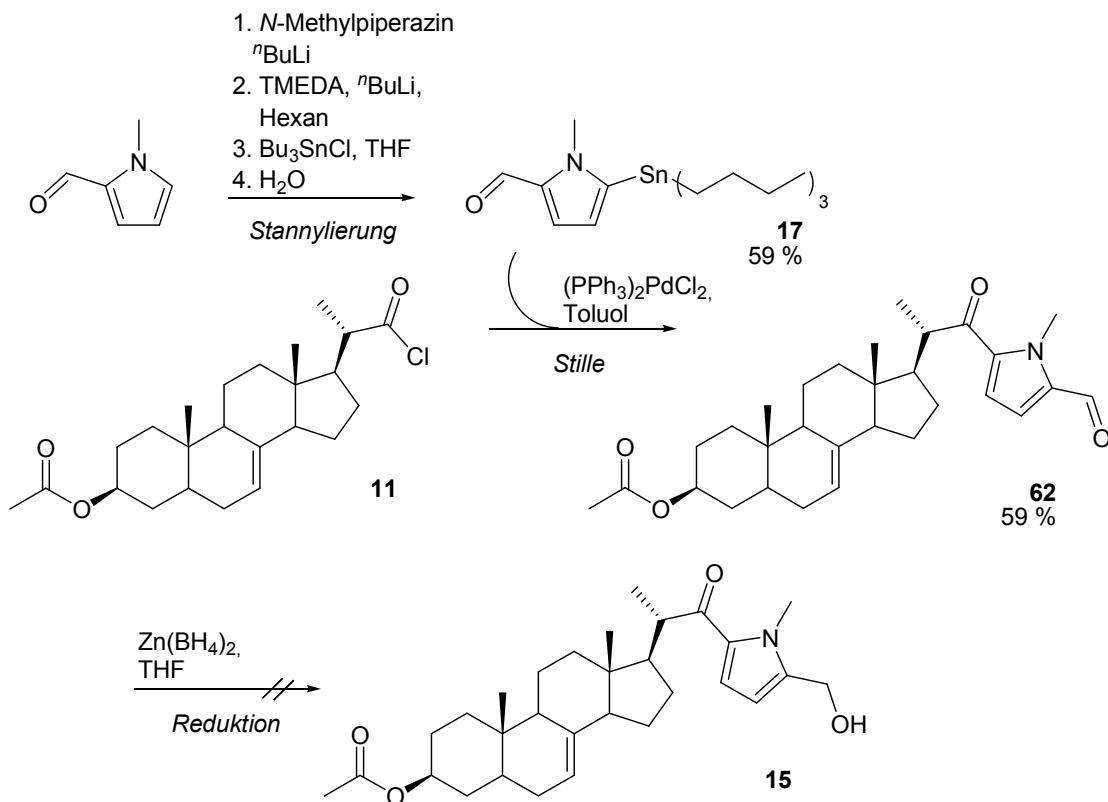


Abbildung 68: Versuch zur Synthese eines Hydroxymethylpyrrols vom **Typ B** (vgl. Abbildung 64)

Die *Stille*-Kupplung mit dem Säurechlorid **11** zum Acylpyrrol **62** verläuft unter Literaturbedingungen¹²⁹ in akzeptablen Ausbeuten. Die nachfolgende Reduktion der Aldehydfunktion neben der Ketogruppe unter milden Bedingungen gelang hingegen nicht. Hierbei sollte unter chelatisierenden Bedingungen mit Hilfe des aus Zinkchlorid und Natriumborhydrid *in situ* generierten Zinkborhydrids unter Ausnutzung von Lösungsmittel-Effekten die etwas unreaktivere Ketofunktion verbleiben während der Aldehyd chemoselektiv reduziert werden sollte.¹³² Es war aber nicht möglich, aus dem tiefbraunen viskosen Rohprodukt das Edukt zurückzugewinnen oder ein Hauptprodukt zu isolieren.

Leider gelang die Reduktion der Aldehydfunktion des Stannans **17** vor der *Stille*-Reaktion ebenfalls nicht, so dass das gewünschte Produkt hier nicht erhalten werden konnte. Dabei wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen und auch Reduktionsmittel gewählt. Es kam hierbei entweder zu keiner Reaktion oder aber es war kein Hauptprodukt isolierbar.

Grundsätzlich muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass das Arbeiten mit den verschiedenen Pyrrol-Derivaten von einigen Schwierigkeiten gekennzeichnet war, wie beispielsweise der großen Neigung zur Polymerisation und auch einer sehr geringen Stabilität der verschiedenen Derivate in Lösung. So gibt es durchaus einige Alternativen, die vielversprechende Ansätze zur Darstellung der gewünschten Produkte aufzeigen, die jedoch nicht mehr angewendet wurden. Aufgrund der geringen Stabilität der Pyrrol-Derivate ist davon auszugehen, dass keine biologische Testung mit verlässlichen Ergebnissen möglich ist. Innerhalb weniger Stunden verfärbt sich eine in Chloroform, Methanol oder DMSO gelöste Probe der erhaltenen Derivate von gelb zu dunkelbraun mit schwarzen Schwebeteilchen.

Daher wurde darauf verzichtet, die Pyrrol-Derivate weiterzuverfolgen und stattdessen andere vielversprechende Stoffklassen bearbeitet, die als potentielle Inhibitoren in biologischen Systemen mit verlässlichen Ergebnissen getestet werden können.

3.2.7 Synthese alternativer Heteroaromaten

Da die dargestellten Pyrrolderivate in biologischen Testsystemen aufgrund ihrer zu geringen Stabilität nicht zu testen sind, wurde nach einem alternativen Weg gesucht, das interessante Konzept dennoch anwenden zu können. Dafür sollte der Pyrrolbaustein modifiziert werden, um die chemischen Eigenschaften zu verändern. Die Reaktivität gegenüber Thiolgruppen sollte erhalten bleiben, allerdings die Stabilität in Lösung erhöht werden. Es wurden außerdem Thiophen- und Furanbausteine dargestellt, die ähnliche Strukturmerkmale aufweisen. Diese unterschiedlichen heteroaromatischen Verbindungen wurden zunächst nicht in einem biologischen Testsystem untersucht, sondern in wässrigem Milieu mit *N*-Acetylcystein versetzt. Dieser Vortest kann erste Anhaltspunkte geben, ob die verschiedenen Derivate unter physiologischen Bedingungen mit Thiolresten von Cystein reagieren könnten. Dafür wurden die von *Severin et. al*⁷⁷ publizierten Bedingungen gewählt, die bei den ebenfalls dort veröffentlichten Hydroxymethylpyrrolen erfolgreich die Reaktivität gegenüber Acetylcystein anzeigen konnten. Die Reaktion lässt sich bei Wahl geeigneter Fließmittel chromatographisch (Dünnschichtchromatographie) effektiv verfolgen.

In einer ersten Versuchsreihe wurden Thiophen- und Furanderivate mit einfachen Alkylketten in 5-Position und einer Hydroxymethylgruppe in 2-Position unter literaturbekannten Bedingungen dargestellt (Abbildung 69).¹³³ Hier wurde jeweils die Aldehydfunktion ebenfalls mit Hilfe von LNMP in Form eines α -Aminoalkoxids geschützt und der Aromat anschließend mit Hilfe eines Äquivalents ⁷Butyllithium in 5-Position lithiiert und direkt alkyliert. Dies gelang bei Verwendung von Alkyliodiden in akzeptablen bis guten Ausbeuten. In einem weiteren Schritt konnten die alkylierten Heteroaromaten in Ausbeuten von 23 % bzw. 75 % mit Natriumborhydrid zu den entsprechenden Hydroxymethylheteroaromaten reduziert werden. Die Derivate dieses Verbindungstyps zeigten unter physiologischen Bedingungen keine Umsetzung mit *N*-Acetylcystein.

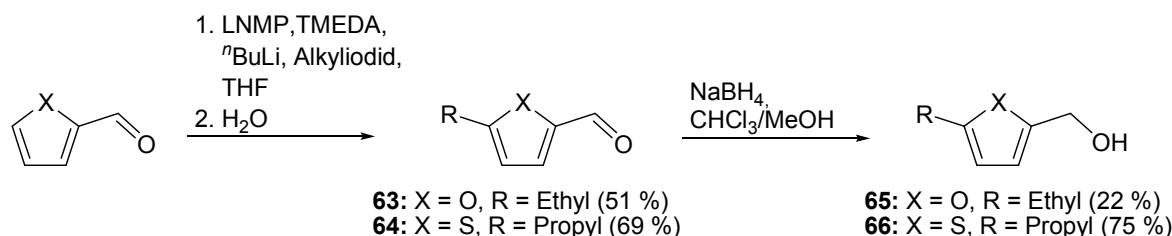


Abbildung 69: Synthese der 5-Alkyl-2-hydroxymethylheteroaromatnen

In einem Ansatz zur Darstellung ringacylierter Hydroxymethylheteroaromatnen wurde 2-Furaldehyd bzw. 2-Thiophencarbaldehyd nach einer literaturbekannten Vorschrift ähnlich der bei den Pyrrolen beschriebenen Methode in 5-Position stannyliert (Abbildung 70).^{130,134} Die erhaltenen Stannane **66** und **67** konnten im Sinne einer *Stille*-Reaktion^{135,136} mit Säurechloriden umgesetzt werden, wenn auch in mäßigen Ausbeuten. Die chemoselektive Reduktion der Aldehydfunktion neben der Ketofunktion von **69** und **70** mit Zinkborhydrid zu den gewünschten Hydroxymethylheteroaromatnen **74** und **75** gelang allerdings nicht. In einem alternativen Ansatz zur Darstellung der gewünschten 5-Hydroxymethylpyrrole wurde 2-Thiophencarbaldehyd zuerst zum 2-Hydroxymethylthiophen (**71**) reduziert, allerdings gelang die nachfolgende Stannylierung unter vergleichbaren Bedingungen nicht. Die Stannane **66** und **67** mit Aldehydfunktion in 2-Position konnten aber in einem weiteren Syntheseschritt in akzeptablen Ausbeuten mit Natriumborhydrid zu den analogen stannylierten Hydroxymethylderivaten **72** und **73** reduziert werden. Diese Hydroxymethylheteroaromatnen konnten ebenfalls mit mäßigen Ausbeuten im Sinne einer *Stille*-Reaktion^{134,135} mit Säurechloriden umgesetzt werden. Diese Heteroaromatnen zeigen unter physiologischen Bedingungen allerdings ebenfalls keine Reaktion mit Acetylcystein.

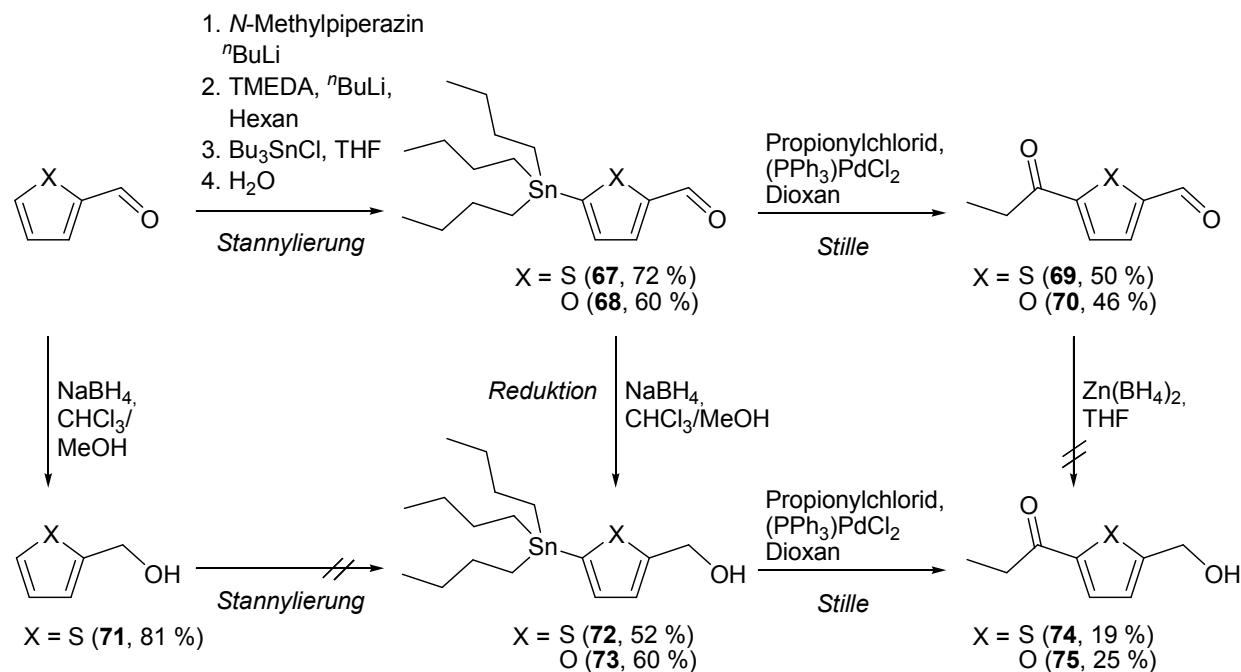


Abbildung 70: Synthese alternativer Hydroxymethylheteroaromaten

Als letzte Variation dieser heteroaromatischen Bausteine wurde der bereits erwähnte Pyrrolbaustein **16** (Kapitel 3.2.6, Abbildung 64) modifiziert. Hier sollte die Aldehydfunktion durch eine Hydrazongruppe ersetzt werden (Abbildung 71). Diese ändert den Charakter des Aromaten deutlich, da dadurch eine Gruppe mit starkem elektronenschiebendem und mesomerem Effekt eingeführt wird. Dadurch könnte ein vermutlich in einem $\text{S}_{\text{N}}1$ -artigen Mechanismus entstehendes Carbokation deutlich besser stabilisiert werden und so den Ablauf der Reaktion begünstigen (Abbildung 71). Weiterhin ergäbe sich dadurch die Möglichkeit, den Pyrrolbaustein über eine Hydrazongruppe an den Sterolgrundkörper zu binden. Um den gewünschten Baustein zu erhalten, wurde das bereits bekannte, über eine vierstufige Synthese darstellbare, Pyrrol **16** mit *N,N*-Dimethylhydrazin in Ethanol umgesetzt.

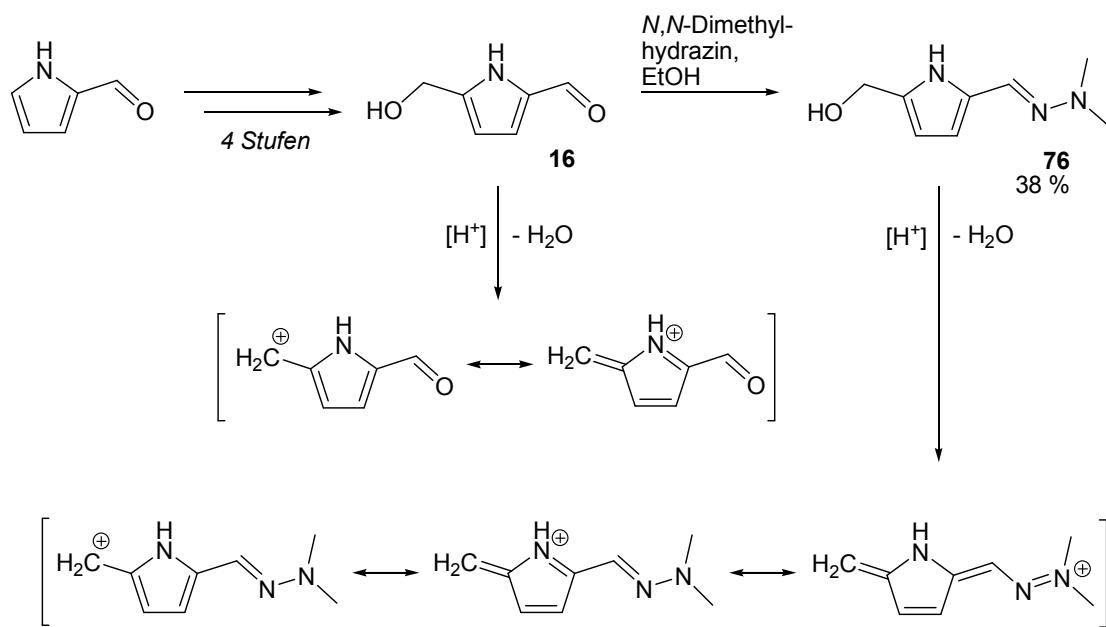


Abbildung 71: Synthese von 5-(Dimethylhydrazonomethyl)-2-hydroxymethyl-pyrrol (**76**) und Mesomerie-Stabilisierung der Carbokationen

Das gewünschte Hydrazon **76** lässt sich in akzeptablen Ausbeuten darstellen, ist jedoch sowohl in methanolischer als auch wässriger Lösung nicht stabil und somit ungeeignet zur Testung sowohl unter physiologischen Bedingungen mit Acetylcystein als auch in den für diese Arbeit genutzten biologischen Testsystemen (Kapitel 6.3).

Da alle hier als Modellsubstanzen dargestellten alternativen Heteroaromaten unter physiologischen Bedingungen keinerlei Aktivität gegenüber *N*-Acetylcystein oder aber eine zu geringe Stabilität in Lösung zeigten, wurde keiner dieser Bausteine in die Seitenkette der Sterole eingeführt.

3.3 Synthese TBDMS-geschützter Sterolderivate

Für verschiedene Synthesestrategien ist die Acetylschutzgruppe keine geeignete Wahl. So sollten verschiedene Seitenkettenester auch mit freier Hydroxyfunktion an C-3 des Sterols synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität im Vergleich zum acetylgeschützten Derivat getestet werden. Eine selektive Entschützung der

acetylierten Derivate ist hierbei schlecht durchführbar, da gleichzeitig die Esterfunktion der Seitenkette angegriffen wird. Generell ist die Synthese von Derivaten mit freier Hydroxylgruppe an C-3 und basenlabiler Seitenkette aus acetylgeschützten Derivaten nicht sinnvoll. Des Weiteren kann es zu Nebenreaktionen an der Acetylgruppe kommen wie beispielsweise die Umsetzung mit *Grignard*-Reagenzien oder der Angriff von *Corey-Chaykovsky*-Reagenzien an Estergruppen.¹³⁷ Daher sollte eine weitere Schutzgruppe etabliert werden, die möglichst unempfindlich gegenüber verschiedenen Bedingungen ist, keine Carbonylfunktion enthält und sich selektiv entfernen lässt. Die Wahl fiel hierbei auf die *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe (TBDMS-Schutzgruppe), die seit ihrer Einführung 1972¹³⁸ eine der populärsten Silylschutzgruppen ist. Sie ist unter 0 °C gegenüber starken nichtprotischen Basen, *Grignard*-Reagenzien, Enolaten und metallierten Sulfonen stabil.¹³⁹ Weiterhin ist die Gruppe milden Basen gegenüber stabil sowie in der Abwesenheit von *Lewis*-Säuren sogar gegenüber komplexen Hydriden, außer DIBALH. Sie zeigt sich auch inert bei Hydrierungsreaktionen.¹⁴⁰ Die Schutzgruppe lässt sich unter sauren Bedingungen entfernen, aber das Standardprotokoll zur Spaltung von TBDMS-Ethern ist die selektive Entschützung mit Fluoridionen. Außerdem können bei Wahl der richtigen Reaktionsbedingungen TBDMS-Ether in relativ guten Ausbeuten dargestellt werden und die NMR-Spektren sind sehr einfach auswertbar.

Es bieten sich prinzipiell verschiedene Synthesestufen an, um diese Schutzgruppe einzuführen. Eine mögliche Synthesestrategie startet mit der Umsetzung von Ergosterol zum entsprechenden literaturbekannten TBDMS-Ether¹⁴¹, die unter den hier gezeigten Reaktionsbedingungen in akzeptabler Ausbeute gelang (Abbildung 72).

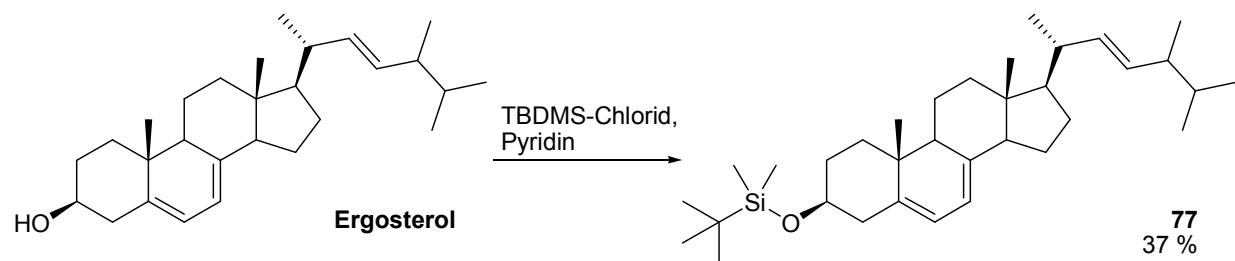


Abbildung 72: Synthese von Ergosteryl-*tert*-butyldimethylsilylether (77)

Die nachfolgenden Reaktionen, die selektive Hydrierung der Δ^5 -Doppelbindung und die Ozonolyse der Δ^{22} -Doppelbindung, sollten analog zur Synthese des acetylgeschützen Aldehyds **3** durchgeführt werden (Kapitel 3.1). Es ist bekannt, dass TBDMS-Ether unter diversen Hydrierbedingungen stabil sind und auch keine Nebenreaktionen während der Einleitung von Ozon verursachen.¹⁴⁴ So könnte auch die Ozonolyse der Seitenkette erneut unter anderen Bedingungen betrachtet und eventuell die Ausbeute gesteigert werden. Während sich die selektive Hydrierung mit Raney-Nickel W-2 tatsächlich unproblematisch unter den etablierten Bedingungen in sehr guten Ausbeuten übertragen ließ, verlief die Ozonolyse mit schlechten Ausbeuten (Abbildung 73). Auch Variationen der Reaktionszeit oder Menge des eingeleiteten Ozons ließen keine Ausbeuten über die durch Optimierung erreichten 11 % zu. Von Vorteil ist in diesem Fall aber, dass wenig Nebenprodukte entstehen und das Edukt größtenteils wieder zurückgewonnen werden kann (68 %).

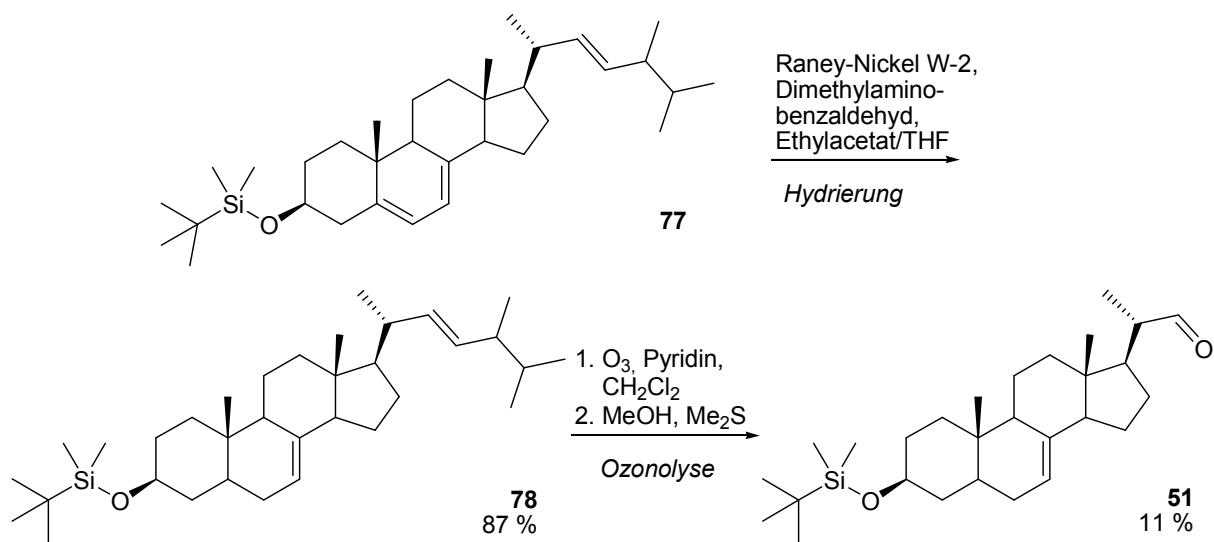


Abbildung 73: Synthese von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-yl-tert-butyldimethylsilylether (**51**)

Ein alternativer Zugang zu **51** ergibt sich durch Abspaltung der Acetylgruppe nach der Hydrierung zu **2** oder nach der Ozonolyse zu (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (**3**) (Kapitel 3.1) und die nachfolgende Einführung der TBDMS-Schutzgruppe. Da die selektive Hydrierung der Δ^5 -Doppelbindung auch mit TBDMSgeschützten Derivaten problemlos gelingt, würde sich hier nur der Austausch der Schutzgruppen im Anschluss an die Ozonolyse anbieten. Diese verläuft zwar auch mit Acetylschutzgruppe nicht besser als mit 35 % Ausbeute, aber damit trotzdem

deutlich besser als in der analogen Syntheseroute mit dem TBDMS-geschützten Sterol. Beide vorhergehenden Reaktionen, Acetylierung und Hydrierung (Kapitel 3.1), lassen sich in großem Maßstab mit sehr guten Ausbeuten durchführen, und die Produkte können durch Kristallisation gereinigt werden. Da auch Reaktionsbedingungen zur quantitativen Entschützung der Hydroxylfunktion bereits etabliert sind⁷³, musste nur die Umsetzung von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ol **79** mit TBDMS-Chlorid zum TBDMS-Ether **51** neu erarbeitet werden (Abbildung 74).

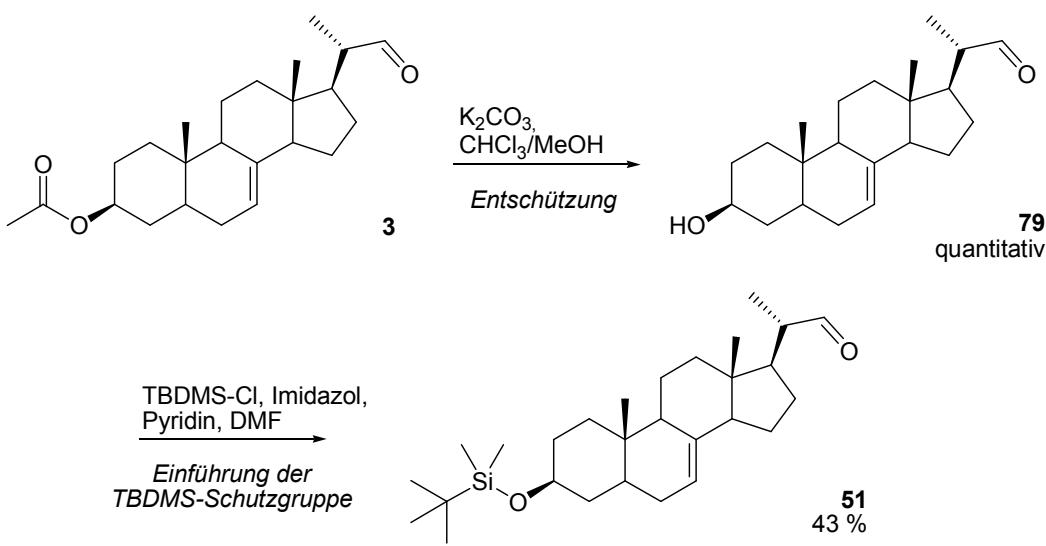


Abbildung 74: Synthese von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ol (**79**) und (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-yl-tert-butyldimethylsilylether (**51**)

Die Entschützung des Aldehyds **3** durch alkalische Esterspaltung lässt sich durch DC-Kontrolle verfolgen und damit auch die annähernd quantitative Entschützung feststellen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Produkts sowohl in Dichlormethan- bzw. Chloroformgemischen mit Methanol als auch in Gemischen von Hexan und Ethylacetat oder Pentan mit Diethylether ist es nicht möglich die Verbindung säulenchromatographisch zu reinigen. In mehreren Versuchen ist hierbei das Produkt so gut wie vollständig auf dem Säulenmaterial verblieben. Auch Versuche zur Kristallisation scheiterten aufgrund der mangelnden Löslichkeit. Allerdings kann das Rohprodukt beim nächsten Syntheseschritt problemlos eingesetzt werden. Zur Bestimmung der Ausbeuten der nächsten Stufe wird davon ausgegangen, dass reines (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ol (**79**) eingesetzt wurde. Im Lauf der alkalischen Hydrolyse der Acetylenschutzgruppe kann es hier durch

die Deprotonierung des aziden Protons an C-20 allerdings zur Isomerisierung kommen, wenn die Reaktionszeit über eine Stunde hinausgeht.

Es gibt diverse Methoden zur Synthese von *tert*-Butyldimethylsilylethern. Zur Umsetzung von (3*S*,20*S*)-20-Formylpregn-7-en-3-ol (**79**) zum TBDMS-geschützten Aldehyd **51** wurden verschiedene Bedingungen bekannter Standard-protokolle^{118,142,143,144} angewendet und diese miteinander verbunden. Letztendlich gelang die Darstellung des gewünschten Silylethers in akzeptabler Ausbeute durch die Reaktion des freien Alkohols mit einem Überschuss von TBDMS-Chlorid unter Zugabe der Stickstoffbasen Imidazol und Pyridin in DMF.

Bei Betrachtung der Ausbeuten ist die Strategie des Austausches der Schutzgruppe nach der selektiven Hydrierung und Ozonolyse günstiger. Allerdings kann es in diesem Fall zu einer Isomerisierung an C-20 kommen, die je nach Reaktionszeit zu beobachten ist. Um Stereoisomere sicher zu vermeiden, ist die direkte Synthese TBDMS-geschützter Derivate empfehlenswert.

Durch die Etablierung dieser Schutzgruppe war es im Lauf dieser Arbeit möglich, das gewünschte *Michael*-System **54** (Kapitel 3.2.5, Abbildung 62) darzustellen.

3.4 Synthese potentieller Inhibitoren der C-22-Desaturase

3.4.1 Synthese der Azole

Da Azol-Antimykotika wie Ketoconazol, Itraconazol und Fluconazol nachweisbar neben der C-14-Demethylase auch die C-22-Desaturase inhibieren, sollten in die Seitenkette des bekannten Sterolgrundkörpers Triazol- bzw. Imidazolgruppen eingeführt werden (Kapitel 2.2, Abbildung 36). Das bekannte Alkylbromid **7** kann in Anwesenheit von Tetraethylammoniumiodid mit 1,2,4-Triazol im Basischen¹⁴⁵ in guten Ausbeuten zum 1-substituierten Triazol **19** umgesetzt werden. Als Basen werden Kaliumcarbonat und Kaliumhydroxid eingesetzt. So kommt es hier schon zur Hydrolyse der Acetylschutzgruppe an C-3, allerdings nur in sehr geringem Ausmaß

(4 %). Die Acetylschutzgruppe kann in einem weiteren Schritt unter Standardbedingungen mit einem Überschuss Kaliumcarbonat in einem Gemisch von Chloroform und Methanol in nahezu quantitativer Ausbeute entfernt werden (Abbildung 75).

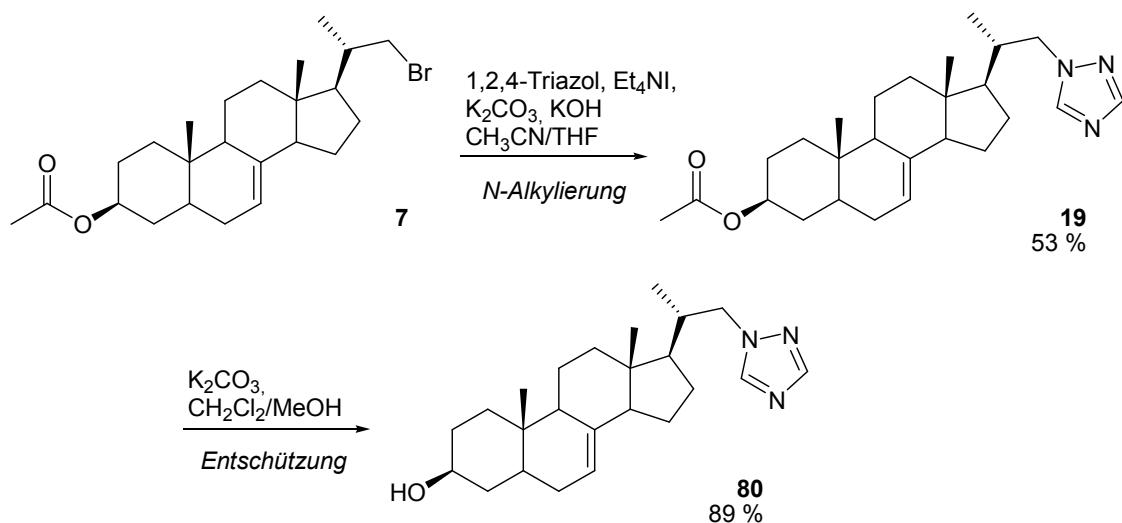


Abbildung 75: Synthese von (3S,20S)-20-(1,2,4-Triazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ol (**80**)

Das Alkylbromid **7** lässt sich in einem ähnlichen Protokoll¹⁴⁶ auch zum gewünschten *N*-Alkylimidazol **20** umsetzen, wenn auch in schlechteren Ausbeuten (Abbildung 76). Unter den hierbei benötigten Bedingungen wird die Acetylschutzgruppe zu einem sehr großen Teil bereits alkalisch verseift, so dass sie nicht in einem weiteren Schritt entfernt werden muss.

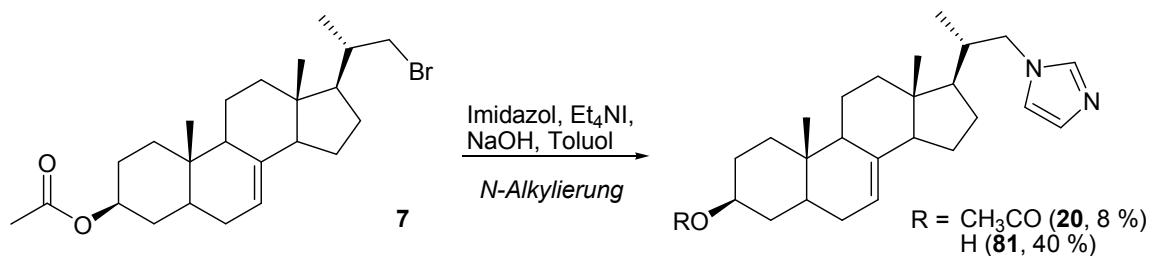


Abbildung 76: Synthese von (3S,20S)-20-(Imidazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**20**) und (3S,20S)-20-(Imidazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ol (**81**)

Deutlich schwieriger gestaltete sich die Synthese des gewünschten Imidazol-2-yllderivats **18** im Sinne einer *Radziszewski-Synthese*¹⁴⁷ (Abbildung 77). Dabei können

Imidazolderivative durch die Kondensation einer α -Dicarbonylverbindung mit einem Aldehyd und zwei Äquivalenten Ammoniak dargestellt werden.¹²⁴ Wahrscheinlich reagiert Ammoniak in einem ersten Schritt mit der α -Dicarbonylverbindung zu einem α -Diimin, das anschließend mit dem Aldehyd zum Imidazol kondensieren kann.

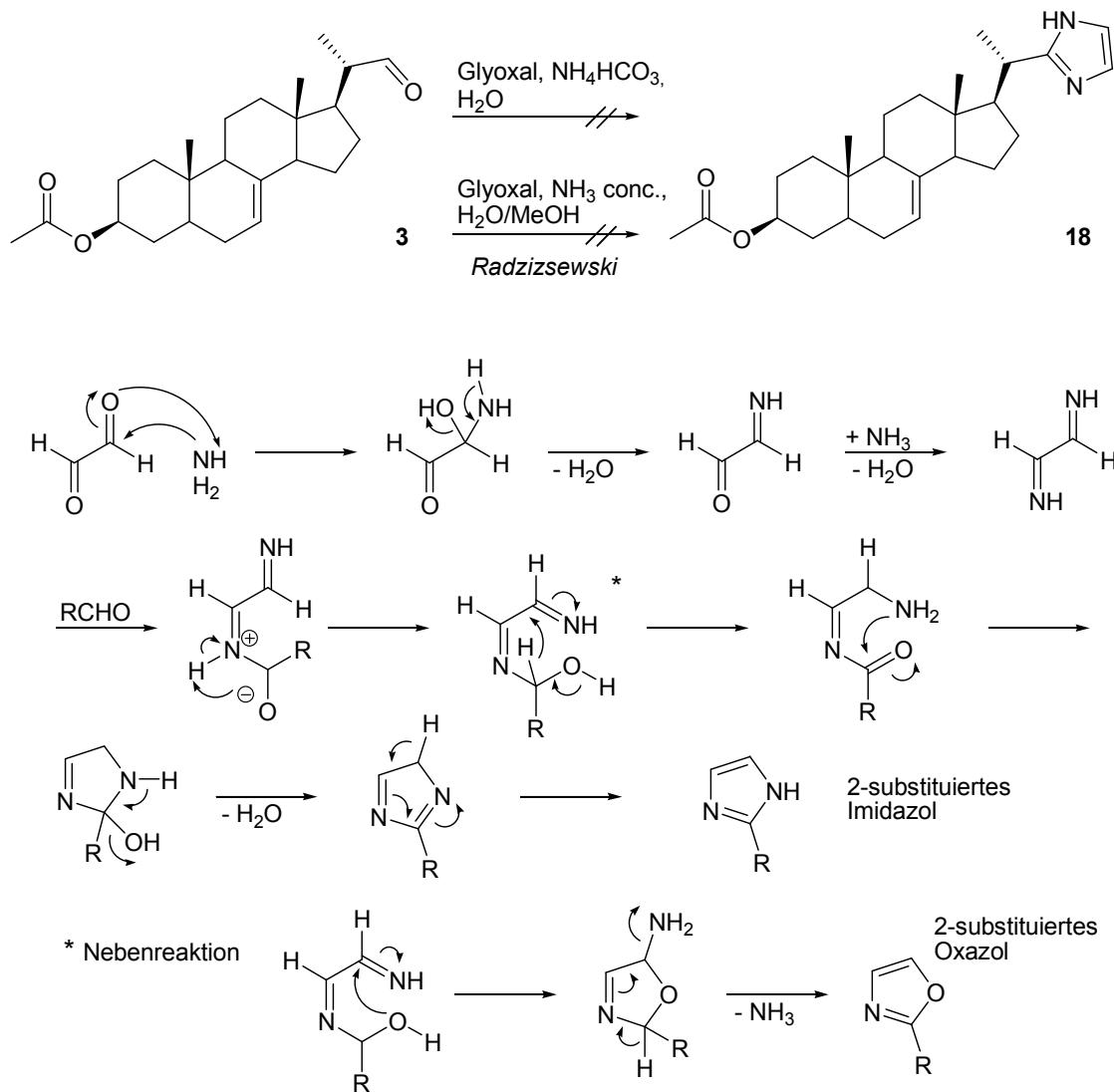


Abbildung 77: Versuche zur Synthese von (3S,20S)-20-(Imidazol-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**18**) und postulierter Reaktionsmechanismus¹²⁴

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Aldehyd **3** mit Ammoniumhydrogencarbonat als Ammoniakquelle und Glyoxal als α -Dicarbonylverbindung im Wässrigen umgesetzt.⁸⁵ Hier konnte trotz Variation von stöchiometrischen Verhältnissen, Lösungsmitteln und Reaktionszeit sowie -temperatur ausschließlich Edukt zurückgewonnen werden. Alternativ wurde der Aldehyd mit Glyoxal und

konzentrierter Ammoniaklösung umgesetzt in einer klassischen *Radziszewski*-Synthese.¹⁴⁸ Auch hier konnte weder unter Literaturbedingungen noch unter modifizierten Bedingungen das gewünschte Produkt dargestellt werden. Es ist allerdings bekannt, dass diese Reaktion generell schlechte Ausbeuten liefert und anfällig für Nebenreaktionen wie die reverse Aldol-Kondensation oder die Bildung von Oxazolen ist.¹²⁴ Das Hauptproblem speziell bei diesen versuchten Synthesen eines Imidazols war aber sicherlich die schlechte Löslichkeit des Aldehyds **3** in den benötigten protischen Lösungsmitteln.

Eine mögliche Alternative ist die Synthese eines 2-substituierten Imidazolins, das in einem weiteren Schritt zum Imidazol dehydriert werden könnte.¹⁴⁹ Das hierfür benötigte Imidazolin **76** kann theoretisch entweder direkt aus dem Aldehyd **3** (Syntheseroute **A**) oder aus dem Carbonsäurechlorid **11** (Syntheseroute **B**) dargestellt werden (Abbildung 78).

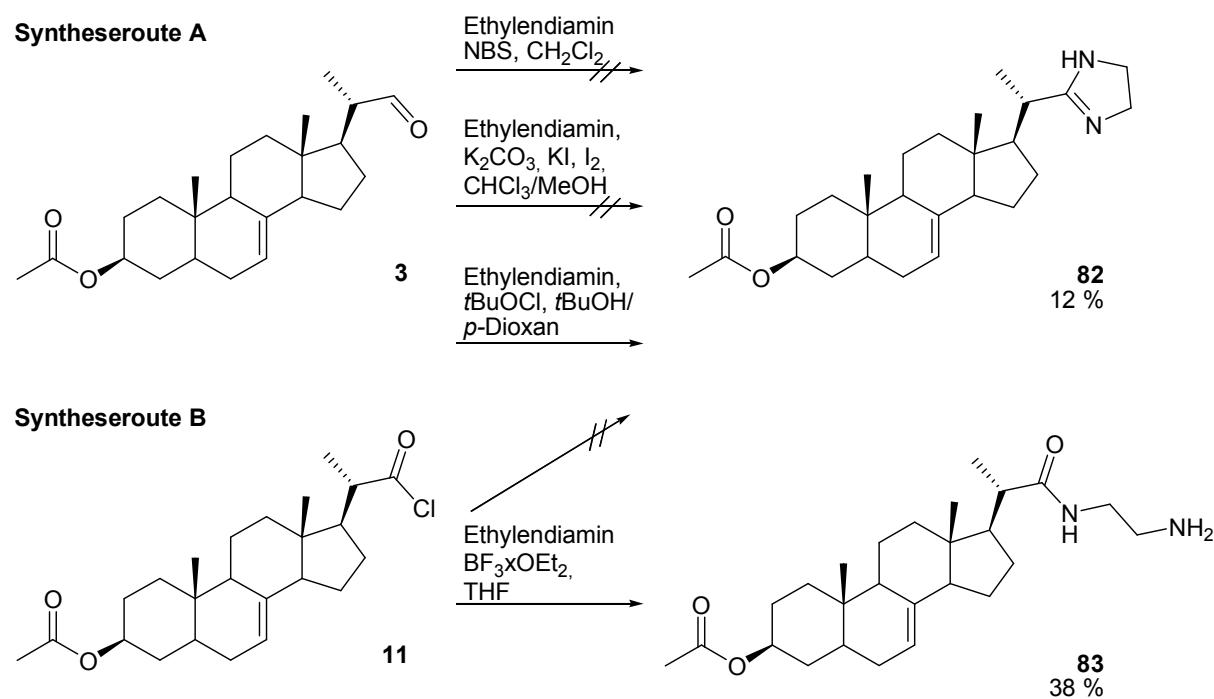


Abbildung 78: Synthese von (3S,20S)-20-(Imidazolin-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**82**) und (3S,20S)-20-(2-Aminoethylaminocarbonyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**83**)

Unter den bei Syntheseroute **B** gezeigten Bedingungen¹⁵⁰ entstand jedoch ausschließlich das offenkettige Amid **83** in akzeptabler Ausbeute. Die Umsetzung des *in situ* generierten Säurechlorids **11** mit Ethyldiamin zu einem Amid ist also

erfolgreich, und folglich die Zyklisierung der problematische Schritt. Es konnte auch durch weitere Zugabe von Bortrifluorid-Diethylether-Komplex oder verlängerte Reaktionszeiten keine Zyklisierung erreicht werden. Das Ersetzen der *Lewis*-Säure durch Titan(IV)-chlorid, Aluminium(III)-chlorid oder Zinn(IV)-chlorid führt ebenfalls zu keiner Zyklisierung des offenkettigen Amids.

Syntheseroute **A** sah die Umsetzung des Aldehyds **3** mit Ethylendiamin zu einem 2-substituierten Imidazolin vor. In einem ersten Versuch sollte die direkte Kondensation von **3** mit Ethylendiamin zu einem Imidazolidin ohne Katalysator stattfinden. Bei Behandlung des Imidazolidins mit *N*-Bromsuccinimid sollte daraufhin ein Haloamin entstehen, das unter Eliminierung von HBr zu einem Imidazoliniumsalz reagiert (Abbildung 79).¹⁵¹

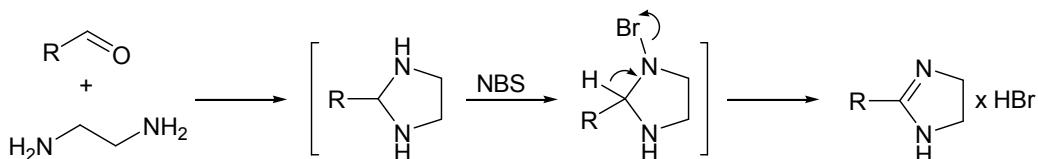


Abbildung 79: Darstellung von Imidazoliniumsalzen

Durch alkalische Aufarbeitung könnte daraus das Imidazolin freigesetzt werden. Da hier ausschließlich Edukt zurückgewonnen werden konnte, sollte der Aldehyd bei höheren Temperaturen und längeren Reaktionszeiten direkt mit Ethylendiamin umgesetzt werden. Die Zugabe von Iod als Oxidationsmittel in der Anwesenheit von Kaliumiodid und Kaliumcarbonat als Base sollte das kondensierte Produkt mild zum entsprechenden Imidazolin oxidieren.¹⁵² Da auch hier nur Edukt zurückgewonnen werden konnte, wurde **3** nach einer weiteren Methode zur oxidativen Umsetzung von Aldehyden mit Ethylendiamin und *tert*-Butylhypochlorit¹⁵³ erfolgreich zu dem gewünschten 2-Imidazolin **82** umgesetzt, wenn auch in schlechter Ausbeute. Das dafür benötigte Oxidationsmittel *tert*-Butylhypochlorit kann nach einer bekannten Vorschrift dargestellt werden.¹⁵⁴ Das Imidazolin **82** konnte mit Kaliumpermanganat auf Kieselgel¹⁵⁵ in guter Ausbeute zum entsprechenden Imidazol **18** oxidiert werden (Abbildung 80).

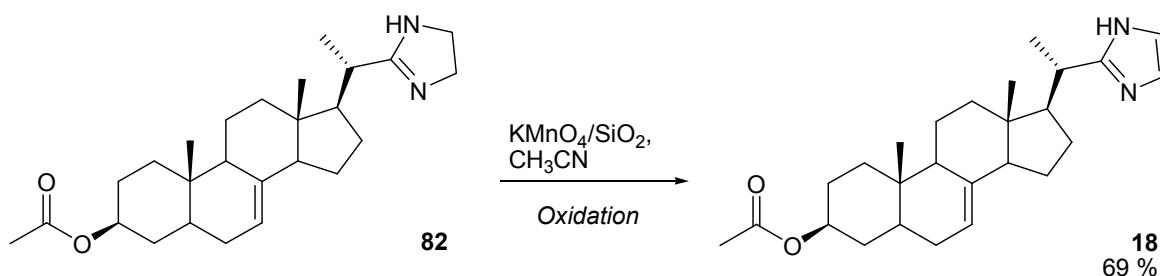


Abbildung 80: Synthese von (3S,20S)-20-(Imidazol-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**18**)

3.4.2 Synthese der Hydroxamsäurederivate

Hydroxamsäuregruppen sollten als metall-chelatisierende, und damit möglicherweise CYP-Enzyme hemmende, Funktionalitäten in die Seitenkette des Sterolgrundkörpers integriert werden (Kapitel 2.1). Dabei sollte nicht nur die freie Hydroxamsäure als neuartige Funktion in die Sterolseitenkette eingeführt werden, sondern auch O-alkylierte Derivate dargestellt werden (Kapitel 2, Abbildung 37), so dass die Sterolseitenkette möglichst in ihrer vollen Größe imitiert wird.

Die Carbonsäure **8** konnte einer bekannten Strategie folgend¹⁵⁶ mit Hilfe von DCC und N-Hydroxysuccinimid (NHS) zu einem reaktiven Succinatester umgesetzt werden, der nach Entfernen des entstehenden Dicyclohexylharnstoffs (DCU) mit Hydroxylamin-Hydrochlorid in akzeptabler Ausbeute zur freien Hydroxamsäure **21** umgesetzt werden konnte (Abbildung 81). Als Hilfsbase zur Freisetzung des Hydroxylamins wurde Natriumcarbonat eingesetzt.

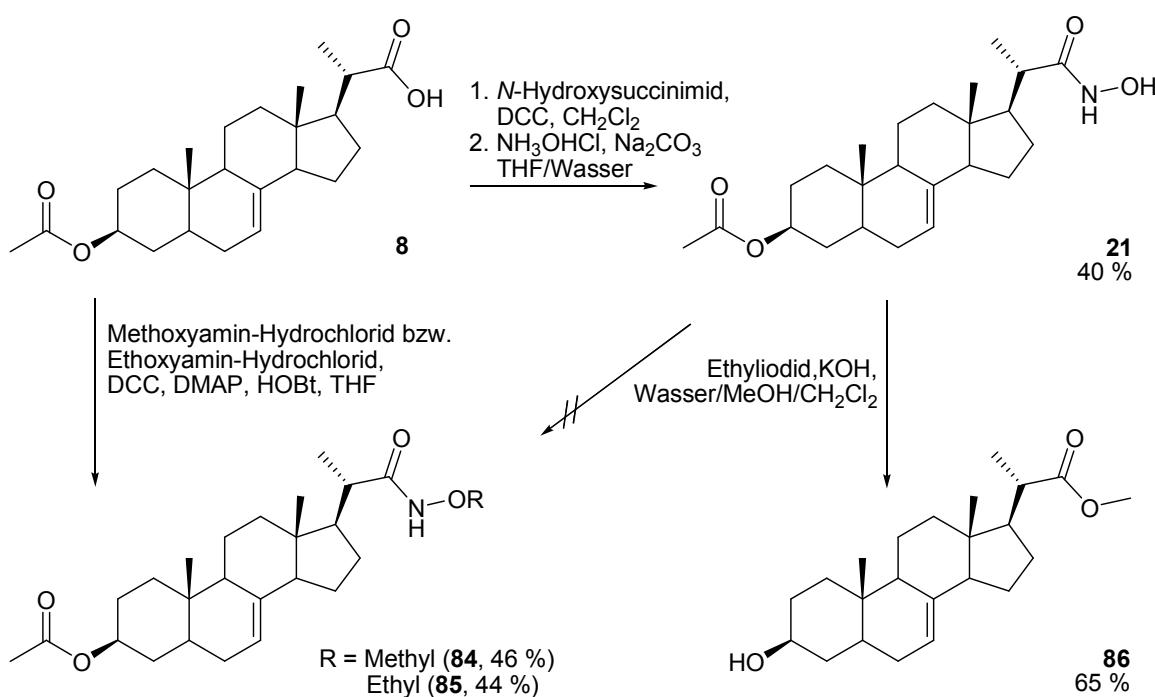


Abbildung 81: Synthese von (3S,20S)-20-(Hydroxycarbamoyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**21**) und den O-alkylierten Derivaten **84** und **85**

Theoretisch sollte die freie Hydroxamsäuregruppe nachträglich O-alkyliert werden können. Die literaturbekannten Bedingungen,¹⁵⁷ die eine Reaktion von Hydroxamsäuren mit Alkyliodiden im Alkalischen in einem Lösungsmittelgemisch aus Wasser, Methanol und Dichlormethan beschreiben, führten jedoch zu einem Methylester **86**, der vermutlich in einer Substitutionsreaktion mit dem zum Methanolat deprotonierten Lösungsmittel Methanol entsteht. Da die Reaktion im Alkalischen stattfindet wird gleichzeitig die Acetyschutzgruppe hydrolysiert.

Der Methylester **86** konnte mit Hilfe mehrerer analytischer Techniken sicher identifiziert werden. So konnte in einem EI-Massenspektrum sowie in Form eines hochauflösten EI-Massenspektrums die Masse (m/z) sowie typische Fragmentierungen wie beispielsweise $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ und $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ eindeutig nachgewiesen werden. Im ^1H -NMR-Spektrum zeigte sich ein Singulett, das bei Integration des Signals drei Protonen entsprach. Diese Methylgruppe konnte über ein CH-COSY-Spektrum eindeutig einer Kopplung zum deutlichen Carbonyl-C-Signal des zugehörigen ^{13}C -NMR-Spektrums zugeordnet werden. In einer

elementaranalytischen Untersuchung konnte kein Stickstoff im entstandenen Produkt nachgewiesen werden.

Wird Methanol als Lösungsmittel durch Acetonitril oder ein Gemisch aus THF und Wasser ersetzt, kommt es zu keiner Reaktion. O-Alkylierte Hydroxamate konnten allerdings auch direkt aus der Carbonsäure **7** in akzeptablen bis guten Ausbeuten dargestellt werden. Mit Hilfe von DCC, DMAP und HOBr wurde die Carbonsäure als Aktivester aktiviert, der beispielsweise mit Methoxyamin-Hydrochlorid zu der O-methylierten Hydroxamsäure **85** umgesetzt werden konnte. In einer analogen Umsetzung mit Ethoxyamin-Hydrochlorid konnte das analoge Ethylderivat **84** dargestellt werden.

3.5 Synthese potentieller Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase

Die Δ^{24} -Reduktase (24,25-Reduktase, Lanosterol-Reduktase, Desmosterol-Reduktase) katalysiert die Sättigung der Δ^{24} -Doppelbindung in der Cholesterolbiosynthese in tierischen Zellen, sowie bei grünen Algen und höheren Pflanzen. Prinzipiell kann das Enzym alle Δ^{24} -Intermediate der Biosynthese in die gesättigten Analoga überführen, Zymosterol ist allerdings das bevorzugte Edukt. Die Δ^{24} -Reduktase verknüpft dadurch beide Äste des Post-Squalen-Abschnitts der Cholesterol-Biosynthese miteinander (Kandutsch-Russell-Pathway und Bloch-Pathway, Kapitel 1.2.5, Abbildung 19). Mutationen dieses Enzyms sind mit der Desmosterolose assoziiert, einer Stoffwechselkrankheit, die in einer Akkumulation von Desmosterol ihre Ursache hat.¹⁵⁸ Das kodierende Gen DHCR24 ist ebenfalls in von der Alzheimer-Krankheit betroffenen Hirnregionen weniger stark exprimiert, so dass ein Zusammenhang zwischen DHCR24-Genexpression und Alzheimer-Risiko zu bestehen scheint.¹⁵⁹ Ebenso auffällig ist eine Überexpression in Krebszellen der Nebenniere oder der Prostata, wo dementsprechend ebenfalls ein Zusammenhang nahe liegt.¹⁶⁰ Inhibitoren dieses Enzyms könnten also als molekulare Werkzeuge von großer Bedeutung sein, um zu einem besseren Verständnis dieser verschiedenen Erkrankungen zu gelangen.

Die von *Giera*⁷⁴ aufgestellten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bezüglich der Inhibition von C-5-Desaturase und Δ^{24} -Reduktase beziehen sich ausschließlich auf eine Gruppe von in die Seitenkette des Pregn-7-en-grundkörpers integrierten Carbonsäureamiden (Kapitel 2.1, Abbildung 28).⁷⁴ Die Amide (3S,20S)-20-Carbamoylpregn-7-en-3 β -yl-acetat (**MG29a**) und (3S,20S)-20-N-Methylcarbamoylpregn-7-en-3 β -yl-acetat (**MG30a**) sowie deren desacetylierte Analoga wirken als Δ^{24} -Reduktase-Inhibitoren. Die *N*-Ethyl- und *N*-Propylderivate hemmen neben der Δ^{24} -Reduktase auch die C-5-Desaturase. Bei Alkylierung des Amidstickstoffs mit längeren bzw. sterisch anspruchsvoller Gruppen wird ausschließlich die C-5-Desaturase inhibiert. Bei einer weiteren Alkylierung des Amidstickstoffs zu tertiären Amiden verlieren die Derivate ihre inhibitorische Aktivität.

Um die strukturellen Anforderungen an Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase genauer zu untersuchen bieten sich mehrere Strukturvariationen in der Seitenkette an, wie beispielsweise die Position der Carbonylgruppe oder der Austausch der Amidfunktion durch eine Esterfunktionalität. Verschiedene Sterolderivate mit potentiell gegenüber Thiolen reaktiven Gruppen sind in diesem Zusammenhang ebenfalls interessant, da sie Carbonylgruppen mit kleineren Alkylketten tragen wie beispielsweise die Gruppe der Thioester (Kapitel 3.2.2) oder die einfachen α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen (Kapitel 3.2.5).

Als potentielle Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase waren verschiedene Ester und inverse Amide mit unterschiedlicher Verknüpfung zum Sterolgrundgerüst geplant (Abbildung 82).

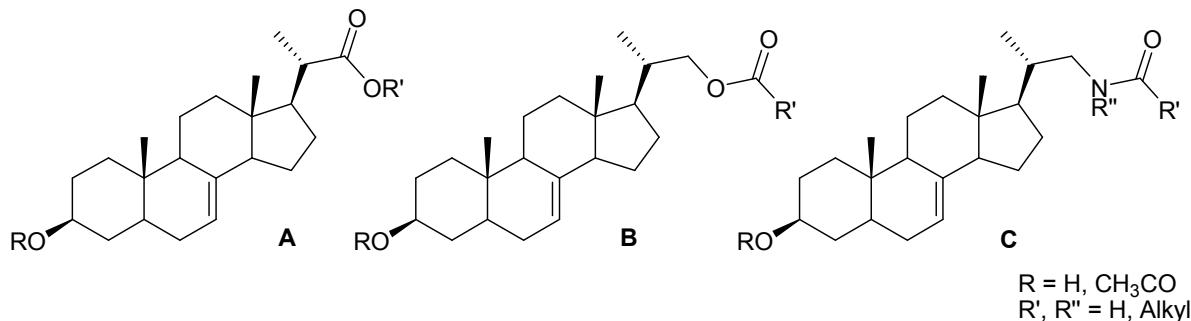


Abbildung 82: Strukturen der geplanten potentiellen Δ^{24} -Reduktase-Inhibitoren

Die Ester des Verbindungstyps **B** mit einfachen Alkylketten können in guten Ausbeuten über ein Standardprotokoll durch die Umsetzung des primären Alkohols **6** mit Säurechloriden unter Zugabe eines Überschusses Triethylamin als Base und HCl-Scavenger in sehr guten Ausbeuten dargestellt werden (Abbildung 83).

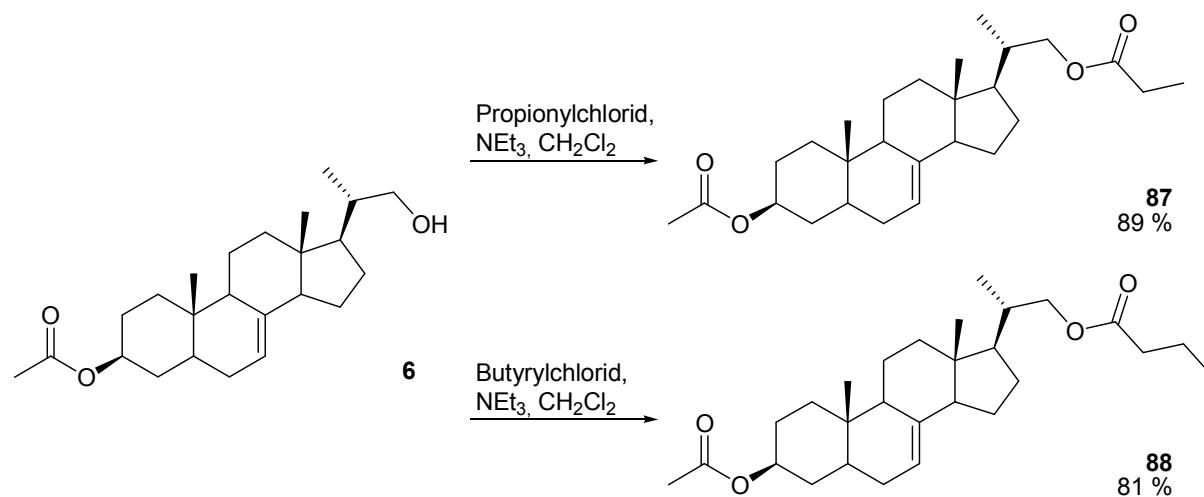


Abbildung 83: Synthese der Ester **87** und **88**

Der Methylester **86** vom Typ **A** war schon früher als Nebenprodukt angefallen (Kapitel 3.4.2, Abbildung 81). Durch die Umsetzung des Carbonsäurechlorids **11** mit ungesättigten Alkoholen können Esterderivate mit einer Doppelbindung in der Seitenkette in mäßigen Ausbeuten dargestellt werden (Abbildung 84). Die Umsetzung in einer *Steglich*-Veresterung hingegen gibt den Ester **89** in einer deutlich besseren Ausbeute von 47 %.

Die zusätzliche Doppelbindung in der Seitenkette könnte möglicherweise den inhibitorischen Effekt der Derivate erhöhen, da Derivate, die dem Substrat der Enzyme ähnlicher sind häufig fester und selektiver an das Target gebunden werden.²⁴ Durch die Synthese dieser Ester gelangt außerdem die Carbonylfunktion an eine andere Position innerhalb des Moleküls als bei den inversen Estern **87** und **88** (Abbildung 83).

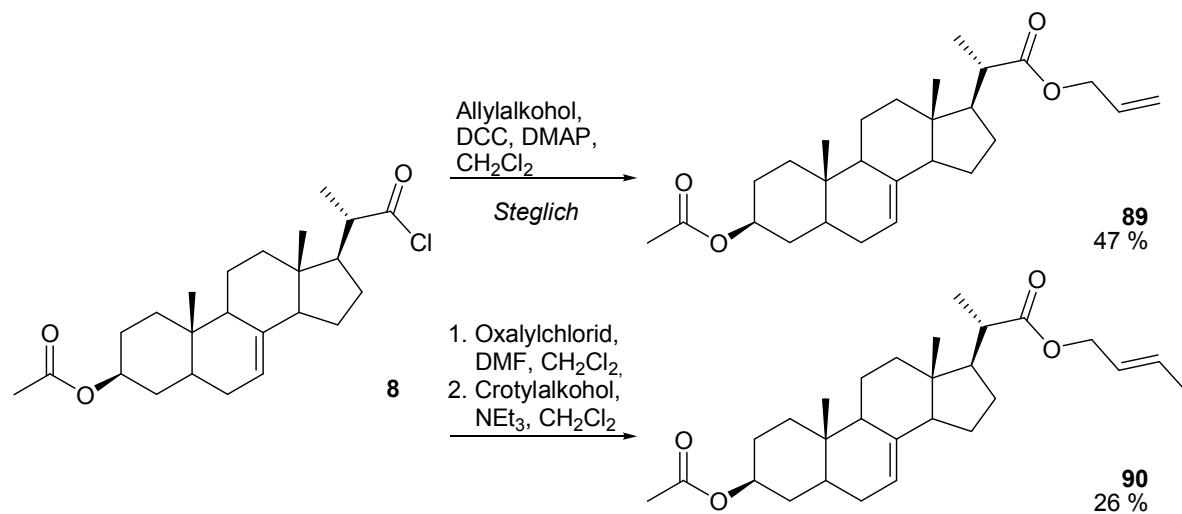


Abbildung 84: Synthese der Ester **89** und **90**

Das primäre Amin **46** (Kapitel 3.2.5) konnte mit verschiedenen Carbonsäurechloriden zu den gewünschten Amiden des Verbindungstyps **C** umgesetzt werden. Dies gelang unter den in Abbildung 82 gezeigten Bedingungen in Ausbeuten zwischen 45 % und 59 %.

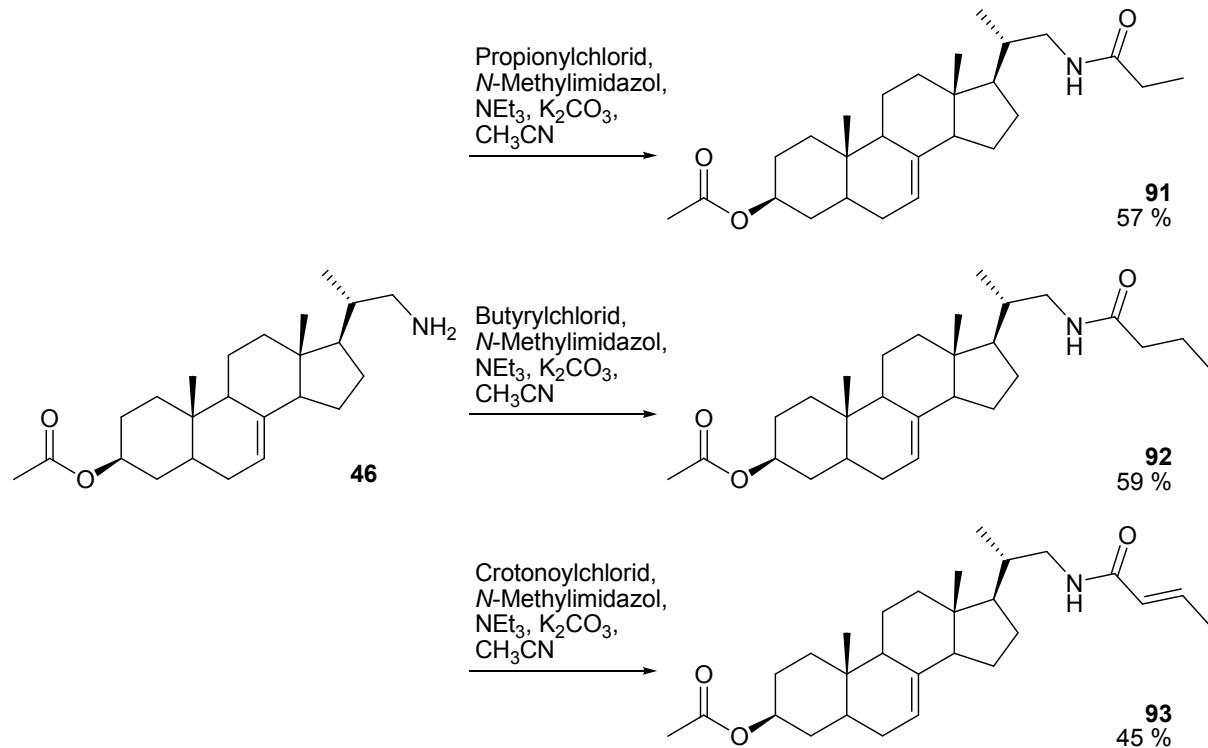


Abbildung 85: Synthese der sekundären Amide des Verbindungstyps **C**

Kaliumcarbonat und Triethylamin wurden als preiswerte Basen eingesetzt, die den freiwerdenden Chlorwasserstoff entfernen, während *N*-Methylimidazol ebenfalls als *Scavenger* dient aber gleichzeitig Carbonsäurederivate durch die Bildung reaktiver *N*-Acylimidazoliumderivate effektiv aktivieren kann.¹⁰⁴ Die analoge Umsetzung des bekannten sekundären Amins **41**⁷³ zu den tertiären Amiden **94** und **95** gelang in guten bis sehr guten Ausbeuten (Abbildung 86).

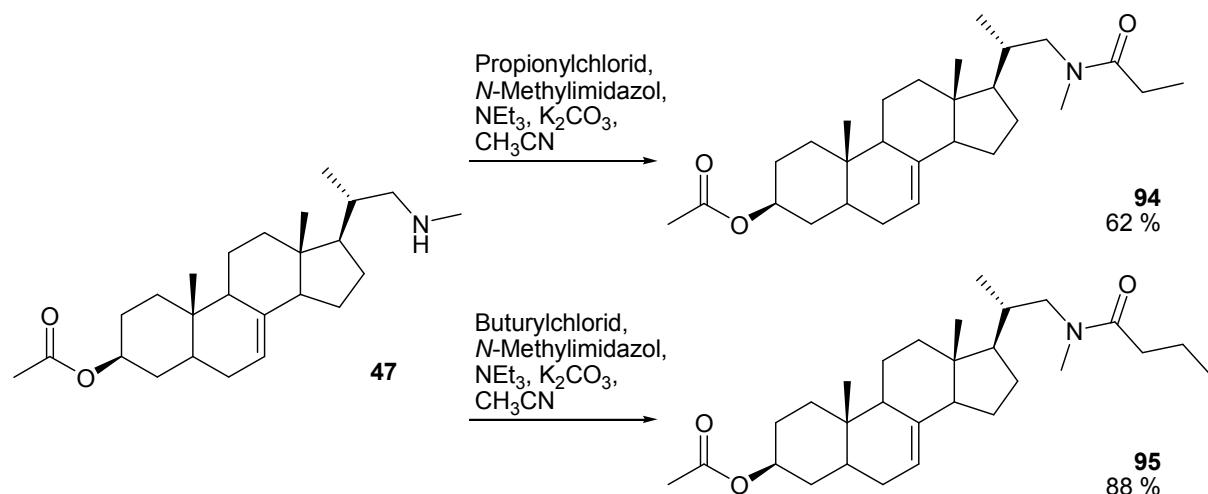


Abbildung 86: Synthese der tertiären Amide des Verbindungstyps C

Von großem Interesse ist die Einführung zusätzlicher protonierbarer Aminfunktionen in die Seitenkette. Der Reaktionsmechanismus der Δ^{24} -Reduktase verläuft vermutlich über ein kationisches HEI, das somit imitiert werden könnte (Abbildung 87).

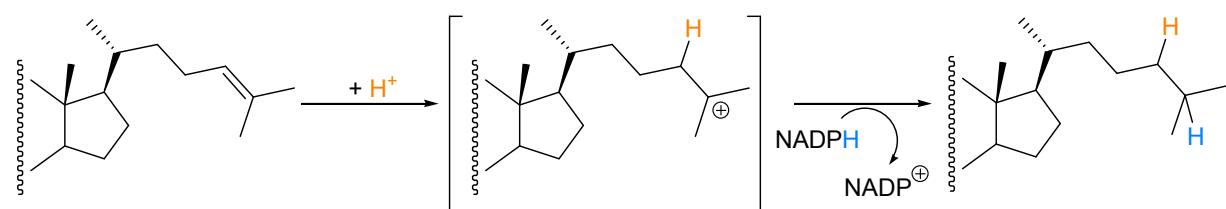


Abbildung 87: Postulierter Reaktionsmechanismus der Δ^{24} -Reduktase²⁴

Über eine *Steglich*-Veresterung des primären Alkohols **6** und *N,N*-Dimethylglycin mit DCC und DMAP als Hilfsreagenzien konnte der Glycinester **96** in guter Ausbeute dargestellt werden (Abbildung 88).

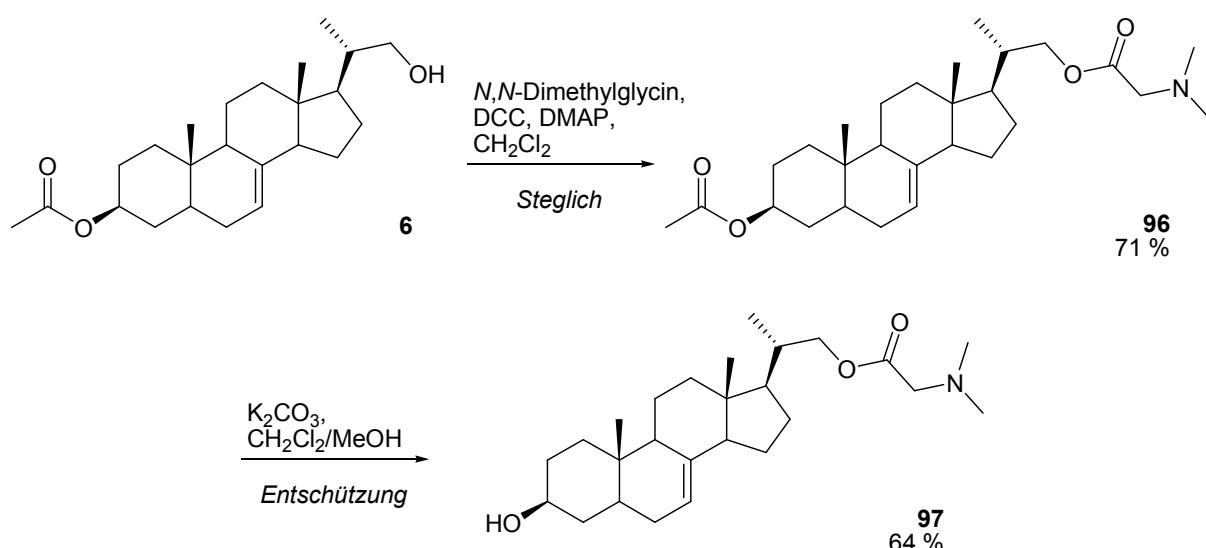
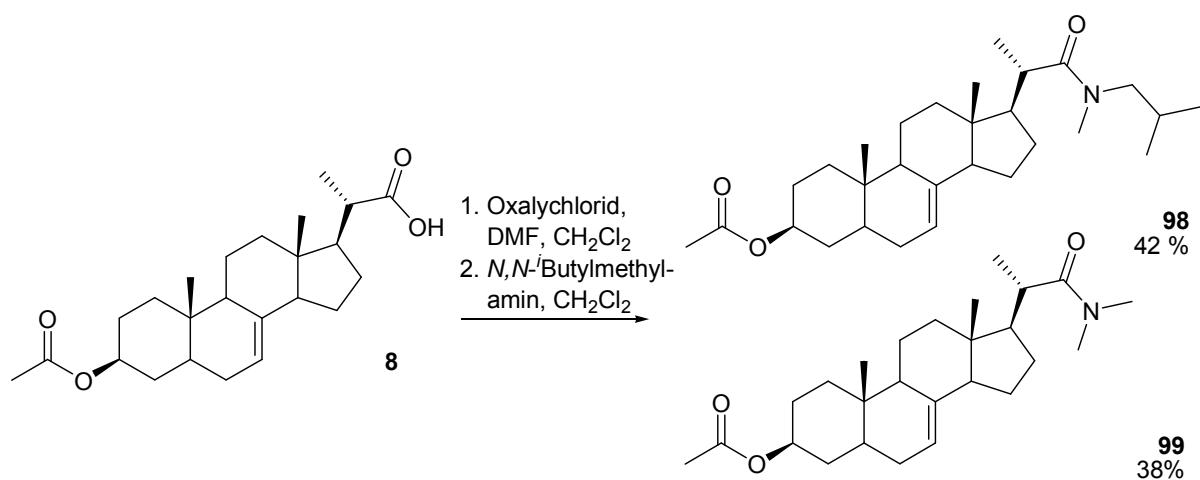


Abbildung 88: Synthese der Glycinester **96** und **97**

In der Arbeit von *Giera*⁷⁴ zeigte sich, dass acetylierte Derivate sowie deren Analoga mit freier Hydroxygruppe an C-3 des Sterolgrundkörpers je die gleichen Enzyme hemmen. Bei der Testung und dem Vergleich der prozentualen Inhibition der Gesamtcholesterolbiosynthese bei einer Konzentration des Inhibitors von 1 μ M (Durchführung: Kapitel 6.3.5) zeigte sich, dass die getesteten Verbindungen ebenfalls in vergleichbarem Maß hemmend wirken. Zur Überprüfung dieser Tatsache wurde im Fall des Glycinesters **96** der Acetylester in einer Standardvorschrift alkalisch hydrolysiert zum 3-Hydroxyderivat **97** (Abbildung 88). Die im Vergleich mit anderen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Entschützungen der C-3-Hydroxyfunktion deutlich schlechtere Ausbeute erklärt sich durch eine sehr kurze Reaktionszeit, die durch die Labilität des Esters in der Sterolseitenkette im Basischen bedingt ist.

Zur weiteren Überprüfung der von *Giera*⁷⁴ aufgestellten SAR wurde als zusätzlicher Vertreter der tertiären Amide ein *iso*-Butyl-Derivat **98** dargestellt, das mit einer weiteren Methylgruppe am Amidstickstoff versehen ist (Abbildung 89).



Nebenreaktion:

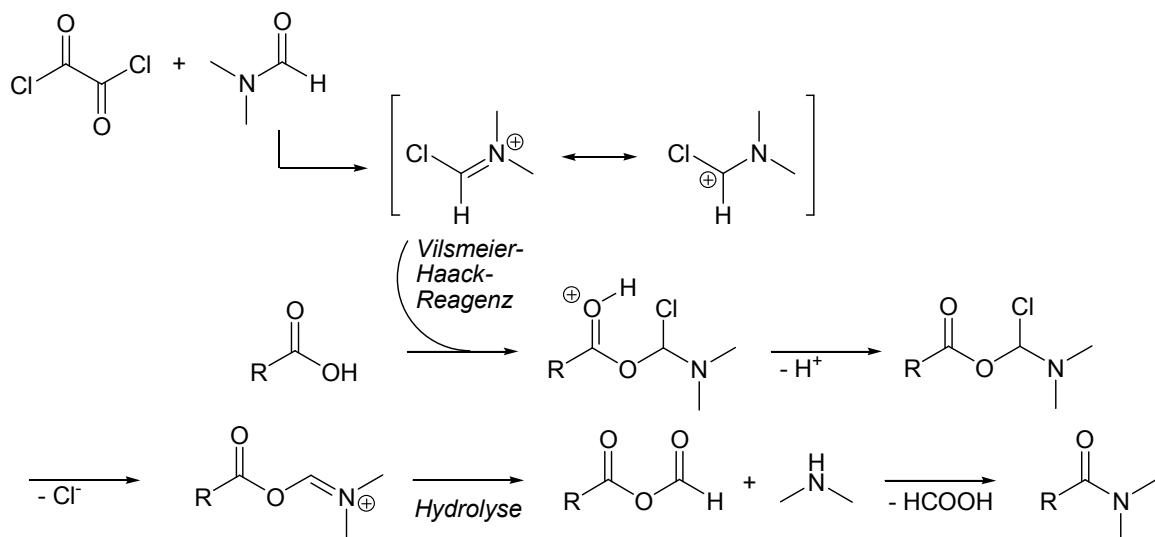


Abbildung 89: Synthese des Seitenkettenamids **98** und Entstehung von (3*S*,20*S*)-20-Dimethylcarbamoylmethylpregn-7-en-3-ylacetat (**99**)

Die Carbonsäure **8** konnte nach Aktivierung als Carbonsäurechlorid durch das *Vilsmeier-Haack*-Reagenz mit einem Überschuss *N,N*-iso-Butylmethylamin in akzeptabler Ausbeute umgesetzt werden. Es entstand jedoch in signifikanten Mengen als Nebenprodukt das *N,N*-Dimethylamid **99**. Hier liegt die Vermutung nahe, dass zwar das *Vilsmeier-Haack*-Reagenz nukleophil von der Carbonsäure angegriffen wurde, das Addukt allerdings nicht zum Säurechlorid umlagerte sondern analog der *Vilsmeier-Haack*-Formylierung zu einem Anydrid der Ameisensäure hydrolysierte. Dabei wird als Nebenprodukt Dimethylamin frei. Das gebildete reaktive Anhydrid kann nun in einem weiteren Schritt von dem Amin nukleophil angegriffen werden, so dass das *N,N*-Dimethylamid **99** entsteht.

Als letzte Variante der potentiellen Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase wurde noch ein Hydrazon **100** dargestellt. Dies konnte durch die Umsetzung des Aldehyds **3** mit Hydrazin in einem Schritt in sehr guter Ausbeute erreicht werden (Abbildung 90).

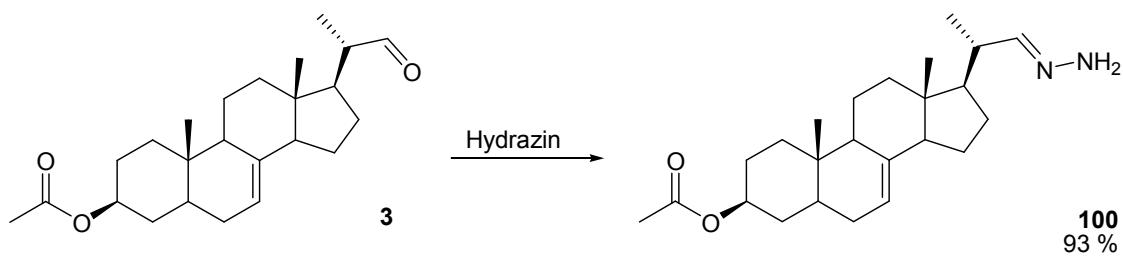


Abbildung 90: Synthese von (3S,20S)-20-(1-Hydrazonomethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**100**)

Damit konnte eine Verbindung getestet werden, die zwar eine Doppelbindung sowie eine protonierbare Funktion, jedoch keine Carbonylfunktion in der Seitenkette trägt.

4 BIOLOGISCHE PRÜFUNG

Die in dieser Arbeit dargestellten Zielverbindungen sowie einige neue Zwischenstufen wurden hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht. Herangezogen wurden dafür die etablierten Methoden des Agar-Diffusionstests und des MTT-Tests sowie die im Arbeitskreis von Prof. Franz Bracher entwickelten Cholesterol- sowie Ergosterolbiosynthese-Assays.

4.1 Agar-Diffusionstest

Die Testung auf antimykotische und antibakterielle Aktivität wurde an verschiedenen Modellkeimen (Tabelle 3) im Agar-Diffusionstest durchgeführt (Durchführung: Kapitel 6.3.1).

Mikroorganismus	(DSMZ-Nr.)	Art
<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas antimicrobia</i>	426 8361	gramnegative Bakterien
<i>Staphylococcus equorum</i> <i>Streptococcus entericus</i>	20675 14446	grampositive Bakterien
<i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Candida glabrata</i>	1345 11226	Hefen
<i>Hyphopichia burtonii</i>	70663	Dermatophyt
<i>Aspergillus niger</i>	1988	Schimmelpilz

Tabelle 3: Verwendete Modellkeime im Agar-Diffusionstest

Die dabei erhaltenen Ergebnisse lassen jeweils nur ableiten, ob generell eine antimikrobielle Aktivität der Verbindungen besteht. Da die Diffusion im wasserhaltigen Nähragar eine entscheidende Rolle bei der Durchführung des Tests

spielt, können aus den gemessenen Hemmhofdurchmessern nur begrenzt quantitative Aussagen abgeleitet werden. Zur genauen Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität und des Hemmmechanismus müssen die im Agar-Diffusionstest positiv getesteten Verbindungen weitergehenden Untersuchungen unterzogen werden. Als Referenzsubstanzen wurden das Antibiotikum Tetracyclin-Hydrochlorid und das Antimykotikum Clotrimazol verwendet (Abbildung 91).

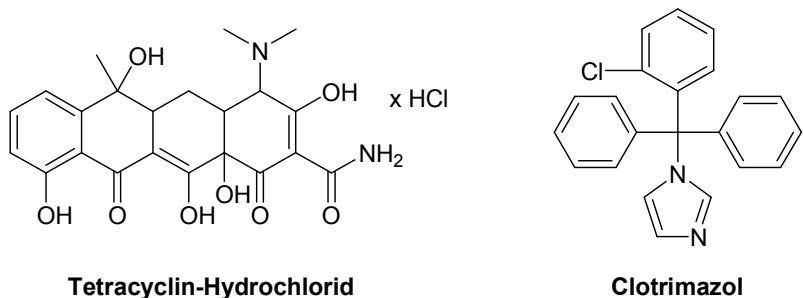


Abbildung 91: Strukturformeln der Referenzsubstanzen Tetracyclin-Hydrochlorid und Clotrimazol

4.1.1 Testergebnisse

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 4) sind die ermittelten Hemmhofdurchmesser gezeigt. Die numerische Angabe bezieht sich hierbei auf den Durchmesser in Millimetern als totale Wachstumshemmung (TH) oder Wachstumshemmung (WH). Bei Verbindung, die keine antimikrobielle Aktivität erkennen lassen erfolgt die Angabe als Strich (--). Ist die Aktivität nicht an allen Keimen getestet worden, ist dies gekennzeichnet (k. T. = keine Testung). Substanzen, deren Nummern mit einem Stern (*) gekennzeichnet sind, konnten nicht vollständig gelöst werden oder fielen bei Auftragen auf die Agarplatten im wasserhaltigen Nähragar aus.

	Gramnegative Bakterien	Grampositive Bakterien	Hefen		Schim- melpilz	Derma- tophyt		
Substanz	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas antimicrobia</i>	<i>Staphylococc us equorum</i>	<i>Streptococc us entericus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Hypopichia burtonii</i>
Ester								
39*	--	--	--	--	--	--	--	--
42	--	--	--	--	--	--	--	--
86	--	--	--	--	--	--	--	--
87	--	--	--	--	--	--	--	--
89	--	--	--	--	--	--	--	--
90	--	--	--	--	--	--	--	--
Hydroxamate								
21	--	--	--	--	--	--	--	--
84	--	--	--	--	--	--	--	--
85	--	--	--	--	--	--	--	--
Azole und Zwischenstufen								
19*	--	--	--	--	--	--	--	--
46*	--	--	--	--	--	--	--	--
80	--	--	--	--	--	--	--	--
81	--	--	--	--	25 (WH)	--	--	--
82	--	14 (TH)	13 (TH)	13 (TH)	20 (TH)	15 (TH)	13 (TH) 16 (WH)	15 (TH)

* Substanzen konnten nicht vollständig gelöst werden oder sind bei Auftragen auf die Agarplatten wieder ausgefallen

Tabelle 4: Testergebnisse des Agar-Diffusionstests

4.1.2 Diskussion der Testergebnisse

Bei Betrachtung dieser tabellarischen Veranschaulichung der Testergebnisse fällt auf, dass die in dieser Arbeit dargestellten seitenkettenfunktionalisierten Sterole grundsätzlich in wässrigen Medien ausgesprochen schlecht löslich sind. In dieser Testmethode werden zwar Lösungen in Dichlormethan oder DMSO hergestellt, um durch anschließendes Abdampfen des Lösungsmittels die zum Eintragen in das Testsystem benötigten Substanzplättchen zu generieren, aber ein großer Anteil der synthetisierten Verbindungen fällt bei Auftragen auf die Agarplatten erneut aus. So ist fraglich, ob der Agar-Diffusionstest hier eine große Aussagekraft hat. Sicherlich sind Verbindungen, die anhand der Hemmhöfe qualitativ als Inhibitoren bestimmter Keime identifiziert werden konnten, auch als solche zu betrachten und weitergehend zu untersuchen. Vermutlich sind allerdings einige Verbindungen ebenfalls antimikrobiell aktiv, ohne unter den verwendeten Versuchsbedingungen einen Hemmhof auf den Agarplatten zu induzieren. Diese schlecht-löslichen Verbindungen können nicht ausreichend diffundieren, oder befinden sich eventuell nur ungelöst auf dem Agar, und erscheinen somit als inaktiv.

Im Agar-Diffusionstest ließ sich nur bei drei Verbindungen eine antimikrobielle Aktivität feststellen (Abbildung 92).

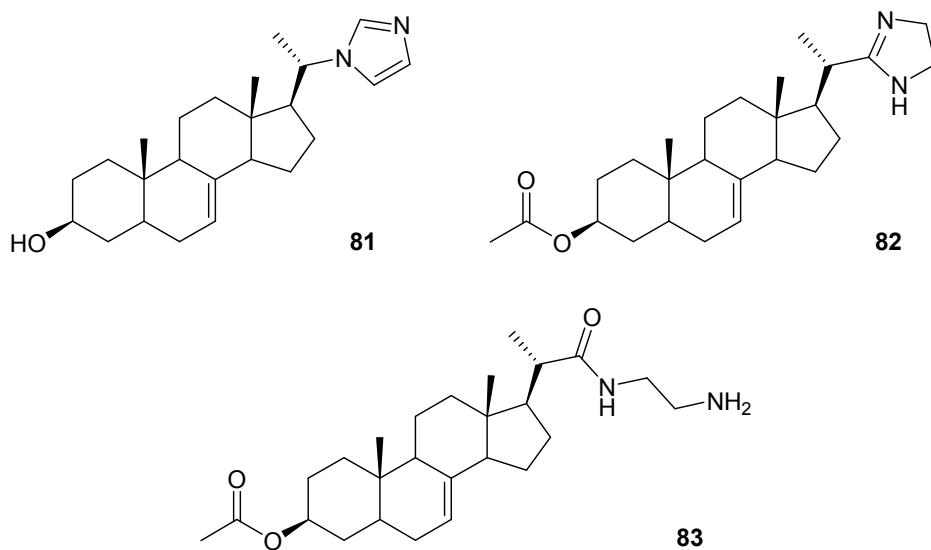


Abbildung 92: Im Agar-Diffusionstest antimikrobiell aktive Verbindungen **81**, **82** und **83**

Dabei wirkt das Imidazolinderivat **82** sowohl auf verschiedene Bakterien als auch auf alle hier getesteten Pilze, ohne allerdings eine selektive Wirkung zu zeigen. Bei einem Vergleich der Hemmhöfe, ist das Antibiotikum Tetracyclin aber deutlich stärker antibiotisch aktiv. Die Hemmhöfe gegenüber Pilzen sind durchaus vergleichbar mit denen des Clotrimazols. Dieser Vergleich kann aber nur als Anhaltspunkt gesehen werden, nicht als quantitative Aussage. Das Amid **83** hingegen wirkt selektiv auf die Hefe *Yarrowia lipolytica*, ebenso wie das Imidazolderivat **81**. In beiden Fällen ist ein Hemmhof zu beobachten, der dem des Clotrimazols vergleichbar ist. Gerade die genauere Untersuchung des nicht vollständig gelösten **83** erscheint besonders interessant, denn anscheinend induziert es sogar in äußerst geringen Konzentrationen Hemmhöfe von etwa 20 mm (WH).

4.2 MTT-Test

Der MTT-Test nach Mosmann,¹⁶¹ der breite Anwendung zur Messung von Zellproliferation und damit auch zum Screening von Zytostatika findet, basiert auf der Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blauen Formazan durch aktiv wachsende Zellen (Abbildung 93).

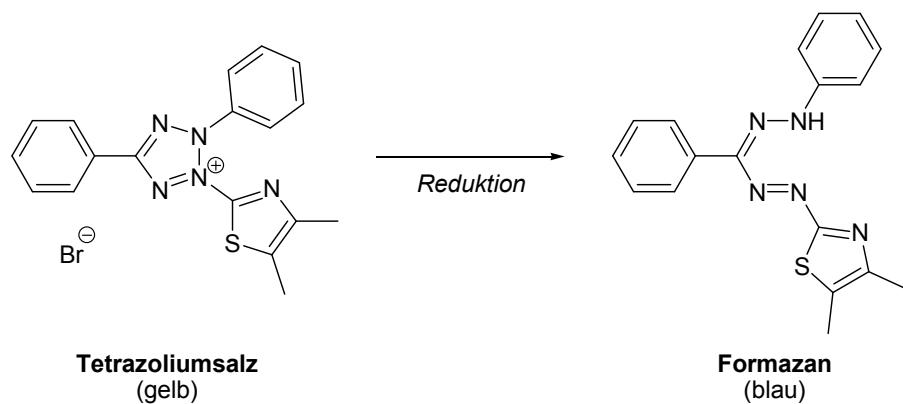


Abbildung 93: Reduktion von MTT zu einem blauen Formazan

Diese Reduktion erfolgt ausschließlich in lebenden Zellen durch Mitochondrien, Peroxisomen und spezielle Oxidoreduktasen im Zytosol. Dabei haben Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt, dass die Reduktion hauptsächlich von

den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH und nur teilweise von Succinat abhängig ist.¹⁶² Die Menge des umgesetzten und letztendlich gemessenen Farbstoffs entspricht damit der Glykolyserate der Zellen *per se*, so dass der Anteil der Umsetzung von MTT zum blauen Formazan durch photometrische Bestimmung als direktes Maß für die Zellviabilität herangezogen werden kann.

4.2.1 Testergebnisse

Der MTT-Test wurde mit humanen Leukämiezellen der Zelllinie HL-60 durchgeführt (Durchführung: Kapitel 6.3.2). Die im Folgenden tabellarisch gezeigten IC₅₀-Werte (Tabelle 5) sind ein Maß für die zytotoxische Aktivität der Substanzen, ohne dass Aussagen zu dem zugrunde liegenden Wirkmechanismus getroffen werden können. Der IC₅₀-Wert ist die Konzentration des Inhibitors, bei der die halbmaximale Inhibition der Zellfunktionen beobachtet werden kann. Mit einem Stern (*) gekennzeichnete Substanznummern zeigen an, dass die Substanz nicht ausreichend löslich ist und bei Eintragen in das Testsystem entweder in allen Konzentrationen oder in bestimmten Konzentrationsbereichen ausfällt, so dass kein IC₅₀-Wert bestimmbar ist (--). Verbindungen, die in keinem der im MTT-Test verwendeten Lösungsmittel löslich sind, wurden nicht in das Testsystem eingebracht.

Substanz	IC ₅₀ [µM]	Substanz	IC ₅₀ [µM]
Disulfide und Zwischenstufen			
9*	--	43	> 50
10*	--	83*	k. E. (trüb)
22	4	91*	--
25	22	92*	--
26	34	94	k. E.
31*	--	95	13
32	27	98	47
Thioester			
33	k. E.	42	>50
34	43	86	18
35	29	87*	--
Azole und Zwischenstufen			
19*	--	89	--
46	> 50	90	42
80	> 50	Hydroxamsäurederivate	
81*	--	21	18
82	18	84	> 50
		85*	--

Tabelle 5: Testergebnisse des MTT-Tests

4.2.2 Diskussion der Testergebnisse

Wie auch schon bei den Testergebnissen des Agar-Diffusionstests deutlich zu erkennen war, ist die Löslichkeit der Testsubstanzen ein entscheidendes Problem. Die Testung wird im wässrigen Medium durchgeführt, so dass einige Proben beim Eintragen in das Testsystem ausfallen. Folglich kann keine konzentrationsabhängige Zytotoxität und dementsprechend kein IC₅₀-Wert bestimmt werden. Für einige Testsubstanzen sind IC₅₀-Werte im MTT-Testsystem bestimmbar, jedoch ist hier nur

in einem Fall von einer signifikanten Zytotoxität zu sprechen, die mit Cisplatin als Referenz erst bei einem Wert $\leq 5 \mu\text{M}$ definiert ist. Das unsymmetrische aromatische Disulfid **22** ist hier im niedrigen mikromolaren Bereich aktiv.

Einige der Verbindungen dieser Arbeit zeigen IC_{50} -Werte $> 50 \mu\text{M}$, man kann also von untoxischen Verbindungen sprechen. Die bestimmten IC_{50} -Werte der anderen Verbindungen sind ebenfalls deutlich über $5 \mu\text{M}$ und so sind diese ebenfalls als nicht signifikant zytotoxisch zu bewerten. Lediglich auffällig ist im Vergleich von Verbindung **98** zu **95**, dass der Tausch der Position des Amidstickstoffs und der Carbonylgruppe des tertiären Amids sowie eine etwas kleinere Alkylgruppe eine deutliche Steigerung der zytotoxischen Aktivität mitbringt. Ebenso ist die freie Alkylhydroxamsäure **21** zytotoxischer als das O-alkylierte Analogon **84**.

Ein Einsatz dieser getesteten Verbindungen als Zytostatika ist aber auszuschließen, so dass weitergehende Testungen beispielsweise beim *National Cancer Institute* (NCI) von keinem Interesse sind. Für den möglichen Einsatz als therapeutisch wirksame Ergosterol- oder Cholesterolbiosyntheseinhibitoren sind die erhaltenen Ergebnisse jedoch als sehr positiv zu bewerten, da die Testsubstanzen mit einer Ausnahme keine nennenswerte, bei den genannten Indikationen unerwünschte Zytotoxizität zeigen.

4.3 Ergosterolbiosynthese-Assay

Verbindungen, die im Agardiffusionstest einen antimykotischen Effekt gezeigt hatten, wurden mit Hilfe des arbeitskreisinternen Ergosterolbiosynthese-Assays genauer untersucht (Durchführung: Kapitel 6.3.3). Ebenso wurden einige Verbindungen, die aufgrund von Löslichkeitsproblemen im Agar-Diffusionstest keine verlässlichen Ergebnisse liefern konnten, ebenfalls mit Hilfe dieses Assays untersucht. Die Konzentrationen der für diesen Assay benötigten Lösungen sind niedriger, so dass alle Substanzen ohne Löslichkeitsprobleme getestet werden konnten. Durch die Inkubation der verschiedenen Modellkeime mit den Testsubstanzen und anschließende GC/MS-Analytik der durch Zelllyse erhaltenen Sterolfraktion kann in diesem von *Jörg Müller*¹⁶³ entwickelten und von *Giera*⁷⁴ sowie aktuell von *Christoph*

Müller weiter ausgearbeiteten Testsystem die Inhibition der Ergosterolbiosynthese auf enzymatischer Ebene analysiert werden. Als Modellkeime wurden hier *Yarrowia lipolytica*, *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae* verwendet, da diese in kurzer Zeit ausreichend Biomasse produzieren und sich durch Membranfiltration leicht vom Kulturmedium abtrennen lassen. Die Inkubation der Hefen mit Ergosterolbiosynthese-Inhibitoren führt zu einem Defizit an Ergosterol und gleichzeitig zu einer Akkumulation von Biosynthesezwischenstufen, sowie in einigen Fällen zur Bildung ungewöhnlicher Sterole. Aus dem resultierenden Sterolmuster lassen sich, durch Vergleich mit Sterolmustern, die von Inhibitoren mit bekanntem Zielenzym verursacht werden, Rückschlüsse auf das inhibierte Zielenzym ziehen.

4.3.1 Testergebnisse

Nicht alle Verbindungen wurden an allen Keimen getestet (k.T.; keine Testung). Zeigten die getesteten Verbindungen eine Enzyminhibition wird das Enzym namentlich genannt oder das Sterolmuster als unbekannt deklariert (unbekannt). Erscheint die Inhibition eines Enzyms möglich, ist aber nicht sicher zu bestimmen, wird es mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Konnte keine Inhibition der Ergosterolbiosynthese erkannt werden, wird dies durch Striche (--) kenntlich gemacht. In einigen Fällen konnte eine größere Biomasse gewachsener Pilze als in der Kontrolle extrahiert werden, und damit auch größere Mengen an Sterolen identifiziert werden (++).

Substanz	Hefen		
	<i>Candida glabrata</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Disulfide			
22	--	k.T.	k.T.
23	--	k.T.	k.T.
25	--	k.T.	k.T.
Thioester			
33	Squalenepoxidase*	--	k.T.
34	Squalenepoxidase*	--	k.T.
Amide und Zwischenstufen			
46	--	--	unbekannt
83	--	--	--
98	-- (++)	--	--
99	--	--	k. T.
Ester			
39	Squalenepoxidase*	--	k.T.
40	Squalenepoxidase*	--	k.T.
41	Squalenepoxidase*	--	k.T.
42	--	--	k.T.
87	-- (++)	unbekannt	C-24-Methyltransferase
88	unbekannt	unbekannt	C-24-Methyltransferase
89	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Hydroxamate			
84	--	--	--
85	--	--	--
Azole und Zwischenstufen			
19	--	--	--
80	--	--	--
81	C-24-Methyltransferase	--	--
82	C-24-Methyltransferase	Multienzyminhibition	--

Tabelle 6: Testergebnisse des Ergosterolbiosynthese-Assays

4.3.4 Diskussion der Testergebnisse

Das im Agar-Diffusionstest antimikrobiell wirksame Amid **83** zeigt hier keinerlei nachweisbare Inhibition der Ergosterolbiosynthese, so dass die antimykotische Wirkung aufgrund anderer Effekte zustande kommen muss. Die ebenfalls schon im Agar-Diffusionstest als potentielle Antimykotika bestimmten Verbindungen **81**, ein *N*-Alkyl-Imidazol, sowie das Imidazolinderivat **82** konnten in der mit *Candida glabrata* durchgeföhrten Testung als C-24-Methyltransferase-Inhibitoren identifiziert werden (Abbildung 94).

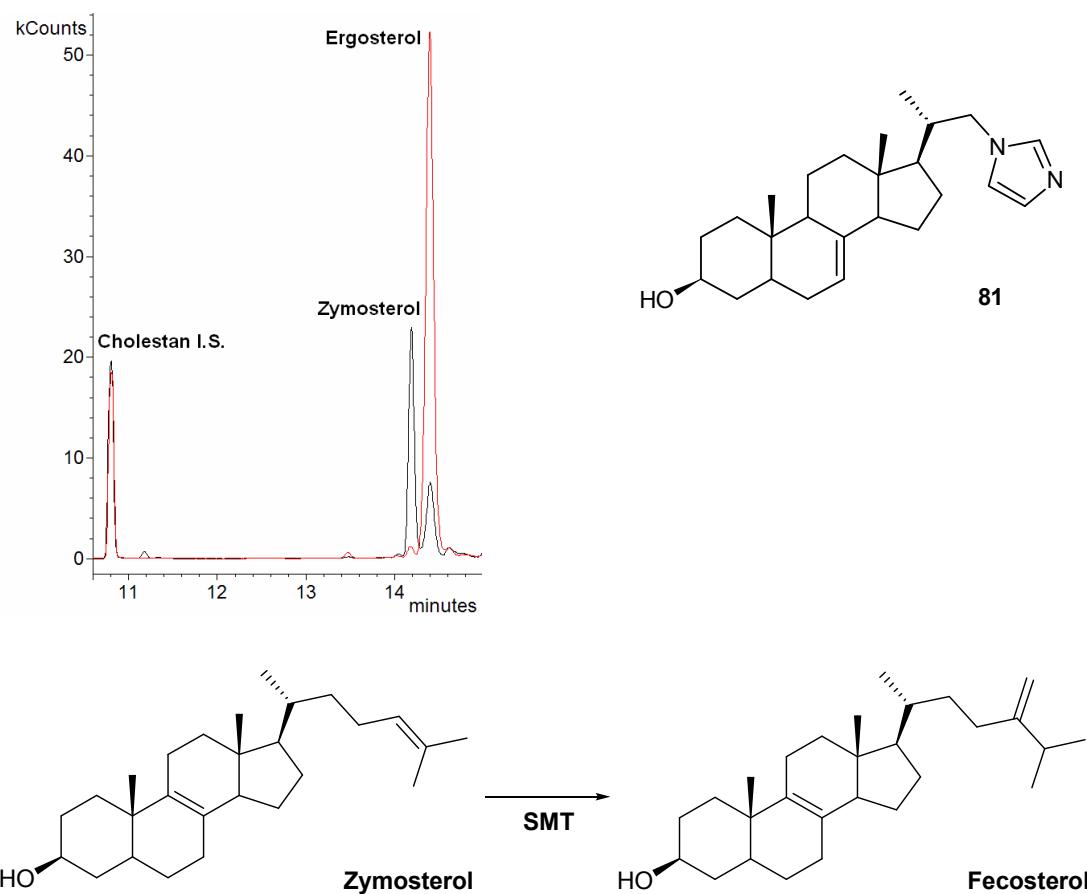


Abbildung 94: Ausschnitt des GC/MS-Chromatogramms (selected ions: 357, 217, 203, 378, 363, 337, 456, 441, 351) nach Inkubation mit **81** (8 μ g) und Ausschnitt aus der Ergosterolbiosynthese

Die Identifizierung des inhibierten Enzyms über die GC/MS-Analyse des Sterolextrakts erfolgt über die Änderung des Sterolmusters gegenüber einer Kontrolle. Es ist deutlich erkennbar, dass Zymosterol angereichert wird, da die

Umsetzung zur nächsten Zwischenstufe der Ergosterolbiosynthese aufgrund der Enzyminhibition nicht vollständig ablaufen kann. Da keine weiteren Vorstufen akkumulieren, kann davon ausgegangen werden, dass die Biosynthese von Ergosterol bis zur durch die C-24-Sterolmethyltransferase katalysierten Methylierung von Zymosterol zu Fecosterol ungehindert ablaufen kann. Es akkumulieren ebenfalls keine späteren Biosynthesezwischenstufen der Ergosterolbiosynthese, Ergosterol kann aber noch nachgewiesen werden. **81** und **82** sind also in der Testung mit *Candida glabrata* als selektive Inhibitoren der C-24-Sterolmethyltransferase einzuordnen.

Gegenüber *Saccharomyces cerevisiae* zeigt lediglich **82** noch einen als Multienzyminhibition zu kennzeichnenden Effekt. Die Ergebnisse der Testung im Ergosterolbiosynthese-Assay mit den anderen Keimen zeigen keinerlei inhibitorische Wirkung in der Ergosterolbiosynthese an.

Zusätzlich zu den schon im Agar-Diffusionstest als antimikrobiell aktiv identifizierten Substanzen konnten hier noch einige weitere Sterolbiosynthese-Inhibitoren nachgewiesen werden. So sind die aus dem primären Alkohol **6** darstellbaren α,β -ungesättigten Ester **39**, **40** und **41** sowie die Thioester **33** und **34** vermutlich Inhibitoren der Squalenepoxidase und wirken in dieser Form antimykotisch auf *Candida glabrata* (Abbildung 95).

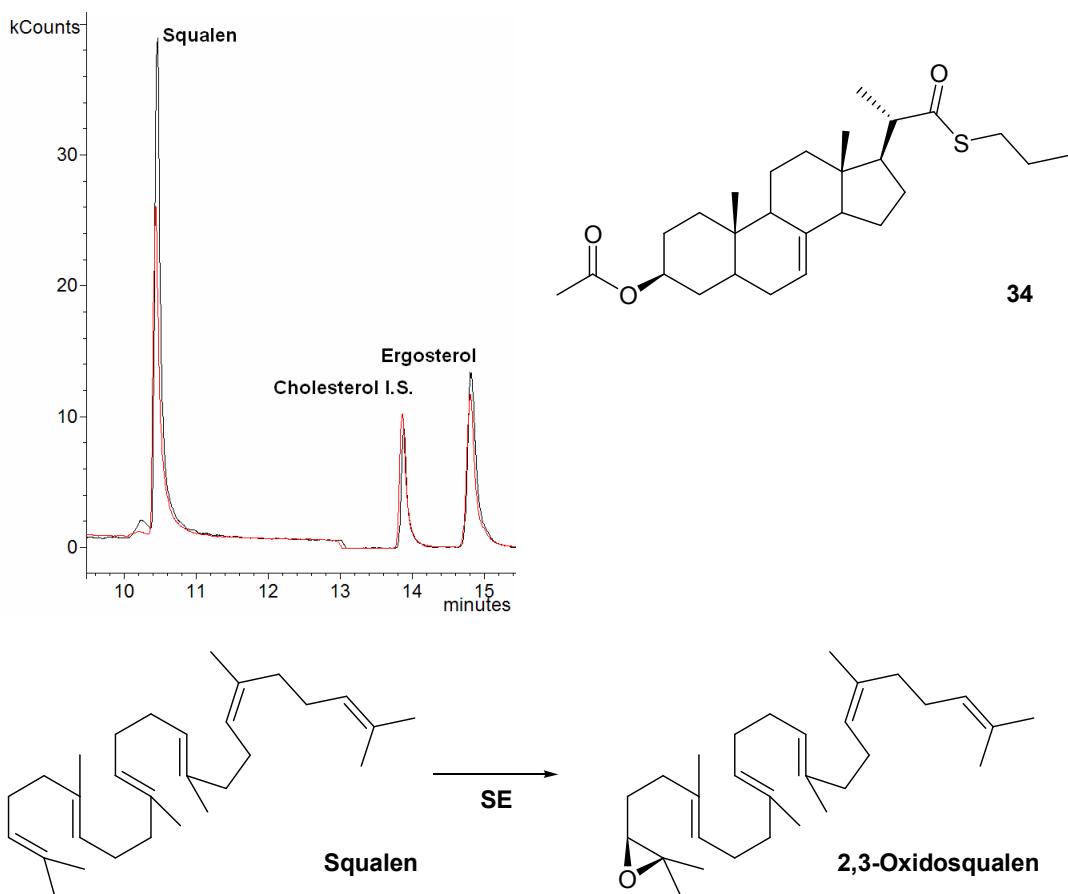


Abbildung 95: Ausschnitt des GC/MS-Chromatogramms (selected ions: 69, 80, 95, 458, 368, 329, 378, 363, 337) nach Inkubation mit **34** (8 µg) und Ausschnitt aus der Ergosterolbiosynthese

Die Analyse des Gaschromatograms durch Integration der Signale, ergibt eine deutlich größere Masse Squalen in den mit den Substanzen behandelten Proben als in der Kontrolle. Allerdings konnten trotzdem vergleichbare Mengen von Ergosterol nachgewiesen werden. So kann zwar einersets vermutet werden, dass durch die Inhibition der Squalenepoxidase die Biosynthese nicht ungestört ablaufen kann und Squalen als Folge davon akkumuliert. Da jedoch Ergosterol in vergleichbaren Mengen wie bei der Kontrolle nachweisbar ist, besteht auch die Möglichkeit, dass aus unbekannten sowie in diesem Testsystem nicht-feststellbaren Gründen mehr Squalen vom Pilz produziert wurde. Die Kontrolle zeigt ebenfalls ein dem Squalen zuzuordnendes Signal an, so dass deutlich wird, dass es nie vollständig umgesetzt wird.

Warum in manchen Fällen ein erhöhtes Wachstum von Pilzen, eindeutig durch die Menge der im Sterolextrakt erhaltenen Sterole feststellbar, zu beobachten ist, kann in diesem Testsystem nicht geklärt werden.

Der aus der Veresterung des Carbonsäurechlorids **11** stammende inverse Ester **89** mit der umgekehrten Verknüpfung zum Sterolgrundkörper führt bei Inkubation mit allen Modellkeimen zu einem unbekannten Sterolmuster. Die gesättigten Ester **87** und **88** zeigen ebenfalls ungewöhnliche Effekte auf die Sterolbiosynthese der Hefen, sind aber darüber hinaus in der Testung an *Yarrowia lipolytica* eindeutig als C-24-Methyltransferase-Inhibitoren zu identifizieren.

4.4 Cholesterolbiosynthese-Assay

Mit Hilfe des in unserem Arbeitskreis von *Giera et al.*¹⁶⁴ entwickelten Cholesterolbiosynthese-Assays können Cholesterolbiosynthese-Inhibitoren des Postsqualenabschnitts identifiziert und klassifiziert werden. Es handelt sich hierbei um einen mit HL 60-Zellen durchgeführten Ganzzell-Assay (Durchführung: Kapitel 6.3.4), in dessen Verlauf die Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert werden und anschließend nach entsprechender Aufarbeitung die Veränderungen im Sterolmuster mittels GC/MS-Analytik analysiert werden. Es wurden Sterolmuster verschiedener bekannter Inhibitoren spezifischer Enzyme des Postsqualenabschnitts mit einer Negativkontrolle verglichen und ausgewertet, so dass nun die von den Testsubstanzen verursachten veränderten Sterolmuster mit denen der mit bekannten Inhibitoren erhaltenen abgeglichen werden können.

4.4.1 Testergebnisse

Im Folgenden werden die Testergebnisse der Sustanzen dieser Arbeit tabellarisch dargestellt (Tabelle 7), mit namentlicher Nennung des inhibierten Enzyms bzw. einem Hinweis auf keinerlei inhibitorische Aktivität (--) oder auf ein unbekanntes und damit keiner spezifischen Enzyminhibition zuzuordnendes Sterolmuster (unbekannt). Die als Δ^{24} -Reduktase-Inhibitoren publizierten Verbindungen W-7, ein Calmodulin-Antagonist und Trifluoperazin, ein Antipsychotikum aus der Reihe der Phenothiazine¹⁶⁵ wurden ebenfalls getestet (Abbildung 96).

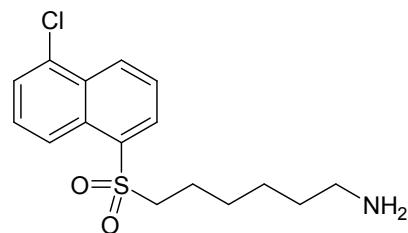
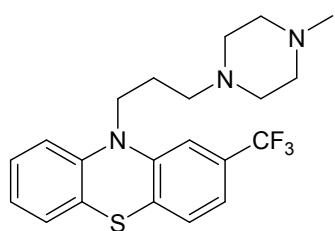


Abbildung 96: Strukturformeln von Trifluoperazin und W-7

Bei der Testung von Trifluoperazin erscheint die Inhibition der $\Delta^{8,7}$ -Isomerase wahrscheinlich, ist aber nicht sicher zu bestimmen (*).

Substanz	Inhibiertes Enzym	Substanz	Inhibiertes Enzym
Disulfide und Zwischenstufen			
9	Δ^{24} -Reduktase	46	Δ^{24} -Reduktase
10	Δ^{24} -Reduktase	91	Δ^{24} -Reduktase
22	Δ^{24} -Reduktase	98	--
23	Δ^{24} -Reduktase	99	--
25	Δ^{24} -Reduktase	Ester	
Thioester			
33	--	39	Δ^{24} -Reduktase
34	--	40	Δ^{24} -Reduktase
Azole und Zwischenstufen			
19	Δ^{24} -Reduktase	41	Δ^{24} -Reduktase
80	Δ^{24} -Reduktase	42	Δ^{24} -Reduktase
81	7-Dehydrocholesterol-reduktase + unbekannt	87	unbekannt
82	Δ^{24} -Reduktase + unbekannt	88	unbekannt
TBDMS-Derivate			
51	--	89	$\Delta^{8,7}$ -Isomerase
52	--	96	Δ^{24} -Reduktase
Hydrazone			
100	Δ^{24} -Reduktase	97b	Δ^{24} -Reduktase
		Trifluoperazin	$\Delta^{8,7}$ -Isomerase*
		W-7	--

Tabelle 7: Testergebnisse des Cholesterolbiosynthese-Assays

4.4.2 Diskussion der Testergebnisse

Eine große Zahl der getesteten Verbindungen konnte in diesem Assay als selektive Inhibitoren der humanen Δ^{24} -Reduktase identifiziert werden. Dies lässt sich in der GC/MS-Analyse des Sterolextrakts eindeutig durch eine Akkumulation von

Desmosterol nachweisen (Abbildung 97). Es sind zwar alle Zwischenstufen des Bloch-Wegs der Cholesterolsynthese in die gesättigten Analoga des Kandutsch-Russell-Wegs überführbar, aber die Biosynthese wird im Fall einer Enzyminhibition soweit wie möglich ablaufen.

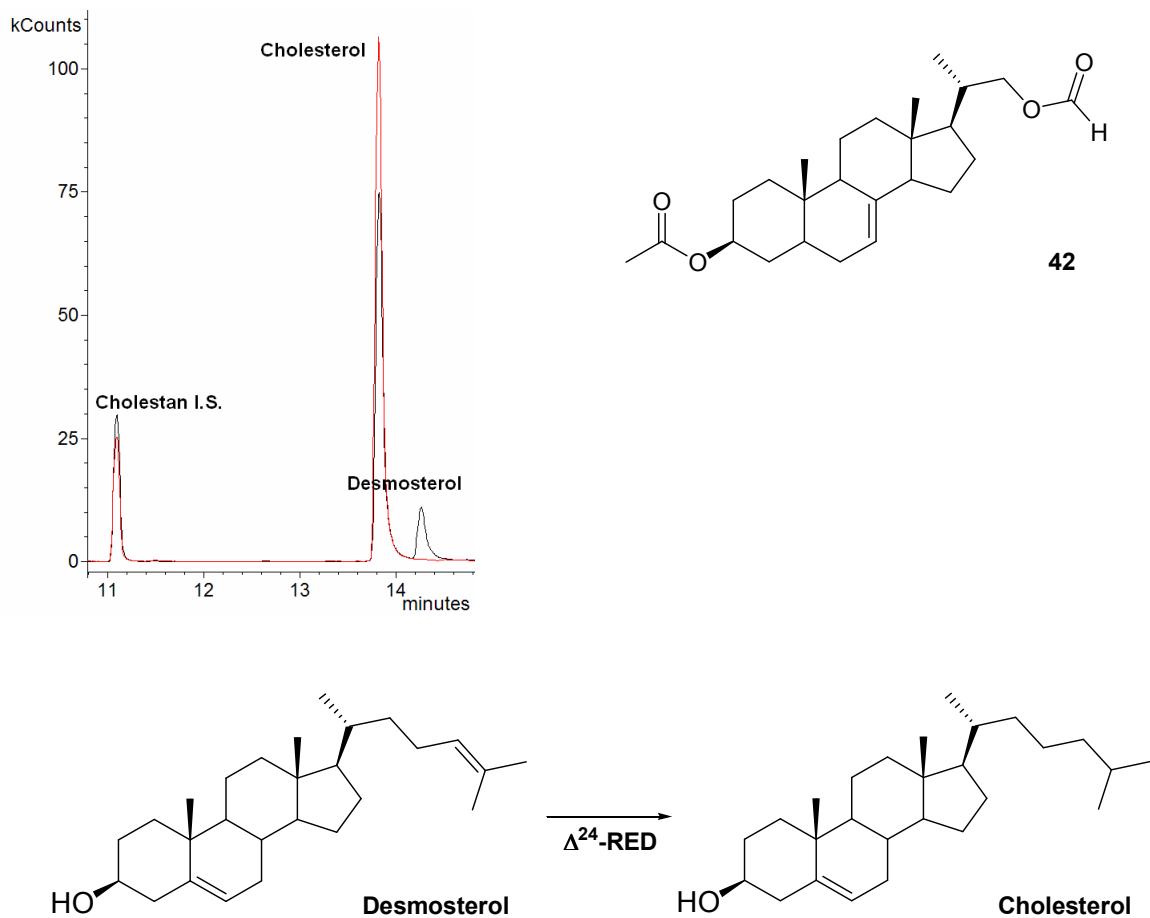


Abbildung 97: Ausschnitt des GC/MS-Chromatogramms (selected ions: 357, 217, 203, 458, 368, 329, 456, 253, 129) nach Inkubation mit **42** (1 μ M) und Ausschnitt aus der Cholesterolsynthese

Zu den Δ^{24} -Reduktase-Inhibitoren gehören alle getesteten unsymmetrischen Disulfide mit heteroaromatischen Resten **22**, **23** und **25** sowie auch die Vorstufen **10**, ein primäres Thiol, und das Acetylthioderivat **9**. Die Thioester **33** und **34**, bei denen sich die Carbonylgruppe näher am Sterolgrundgerüst befindet, hingegen lassen keine Enzyminhibition erkennen. Ebenso lässt sich bei den tertiären Amiden **97** und **96** mit der Carbonylgruppe an der gleichen Position keine Enzyminhibition nachweisen. Allerdings wirkt das sekundäre Amid **82** mit einer weiteren primären

Amingruppe in der Seitenkette als Inhibitor der Δ^{24} -Reduktase. Das kurzkettige primäre Amin **46** kann ebenfalls zu den Δ^{24} -Reduktase-Inhibitoren gezählt werden. Der Ester **88** mit einer terminalen Doppelbindung und der gleichen Position der Carbonylgruppe wie die inaktiven Thioester **33** und **34** sowie die tertiären Amide **96** und **97** hingegen wirkt als Inhibitor der $\Delta^{8,7}$ -Isomerase. Betrachtet man im Gegensatz dazu Ester, in denen sich die Carbonylgruppe weiter entfernt vom Sterolgrundgerüst in der Seitenkette befindet, lassen sich einige Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase identifizieren. Dazu gehören der Ameisensäureester **42** sowie die Alkenylester **39**, **40** und **41** mit einer Doppelbindung in α -Position zum Carbonylkohlenstoff (Michael-Systeme). Strukturell ähnliche Verbindungen ohne Doppelbindung, wie die gesättigten Analoga **86** und **87** hingegen zeigen zwar ein gegenüber der Kontrolle verändertes Sterolmuster, jedoch ist dies keiner spezifischen Enzyminhibition zuzuordnen. Wird jedoch noch ein zusätzliches tertiäres Amin in die Seitenkette des Esters integriert wie beim *N,N*-Dimethylglycinester **95**, wirkt die Verbindung wiederum als Inhibitor der Δ^{24} -Reduktase. TBDMS-geschützte Sterole zeigen keinerlei enzyminhibitorische Wirkung.

Fasst man die Ergebnisse der Testungen von Estern, Amiden und Thioestern zusammen, zeigt sich deutlich, dass die Position der Carbonylfunktion in der Seitenkette von entscheidender Bedeutung ist. *Giera*⁷⁴ konnte schon zeigen, dass Amide mit sehr kleinen Resten ($R^1 = R^2 = H$ bzw. $R^1 = H, R^2 = \text{Methyl}$) selektiv die Δ^{24} -Reduktase hemmen, und erst größere Alkylketten zum Verlust der Selektivität oder auch zur selektiven Inhibition der C-5-Desaturase führen. Ebenso fiel auch schon bei *Giera*⁷⁴ auf, dass tertiäre Amide keine enzyminhibitorische Wirkung im Cholesterolsynthese-Assay zeigen, wie auch hier mit dem Dimethylderivat **97** und einem sterisch anspruchsvollerem Amid **96** überprüft. Vor allem bei den hier gezeigten Alkylestern zeigt sich ebenfalls der Verlust der Selektivität bei Derivaten mit größeren Alkylresten. Zusätzlich haben allerdings auch protonierbare Gruppen oder das Vorhandensein einer Doppelbindung offensichtlich einen großen Effekt.

Unter den Azolen findet sich auch noch zwei selektive Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase, die *N*-Alkyltriazole **19** und **80**, ein Hinweis darauf, dass die Acetylschutzgruppe keine Auswirkung auf die biologische Aktivität Seitenkettenmodifizierter Sterole hat. *Giera*⁷⁴

hatte in seiner Arbeit ebenfalls Hinweise darauf gefunden, dass in 3-Position acetylierte Derivate dieser Stoffklasse als *Prodrugs* einzustufen sind.

Das 2-substituierte Imidazolin **81** wirkt als nicht-selektiver Inhibitor der Δ^{24} -Reduktase, so dass im Sterolextrakt neben einer Anreicherung von Desmosterol ebenfalls noch eine Akkumulation von Cholesta-8,14,24-trien-3 β -ol nachzuweisen ist, möglicherweise also die 7-Dehydrocholesterolreduktase ebenfalls inhibiert wird. Das *N*-Alkyl-Imidazol **80** ist ebenfalls ein unselektiver Inhibitor der Δ^{24} -Reduktase neben der 7-Dehydrocholesterolreduktase. Die zwei typischen Substrate der 7-Dehydrocholesterolreduktase, Cholesta-5,7,24-trien-3 β -ol (*Bloch*-Weg) bzw. 7-Dehydrocholesterol (*Kandutsch-Russel*-Weg) können nebeneinander durch die GC/MS-Analytik des Sterolextrakts nachgewiesen werden. Das zeigt an, dass die Hydrierung der Δ^7 -Doppelbindung gehemmt wird, aber auch die Δ^{24} -Reduktase teilweise inhibiert ist, da sonst Cholesta-5,7,24-trien-3 β -ol zum Δ^{24} -gesättigten Analogon 7-Dehydrocholesterol überführt werden würde.

Die Ergebnisse zeigen vor allem deutlich, dass der Bereich der Seitenkette, der relativ nah am Sterolgrundgerüst liegt extrem wichtig für die Inhibition verschiedener Enzyme ist, so dass selbst kleine Veränderung einen großen Effekt auf die Selektivität haben. Bei den getesteten Disulfiden hingegen scheint die Änderung des deutlich nach außen verschobenen Heteroaromatens keinen Unterschied zu machen.

Die zum Vergleich getesteten Inhibitoren W-7 und Trifluoperazin ließen sich in diesem Assay nicht, wie in der Literatur von *Filipovic* und *Buddecke*¹⁶³ postuliert, als selektive Δ^{24} -Reduktase-Inhibitoren identifizieren. Im Fall von W-7 lässt sich keine Enzymhemmung nachweisen, während im Fall von Trifluoperazin Zymostenol und Zymosterol angereichert werden. Von daher scheint die Δ^{24} -Reduktase zumindest teilweise inhibiert zu werden, vor allem aber die $\Delta^{8,7}$ -Isomerase.

4.5 Aktivitätsbestimmung von Testsubstanzen

Die Aktivität der Testsubstanzen wurde ebenfalls in einem Ganzzell-Assay (Durchführung: Kapitel 6.3.5) bestimmt, da in unserem Arbeitskreis keine Möglichkeit

besteht, eine Testung an den isolierten Enzymen durchzuführen. Das Verfahren basiert auf der Bestimmung der Masse des von den mit Inhibitoren behandelten Zellen neu synthetisierten Cholesterols.¹⁶⁶ Um neu synthetisiertes Cholesterol vom bereits in der Zelle vorhandenen Cholesterol unterscheiden zu können, werden die Zellen mit Natrium 2-¹³C-Acetat inkubiert, so dass durch den Einbau mehrerer isotopenmarkierter Acetatbausteine ¹³C-angereicherte Cholesterol-Isotope entstehen. Diese unterscheiden sich in der Masse von bereits vorhandenem unmarkierten Cholesterol. Durch Anwendung der *Mass Isotopomer Analysis* (ISA)¹⁶⁴ wird die Isotopenverteilung in Massenspektren analysiert und zwei verschiedene Parameter können erhalten werden. Einer davon beschreibt die Anreicherung des Precursors (2-¹³C-Acetat) während der andere Parameter den Gehalt des neu gebildeten Produkts (Cholesterol) anzeigt. Durch nicht-lineare Regression kann so eine genaue Aussage über die Cholesterolbiosyntheserate getroffen werden.¹⁶⁷ Aus einer Auftragung der prozentualen Inhibition bei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors gegen den Logarithmus der Konzentration kann der IC₅₀-Wert für die Cholesterol-Neusynthese extrapoliert werden. Mit Hilfe des *Bradford Assays* (Durchführung: Kapitel 6.3.6) kann zusätzlich der Proteingehalt aller Proben, der direkt mit der Biomasse korreliert, ermittelt und in die Berechnung der prozentualen Inhibition mit einbezogen werden. Diese Methode beruht auf einer Änderung des Absorptionsmaximums (470 nm → 595 nm) des Farbstoffs Coomassie Blue durch Bindung an Proteine.¹⁶⁸

Die Testergebnisse für diese Auswahl von Δ^{24} -Reduktase-Inhibitoren zeigen deutlich, dass die seitenkettenfunktionalisierten Sterole enormes Potential besitzen (Abbildung 98).

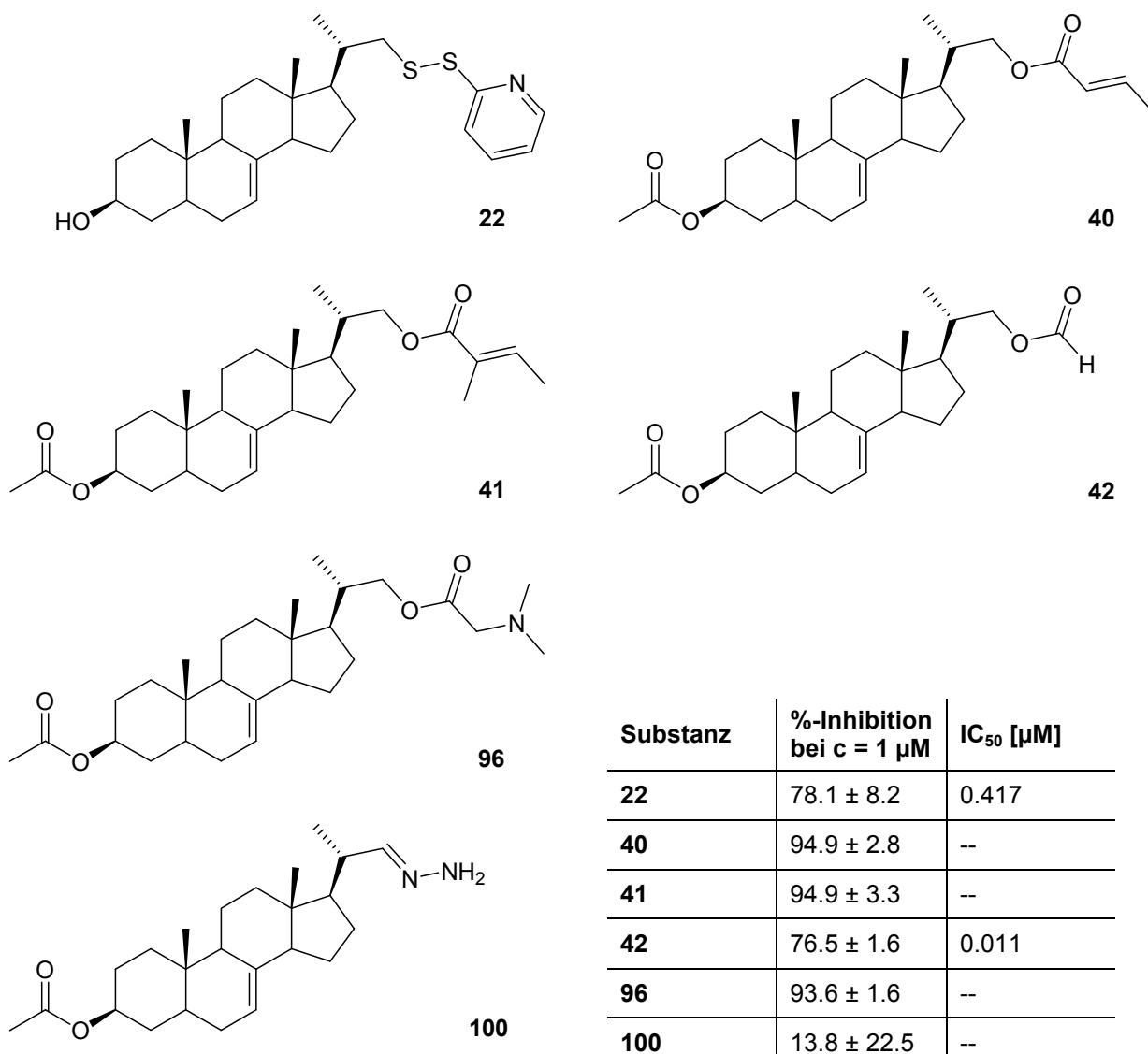


Abbildung 98: Testergebnisse der Aktivitätsbestimmung ausgewählter Inhibitoren

Ausser dem Hydrazon **100** konnte für alle Testsubstanzen eine prozentuale Inhibition der Cholesterolsynthese von mehr als 50 % gemessen werden. Wird in diesem Vortest eine prozentuale Inhibition von weniger als 50 % bestimmt, deutet das auf IC_{50} -Werte $> 1 \mu\text{M}$ hin, so dass eine genauere Bestimmung des IC_{50} -Wertes uninteressant ist. Ebenso wurde die Bestimmung des IC_{50} -Wertes für die beiden Ester **40** und **41** nicht durchgeführt, da sich für diese beiden Substanzen auch im Ergosterolsynthese-Assay eine Enzymhemmung nachweisen ließ, und diese Testsubstanzen somit nicht selektiv auf die Cholesterolsynthese wirken. Die Testung der prozentualen Inhibition der Gesamtcholesterolsynthese bei $1 \mu\text{M}$ zeigt allerdings, dass die zusätzliche Methylgruppe von **41** vermutlich keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität hat. Die beiden bestimmten Werte der

selektiv auf die Cholesterol-Biosynthese inhibierend wirkenden Testsubstanzen **42** und **22** deuten jedoch an, dass tatsächlich kleinere Seitenketten zu einer höheren Aktivität der Testsubstanz führen. So kann für das unsymmetrische Disulfid **22** ein IC₅₀ von 0.417 µM bestimmt werden, während der Ameisensäureester **42** mit einem IC₅₀-Wert von 11 nM ein deutlich besserer Inhibitor ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Als erstes Ziel dieser Arbeit sollten potentiell kovalent bindende Inhibitoren der 2,3-Oxidosqualencylase dargestellt werden. Als Grundlage hierfür wurden die Erkenntnisse einer Röntgenkristallstruktur der humanen OSC mit Lanosterol zu Rate gezogen, die die genauen Positionen der freien Thiolgruppen der Cysteine im aktiven Zentrum zeigt (Kapitel 2.1, Abbildung 25). Thiole sind Nukleophile, die mit einer Vielzahl verschiedenster Gruppen Reaktionen eingehen können (Abbildung 99). Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Funktionalitäten mit entsprechender Reaktivität in die Seitenkette von Sterolen eingeführt werden, wie Epoxide, Disulfide, Nitrile, Hydroxymethylpyrrole, *Michael*-Systeme oder Thioester.

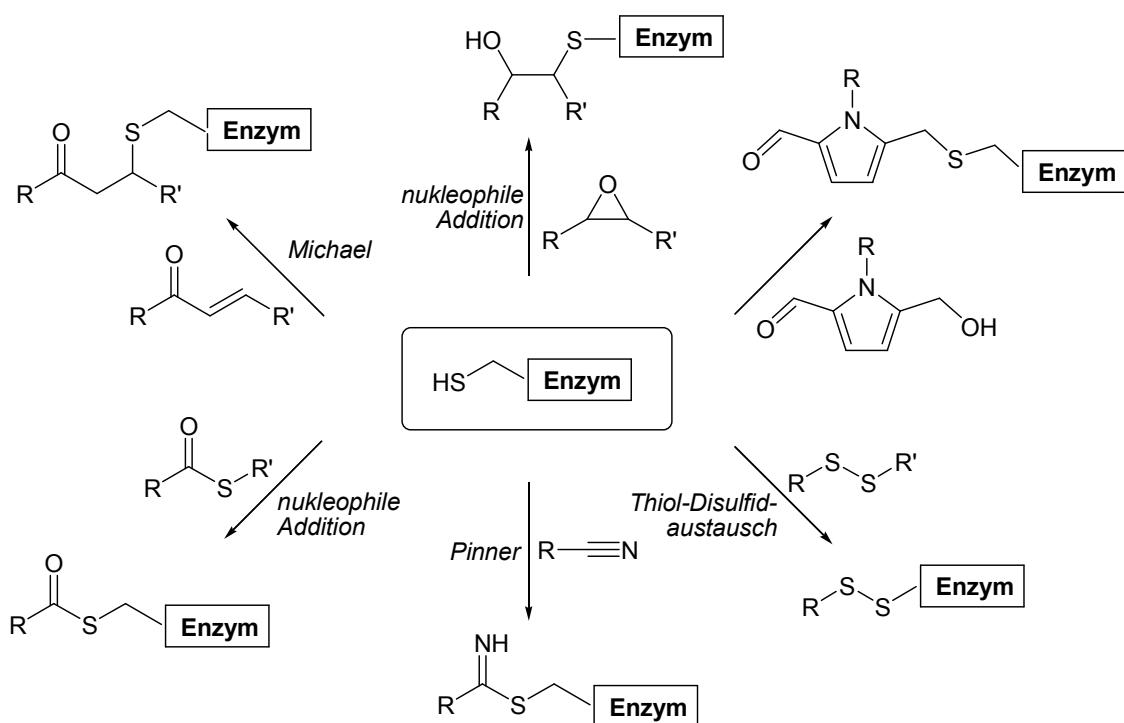


Abbildung 99: Reaktivität von Thiolgruppen (Auswahl)

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, potentielle Inhibitoren der C-22-Desaturase, eines Enzyms aus der Gruppe der Cytochrom P₄₅₀-Enzyme,

darzustellen. Als Grundlage für die Entwicklung dieser potentiellen Inhibitoren sollte die Fähigkeit bestimmter Gruppen, Metallionen zu komplexieren und damit Enzyme irreversibel zu inhibieren, genutzt werden. Dieses Konzept wurde früher bereits erfolgreich bei der Entwicklung von Inhibitoren verschiedener CYP-Enzyme genutzt, wie beispielsweise bei der Gruppe der Azol-Antimykotika.²⁴

Als letztes Ziel dieser Arbeit sollten schließlich noch verschiedene Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase dargestellt werden. Dafür wurden die Erkenntnisse aus den Dissertationen von *Giera*⁷⁴ und *Renard*⁷³ genutzt, die bereits verschiedene Sterole mit Carbonsäureamid-Gruppen in der Seitenkette als Inhibitoren dieses Enzyms darstellen konnten.

5.1 Synthesen

Es gelang im Rahmen dieser Arbeit, eine Vielzahl von potentiell gegenüber Thiolen reaktiven Gruppen in die Seitenkette von Sterolen zu integrieren. So konnten ausgehend vom bekannten Acetylthioderivat **9**⁷⁶ verschiedene unsymmetrische Disulfide (**22** - **26**) dargestellt werden, die mit Thiolen im Sinne eines Thiol-Disulfid-Austausches reagieren können (Abbildung 100).

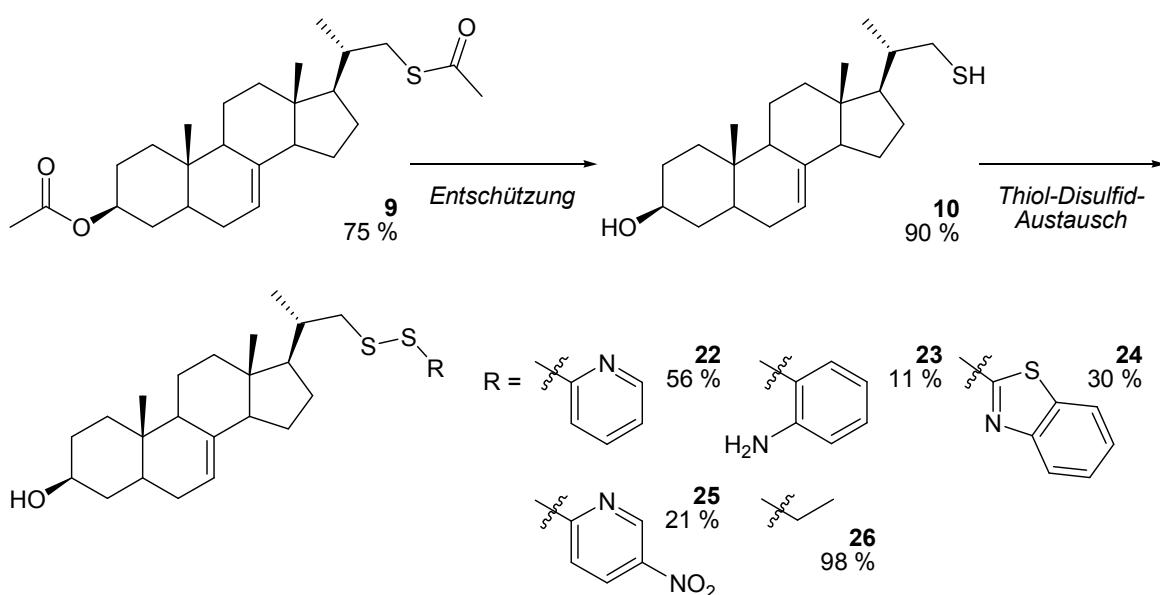


Abbildung 100: Synthese der unsymmetrischen Disulfide **22** - **26**

Ebenso gelang die Synthese eines homologen unsymmetrischen Pyridyldisulfids **32** ausgehend vom bekannten homologen Aldehyd **28**⁷³ in einen analogen Reaktionsweg (Abbildung 101).

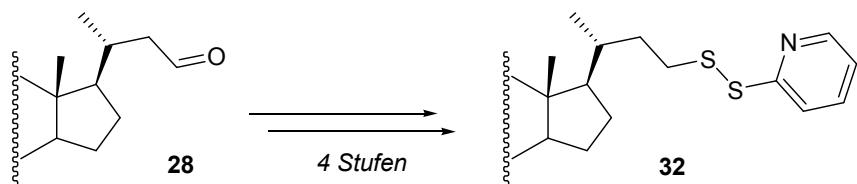


Abbildung 101: Synthese des unsymmetrischen Disulfids **32**

Die Reaktion des bekannten Säurechlorids **11** mit verschiedenen primären Thiolen in einer an *Tanabe et al.*¹⁰² angelehnten Vorschrift lieferte die Thioester **33** - **35**, die im Sinne des Additionsschrittes der nativen chemischen Ligation mit freien Thiolen reagieren können, in Ausbeuten von 56 bis 71 % (Abbildung 102).

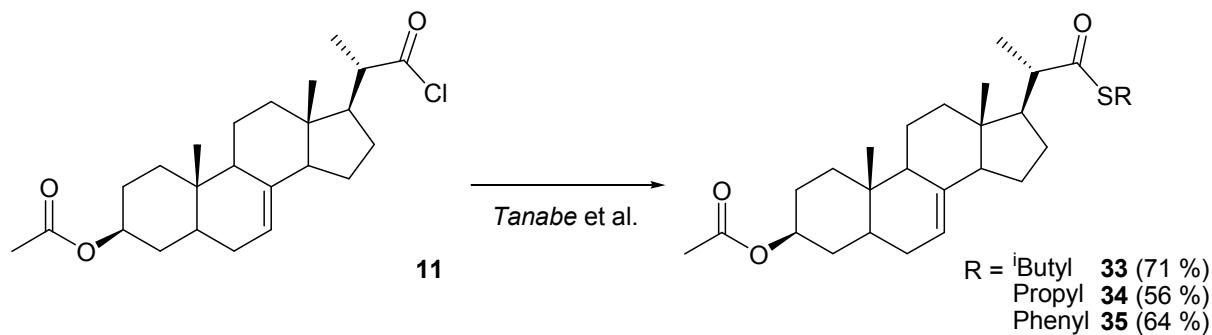


Abbildung 102: Synthese der Thioester **33** - **35**

Ferner sollten Steroide mit Epoxidgruppen, die durch Thiole nukleophil geöffnet werden können, dargestellt werden. Der Aldehyd **3** wurde mit dem *in situ* generierten Schwefelylid in einer *Corey-Chaykovsky*-Reaktion umgesetzt. Das in einer *Wittig*-Reaktion darstellbare ungesättigte Sterol **36** wurde mit *mCPBA* in einer *Prilezhaev*-Reaktion umgesetzt. In beiden Fällen konnten durch massenspektrometrische Analytik der Rohprodukte Hinweise auf das Vorliegen der Epoxide erhalten werden, eine Aufreinigung scheiterte jedoch an der Labilität der Produkte (Abbildung 103).

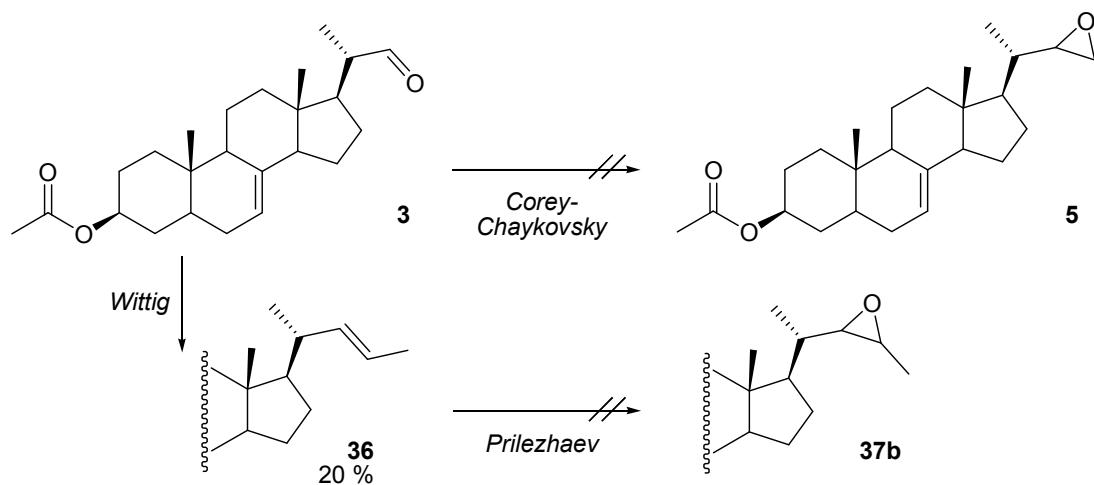


Abbildung 103: Synthese der Epoxide 5 und 37b

Nitrile, die in einer *Pinner*-Reaktion reversibel kovalent mit Thiolgruppen reagieren können, konnten erfolgreich dargestellt werden (Abbildung 104).

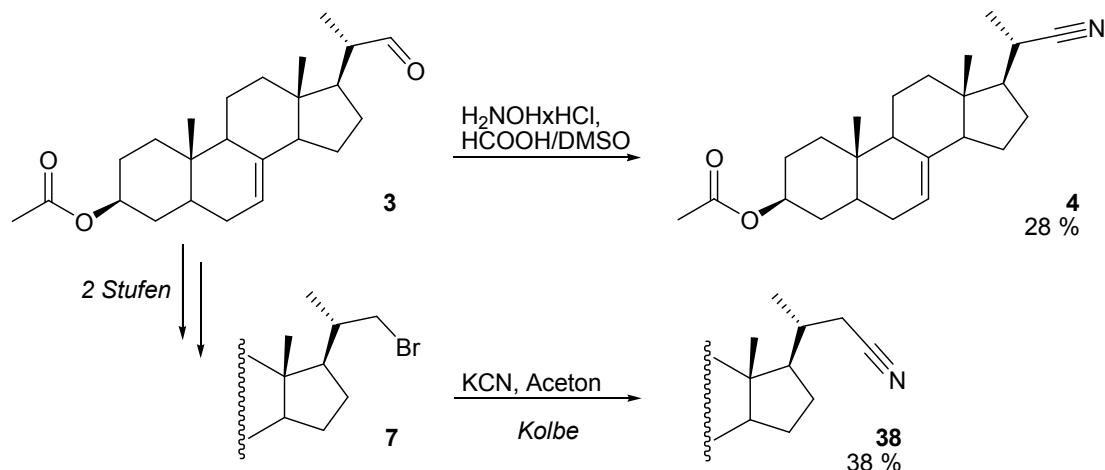


Abbildung 104: Synthese der Nitrile 4 und 38

Es gelang sowohl die Umsetzung des Aldehyds 3 mit Hydroxylamin-Hydrochlorid als auch die Synthese eines homologen Nitrils in einer *Kolbe*-Nitril-Synthese aus der Bromverbindung 7.

Ebenfalls erfolgreich war die Einführung diverser *Michaeli*-Systeme, die von Thiolen im Sinne der *Michaeli*-Addition angegriffen werden können. Es gelang die Veresterung des primären Alkohols 6 mit verschiedenen ungesättigten Säurechloriden bzw. der Tiglinsäure zu den vinylogen Estern 39 -41 (Abbildung 105).

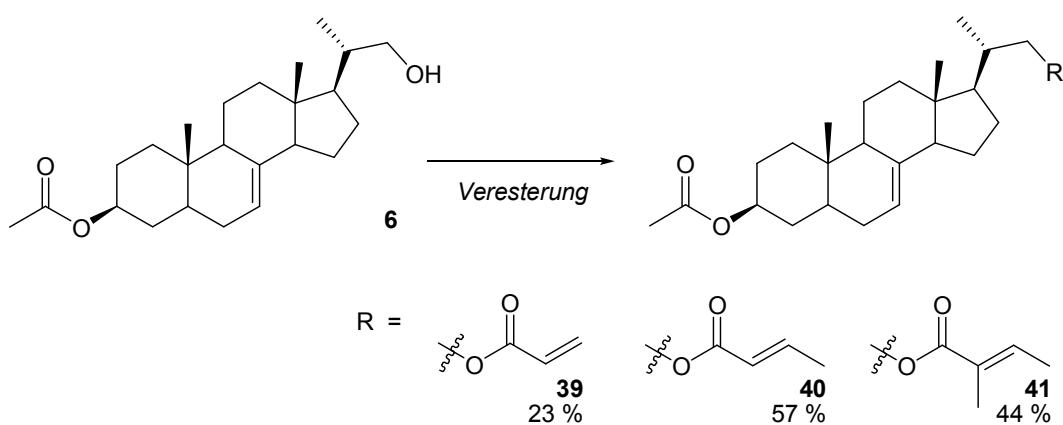


Abbildung 105: Synthese α,β -ungesättigten Ester **39 - 41**

Die Synthese von Fumarsäurederivaten gelang ausgehend von dem primären Alkohol **6** und den über reduktive Aminierung aus dem Aldehyd **3** zugänglichen Aminen **46** und **47**⁷³. Die Amidbindung konnte über *mixed anhydride coupling* der Amine mit Monoethylfumarat nach Optimierung der Reaktionsbedingungen in guten bis sehr guten Ausbeuten erreicht werden (Abbildung 106).

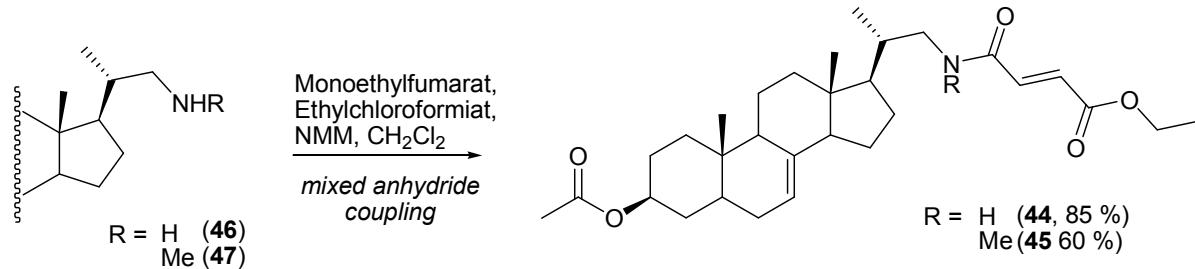


Abbildung 106: Synthese der Fumarsäurederivate **44** und **45**

Die Veresterung des Alkohols **6** zum Fumarsäurederivat **43** erfolgte in einer *Schotten-Baumann*-Reaktion (*Einhorn*-Variante) mit dem aus Monoethylfumarat in einer dreistufigen Synthese dargestellten Baustein **50** (Abbildung 107).

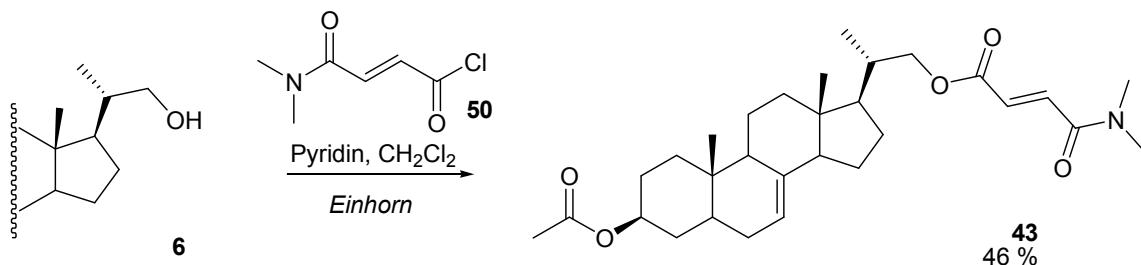


Abbildung 107: Synthese des Fumarsäurederivats 43

Zur Synthese des α,β -ungesättigten Ketons **12** wurde aus dem Säurechlorid **11** *in situ* ein Phosphorylid generiert, das mit Acetaldehyd in einer *Wittig*-Reaktion umgesetzt werden konnte. Das niedrigere Homologe mit freier 3-Hydroxy-Gruppe, das Vinylketon **54**, konnte aus dem TBDMS-geschützten Aldehyd **51** durch Addition von Vinylmagnesiumbromid, anschließende Oxidation des gebildeten sekundären Alkohols zum Keton und Entschützung an C-3 dargestellt werden (Abbildung 108).

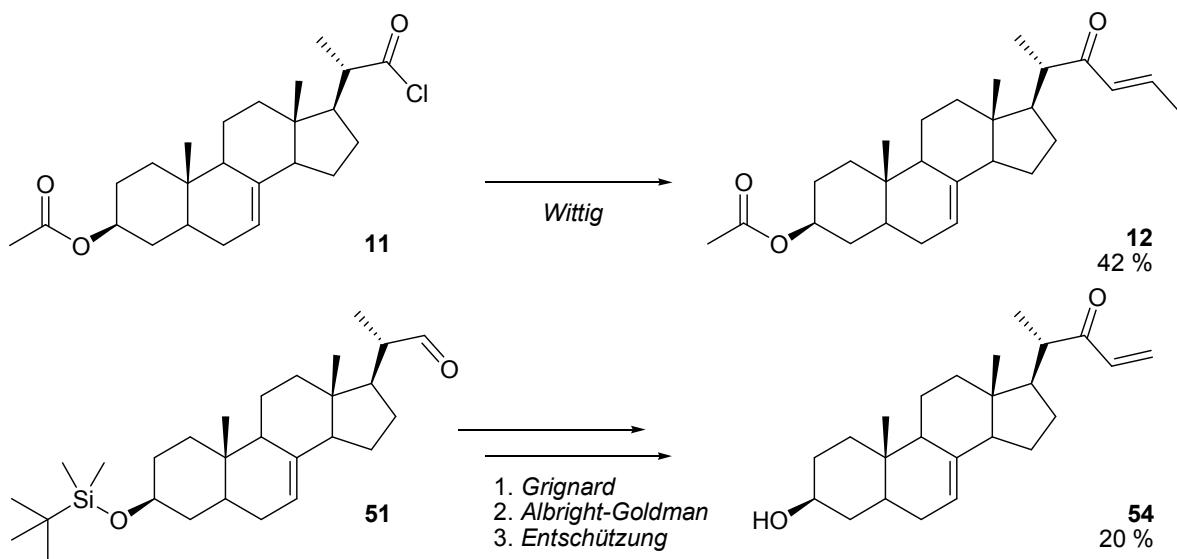


Abbildung 108: Synthese der α,β -ungesättigten Ketone **12** und **54**

Das dafür benötigte TBDMS-geschützte Edukt **51** konnte ausgehend von Ergosterol auf zwei unterschiedlichen Syntheserouten dargestellt werden (Abbildung 109). Die Schutzgruppe konnte auf der Stufe des Aldehyds **3** ausgetauscht werden durch eine alkalische Hydrolyse der Acetat-Schutzgruppe und nachfolgende Umsetzung zum TBDMS-Ether. In einem alternativen Reaktionsweg wurde die Δ^5 -Doppelbindung des

TBDMS-geschützten Ergosterols **77** hydriert zu **78**. Die nachfolgende Ozonolyse der Δ^{22} -Doppelbindung ergab ebenfalls den gewünschten Aldehyd **51**.

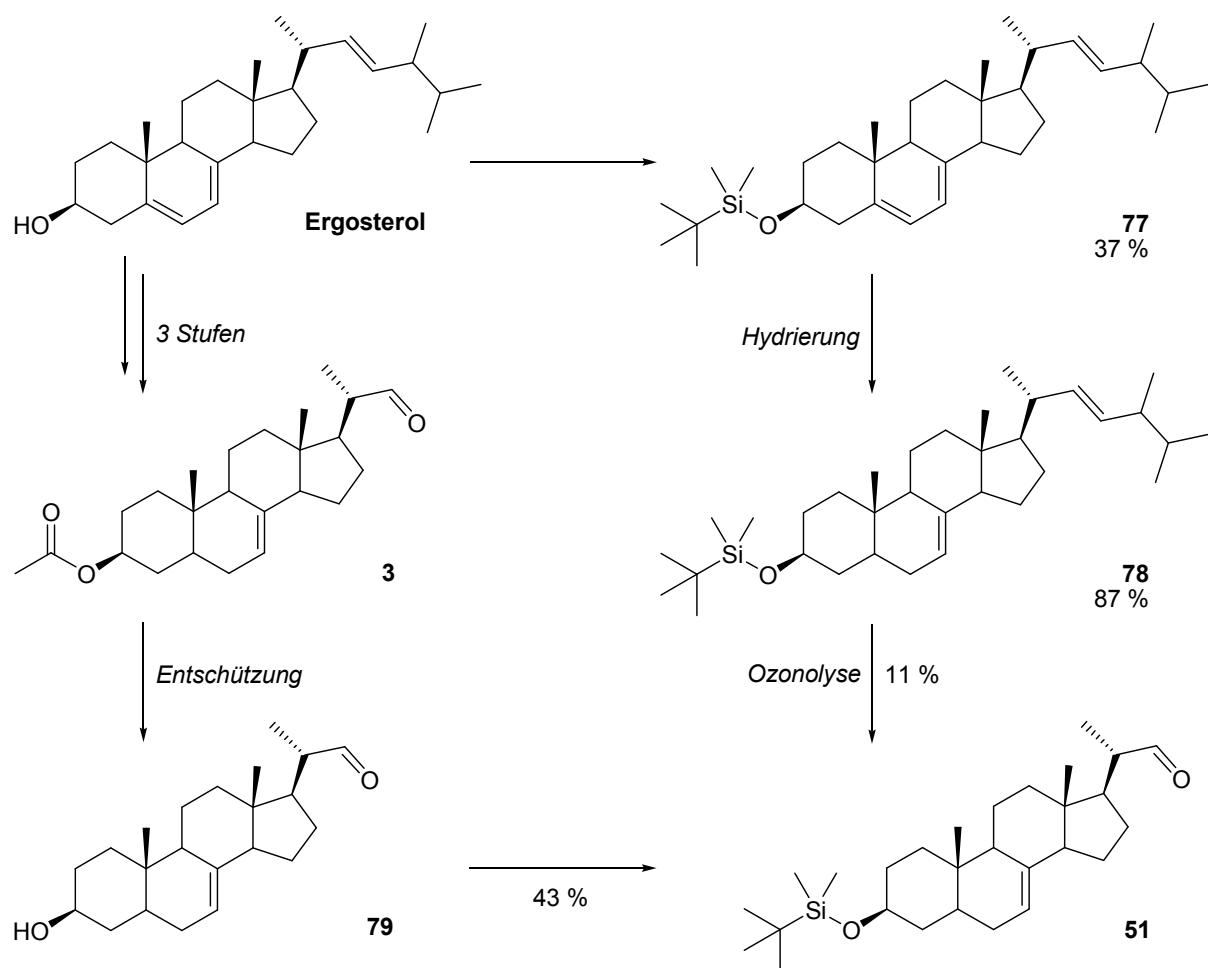


Abbildung 109: Synthese der TBDMS-geschützten Sterolderivate **77**, **78** und **51**

Die bekannte Reaktivität bestimmter 5-Hydroxymethylpyrrole gegenüber Thiolen veranlasste uns zur Synthese zweier unterschiedlich in der Sterolseitenkette angeknüpfter Pyrrolderivate. Die Synthese des *N*-alkylierten Pyrrols **14** konnte weder durch die Umsetzung des Pyrrols **16**¹²⁶ im Basischen mit den bekannten Halogeniden **7**⁷⁶ oder **57**⁸³ noch durch die Umsetzung mit Zwischenstufen der vierstufigen Synthese des Pyrrolbausteins **16** erreicht werden. Es gelang zwar die Synthese zweier *N*-Alkylpyrrole durch die Reaktion des Alkylbromids **7** mit Pyrrolbausteinen, allerdings nur in schlechten Ausbeuten. Die nachfolgend nötigen Umsetzungen zum gewünschten *N*-Alkylpyrrol **14** gelangen jedoch nicht. Die Synthese von **14** gelang letztendlich in schlechten Ausbeuten durch eine Umsetzung

des Alkylbromids **7** im Basischen mit dem Pyrrol **16** unter Phasentransferkatalyse (Abbildung 110).

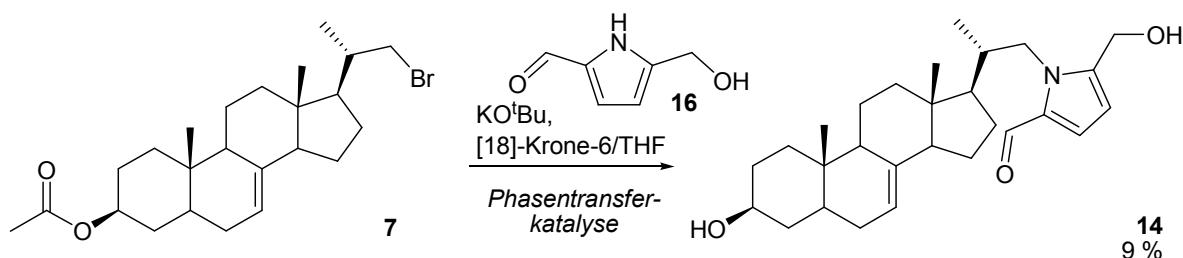


Abbildung 110: Synthese des *N*-alkylierten Hydroxymethylpyrrols **14**

Ein alternativ verknüpftes Pyrrol **15** war leider im Rahmen dieser Arbeit nicht zugänglich (Abbildung 111). Die *Stille*-Reaktion des Säurechlorids **11** mit dem Stannan **17**¹²⁹ gelang zwar in guter Ausbeute, allerdings konnte die Aldehydfunktion nicht chemoselektiv zum primären Alkohol reduziert werden. Die Reduktion der Aldehydfunktion des Stannans vor der *Stille*-Reaktion gelang ebenfalls nicht.

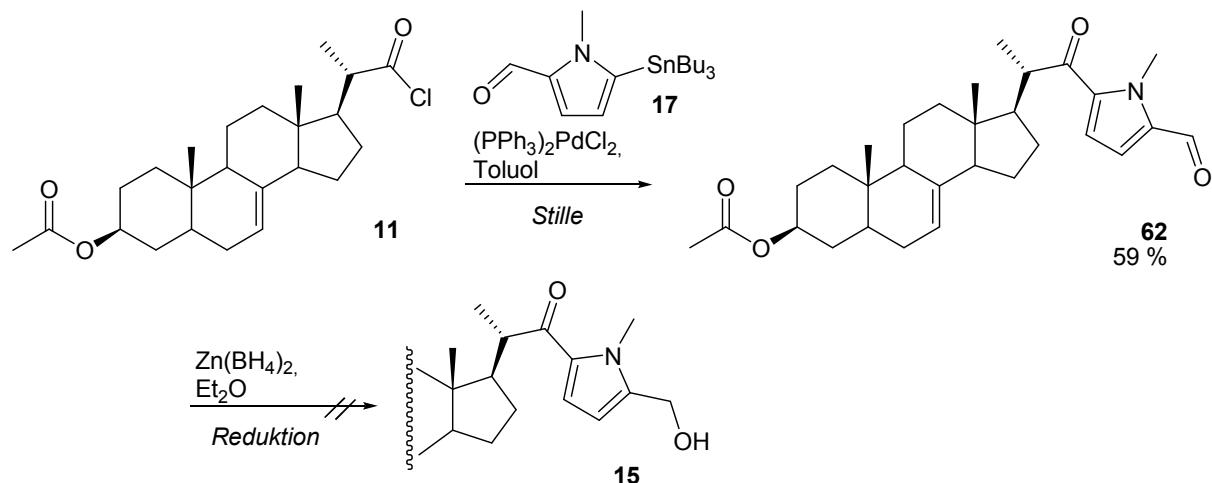


Abbildung 111: Versuche zur Synthese des Pyrrolderivats **15**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten ferner alternative 5-gliedrige Hydroxymethylheteroaromaten dargestellt werden und in Vortests unter physiologischen Bedingungen mit *N*-Acetylcystein hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber Thiolen getestet werden. Hierbei gelang es, eine Reihe verschiedener strukturverwandter Bausteine aus Furfural und Thiophen-2-carbaldehyd zugänglich zu machen (Abbildung 112). Im Testsystem konnte allerdings weder bei den

alkylierten Derivaten **65** und **66** noch bei den Propionylderivaten **74** und **75** eine Reaktion mit *N*-Acetylcystein nachgewiesen werden. Auch bei dem alternativen Pyrrolbaustein **76** konnte aufgrund der Labilität der Verbindung keine Reaktion mit *N*-Acetylcystein festgestellt werden, so dass darauf verzichtet wurde, die hier vorgestellten Heterozyklen in die Seitenkette eines Sterolgrundkörpers zu integrieren.

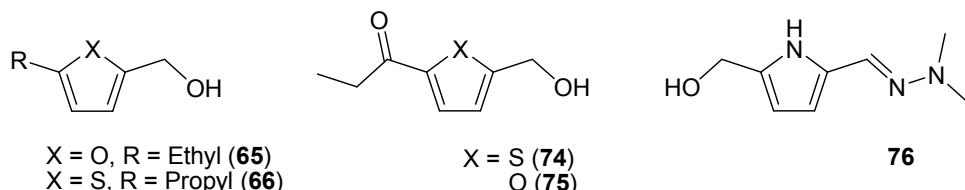


Abbildung 112: Synthese alternativer strukturverwandter 5-gliedriger Heteroaromaten

Von den geplanten Sterolen mit metallkomplexierenden Gruppen in der Seitenkette gelang die Darstellung eines *N*-alkylierten Imidazols **20** und eines *N*-alkylierten 1,2,4-Triazols **19** sowohl mit acetylgeschützter als auch freier Hydroxygruppe in Position 3 ausgehend vom Alkylbromid **7** (Abbildung 113).

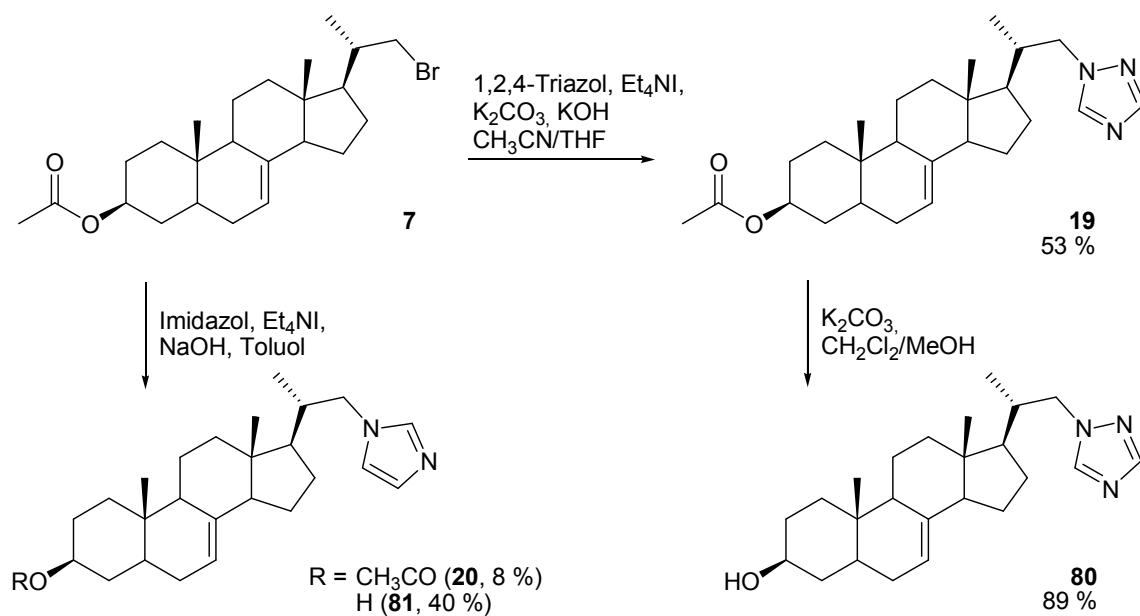


Abbildung 113: Synthese der *N*-alkylierten Imidazole **20** und **81** sowie der 1-alkylierten 1,2,4-Triazole **19** und **80**

Die Synthese eines in 2-Position alkylierten Imidazols gelang nicht in einer Radziszewski-Synthese direkt aus dem Aldehyd **3** (Abbildung 114). Eine alternative Strategie über die Synthese eines analogen Imidazolins **82**, das in einem weiteren

Schritt zum Imidazol dehydriert wurde führte zur gewünschten Zielverbindung **18**. Bei einem Versuch, das gewünschte Imidazolin aus dem Säurechlorid **11** zu erhalten, entstand nur das Amid **83**.

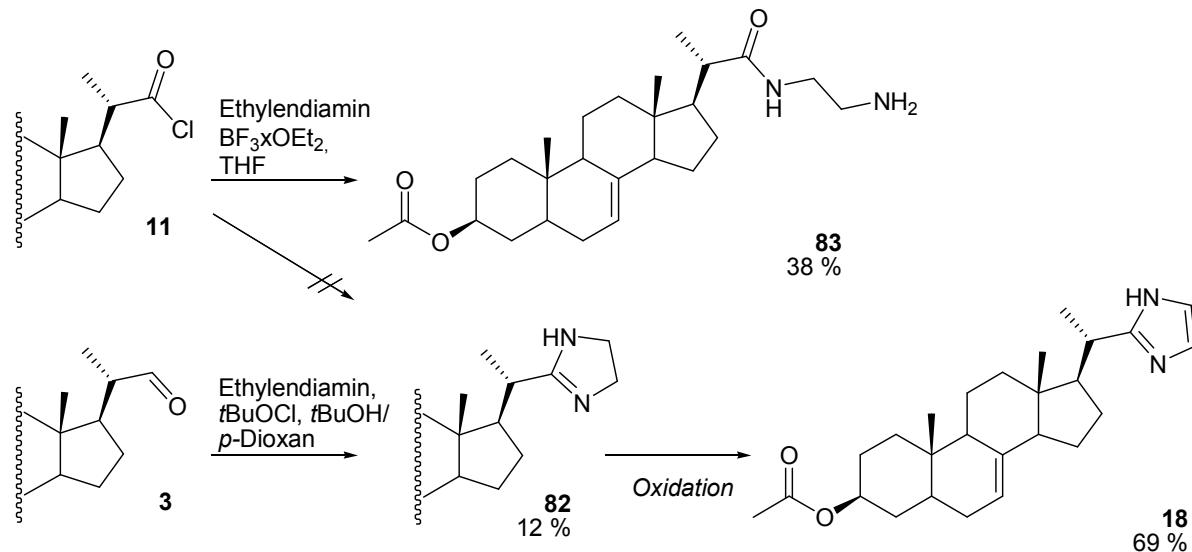


Abbildung 114: Synthese des 2-alkylierten Imidazols **18** und des Amids **83**

Die gewünschte Hydroxamsäure **21** konnte in einem Schritt aus der Carbonsäure **8** dargestellt werden (Abbildung 115). Die O-Alkylierung der Hydroxamsäure **21** gelang nicht, es konnte nur ein in signifikanten Mengen entstehendes Produkt, ein Methylester **86** mit freier Hydroxy-Gruppe an C-3, identifiziert werden. Die Darstellung der gewünschten O-alkylierten Hydroxamate konnte allerdings über eine Aktivester-Synthese ebenfalls ausgehend von der Carbonsäure **8** mit den entsprechenden Alkoxyamin-Hydrochloriden erreicht werden.

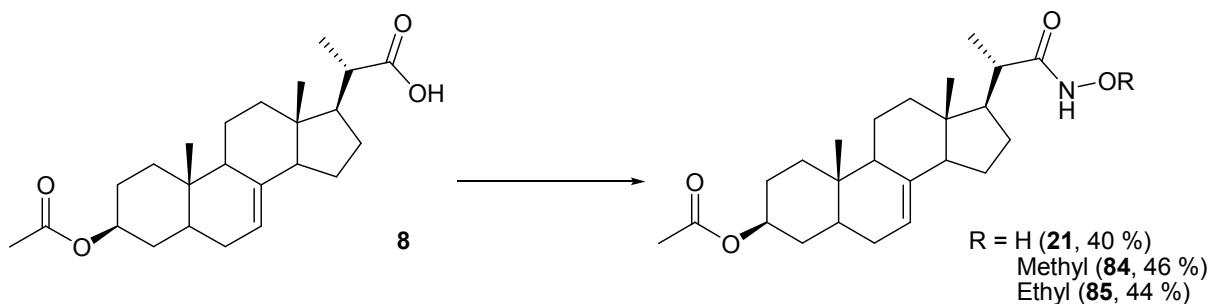


Abbildung 115: Synthese der Hydroxamate **21**, **84** und **85**

Als potentielle Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase wurden verschiedene Ester und Amide dargestellt. Ausgehend vom primären Alkohol **6** konnten die gesättigten Ester **87** und **88** in einer *Einhorn*-Variante der *Schotten-Baumann*-Reaktion dargestellt werden, sowie der Glycinester **96** mit zusätzlicher Aminfunktion in der Seitenkette über eine *Steglich*-Veresterung (Abbildung 116).

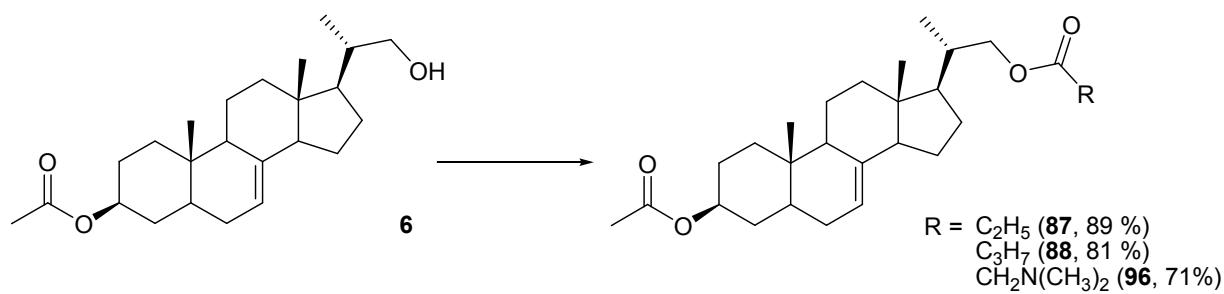


Abbildung 116: Synthese der Ester **86**, **87** und **96**

Ausgehend von der Carbonsäure **8** sowie dem Säurechlorid **11** konnten verschiedene Ester und Amide im Sinne der *Einhorn*-Variante der *Schotten-Baumann*-Reaktion dargestellt werden (Abbildung 117). Dabei entstand auch in signifikante Mengen das Nebenprodukt **99**, ein tertiäres Amid.

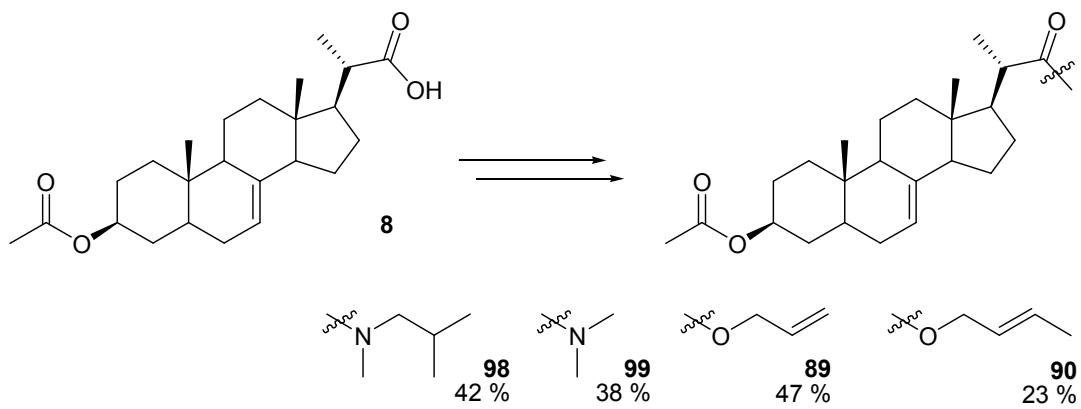


Abbildung 117: Synthese der Amide **98** und **99** sowie der Ester **89** und **90**

Inverse sekundäre und tertiäre Amide konnten problemlos durch Acylierung der Amine **46** und **47** mit Säurechloriden dargestellt werden (Abbildung 118).

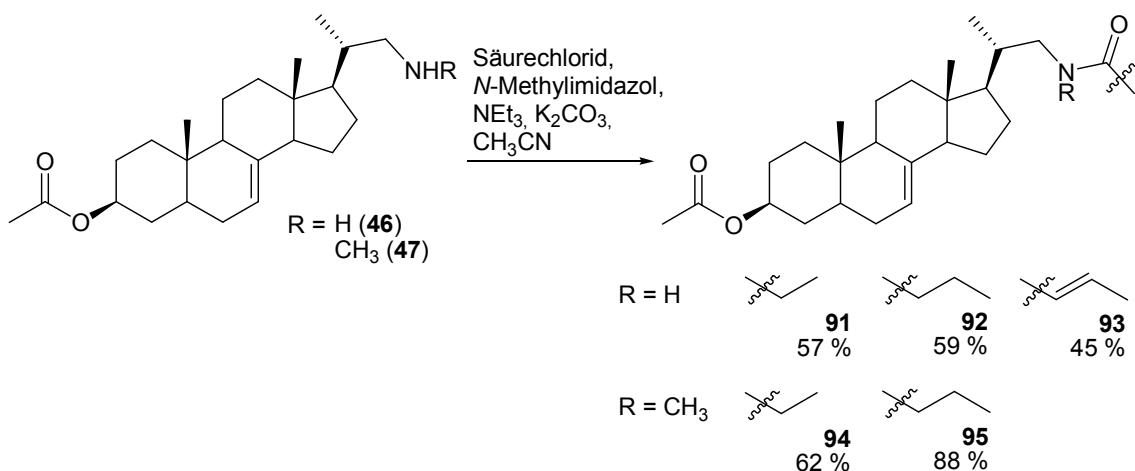


Abbildung 118: Synthese der Amide 91 - 95

5.2 Biologische Prüfung

Die Testung der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen gestaltete sich sowohl im Agar-Diffusionstest als auch im MTT-Test aufgrund von Löslichkeitsproblemen in den zu verwendenden Lösungsmitteln oder auch Testmedien sehr schwierig. Eine große Anzahl konnte nicht in der erforderlichen Konzentration gelöst werden oder fiel beim Eintragen in die Testsysteme wieder aus. So konnten mit Hilfe des Agar-Diffusionstest nur drei Substanzen als potentiell antimikrobiell aktiv charakterisiert werden. Unter diesen Substanzen befanden sich ein sekundäres Amid mit einer zusätzlichen protonierbaren primären Aminfunktion **83** sowie das Imidazolin **82** und das *N*-Alkylimidazol **81**. Die Ergebnisse der MTT-Testungen deuten darauf hin, dass die getesteten Verbindungen dieser Arbeit keine nennenswerte Toxizität zeigen.

Da die benötigten Konzentrationen im arbeitskreisinternen Ergosterol- bzw. Cholesterolbiosynthese-Assay deutlich niedriger sind, konnten diese Testungen erfolgreich durchgeführt werden. Im Ergosterolbiosynthese-Assay zeigte sich, dass die getesteten Substanzen kaum antimykotische Aktivität durch Inhibition der Ergosterolbiosynthese haben. Einige Verbindungen wirken zwar auf die Ergosterolbiosynthese, allerdings nur in wenigen Fällen enzymespezifisch und oft nur auf einen der drei getesteten Keime.

Vor allem im Cholesterolbiosynthese-Assay zeigte sich, dass eine Reihe der getesteten Verbindung selektiv die Δ^{24} -Reduktase inhibiert, ein Enzym, das in der Ergosterolbiosynthese nicht vorkommt. Dazu gehören die unsymmetrischen Disulfide einschließlich der Schwefel enthaltenden Vorstufen, einige Azole sowie einige Vertreter der dargestellten Seitenkettenester und -amide.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die dargestellten Verbindungen dieser Arbeit, trotz der Einführung potentiell gegenüber Cysteinresten reaktiver Gruppen in die Seitenkette, nicht den gewünschten inhibitorischen Effekt auf die Oxidosqualecyclasen zeigen. Ebensowenig konnte durch das Einführen metallchelatisierender Reste eine Inhibition des CYP-Enzyms C-22-Desaturase erreicht werden. Allerdings konnte eine Reihe selektiver Δ^{24} -Reduktase-Inhibitoren dargestellt werden, die deutlich einige strukturelle Anforderungen an Inhibitoren dieses Enzyms aufzeigen. So scheint vor allem der Bereich der Seitenkette, der relativ nah am Grundgerüst liegt von enormer Bedeutung zu sein. Ebenso werden größere Alkylreste nicht toleriert, aromatische Reste, die durch eine gewisse Distanz vom Sterolgrunkörper entfernt sind, hingegen schon. Weiterhin lassen sich Effekte durch Position und Vorhandensein von Carbonylgruppen, Doppelbindungen oder protonierbaren Gruppen ablesen.

Einige Vetreter dieser Inhibitoren der humanen Δ^{24} -Reduktase, und damit der Cholesterolbiosynthese, zeigen keinen Effekt auf die Ergosterolbiosynthese und wirken ebenfalls weder antimikrobiell noch zytotoxisch. Dies zeigt die beachtliche Selektivität dieser Inhibitoren.

Für einige Vertreter wurde hier zusätzlich die prozentuale Inhibition der Gesamtcholesterolbiosynthese bei einer Konzentration des Inhibitors von 1 μM bestimmt. Für die selektiven Inhibitoren **22**, ein unsymmetrisches Disulfid, und **42**, einen Ameisensäureester, wurden zusätzlich die IC_{50} -Werte bestimmt (Abbildung 119).

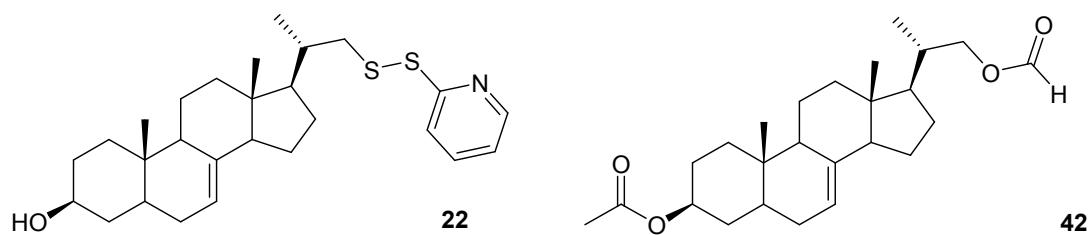


Abbildung 119: Selektive Inhibitoren der humanen Δ^{24} -Reduktase (Auswahl)

Das Disulfid **22** zeigte einen IC_{50} -Wert von 419 nM, der ebenfalls enzymspezifische Inhibitor der Cholesterolbiosynthese **42** sogar im niedrigen nanomolaren Bereich (11 nM). **42** ist also ein äußerst potenter, untoxischer enzymspezifischer Inhibitor der Cholesterolbiosynthese.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Geräte und Parameter

a) Lösungsmittel und Reagenzien

Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Acros (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) und Fisher Chemical (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) bezogen und generell ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Lösungsmittel wurden in p.a.-Qualität verwendet oder unter Stickstoff über geeigneten Trocknungsmitteln destilliert.¹⁶⁹

b) Ozon-Generator

Zur Ozonolyse wurde ein Ozonova Typ OG700-10WC (Jeske Ozontechnik, Rudersberg, Deutschland) verwendet.

c) Chromatographische Verfahren

Die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurde mit DC-Polyester-Fertigfolien Polygram[®] SIL G/UV₂₅₄ (Beschichtung: 0.2 mm Kieselgel, Format: 40 x 80 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Betrachten unter UV-Licht bei einer Wellenlänge $\lambda = 254$ nm und/oder durch Verwendung des Sprühreagenzes Cersulfat/Ammoniummolybdat-Lösung und Hitze.

Die präparative Dünnschichtchromatographie wurde mit F₂₅₄-Glasplatten (Beschichtung: 0.6 mm Kieselgel, Format 20 x 20 cm) der Firma Merck (Darmstadt,

Deutschland) durchgeführt. Hier erfolgte die Detektion ausschließlich mittels UV-Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm.

Die säulenchromatographische Reinigung der Rohprodukte erfolgte durch manuelle Säulenchromatographie (SC). Als Sorbens wurde Kieselgel 60 der mittleren Korngröße 0.040-0.063 mm der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die verwendeten Elutionssysteme sind in den Synthesevorschriften der einzelnen Verbindungen angegeben, wobei es sich bei den angegebenen Mischungsverhältnissen um Volumenanteile handelt.

d) Analytische Techniken

- Schmelzpunkte**

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mittels des Schmelzpunktbestimmungsgerätes Melting Point B-540 (Fa. Büchi, Flawil, Schweiz). Die Werte wurden nicht korrigiert.

- Infrarotspektroskopie**

Feststoffe wurden als KBr-Pressling, ölige bzw. flüssige Substanzen als Film zwischen NaCl-Fenstern mit den IR-Spektrometern Perkin-Elmer FT-IR Paragon 1000 (Fa. Perkin-Elmer, Waltham, USA) und Jasco FT-IR 410 (Jasco, Easton, USA) vermessen.

- Massenspektrometrie**

Die niederauflösenden Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer Hewlett Packard 5989A (Fa. Agilent Technologies, Palo Alto, USA) mit folgenden Techniken aufgenommen: Elektronenstoß-Ionisation (EI) bei 70 eV Anregungsenergie bzw. Chemische Ionisation (CI) mit Methan als Reaktanden gas. Die hochauflösenden Massenspektren wurden mit dem GC/MS-System JMS-GCmate II (Jeol, Tokio, Japan) mittels Elektronenstoß-Ionisation bestimmt.

- **Elementaranalyse**

Die Bestimmung der elementaren Zusammensetzung der Verbindungen wurde mit einem CHN-Elementaranalysator vario MICRO bzw. einem vario EL (beides: Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Deutschland) durchgeführt.

- **Kernresonanzspektroskopie**

Die NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern Jeol Eclipse+400 (^1H -NMR: 400 MHz, ^{13}C -NMR: 100 MHz) Jeol Eclipse+500 (^1H -NMR: 500 MHz, ^{13}C -NMR: 125 MHz) aufgenommen (beides: Fa. Jeol, Peabody, USA). Diese Kernresonanzspektrometer kamen ebenfalls bei DEPT-, HH-COSY-, CH-COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren zum Einsatz. Die angegebenen Zahlenwerte beziehen sich auf die δ -Skala mit Tetramethylsilan (TMS) als internem Standard ($\delta = 0.00$ ppm) bzw. dem Signal des Restlösungsmittels.¹⁷⁰ Die chemischen Verschiebungen (δ) werden in ppm, die Kopplungskonstanten (J) in Hz angegeben. Als Lösungsmittel wurden CDCl_3 , DMSO-d_6 oder Methanol- d_4 verwendet.

- **Polarimetrie**

Die Bestimmung der spezifischen Drehung erfolgte mittels eines Perkin Elmer Polarimeters 241 MC (Perkin Elmer, Waltham, USA). Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in Dichlormethan (Schichtdicke $l = 10$ cm) für eine Wellenlänge von $\lambda = 589.3$ nm (Natrium-D-Linie). Die Konzentration der Proben wird in g/mL angegeben.

- e) **Geräte zur Biologischen Prüfung**

- **Sterilbank**

Zur biologischen Testung wurde ein Laminar Air Flow (Heraeus/Kendro, Berlin, Deutschland) verwendet.

- **UV-Spektrophotometer**

Verwendet wurde ein Dynex MRX II (Dynex Technologies GmbH, Denkendorf, Deutschland).

- **Zentrifuge**

Verwendung fand eine Eppendorf 5415 D (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

f) Software

Es wurde Office XP (Fa. Microsoft, Redmond, USA), ISIS™/Draw (MDL Information Systems, San Diego, USA), ChemOffice 2006 sowie ChemDraw Ultra 10.0 (Fa. CambridgeSoft, Cambridge, UK), MestReNova 5.1.1. (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien) und Dynex Revelation Version 4.06 verwendet.

g) Nomenklatur

Die Nomenklatur der synthetisierten Sterol-Derivate entspricht der üblichen Nummerierung des Sterolgrundkörpers nach IUPAC (Abbildung 120).

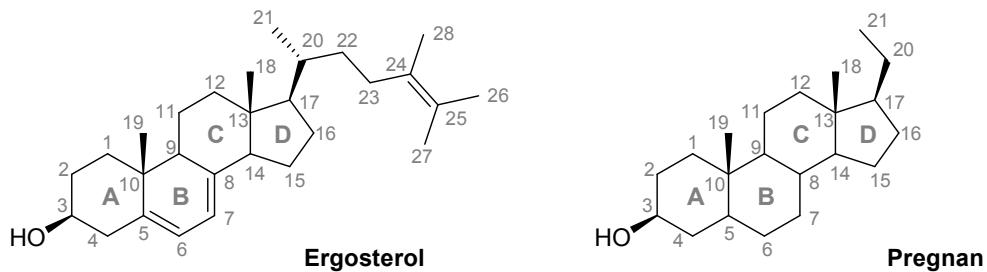


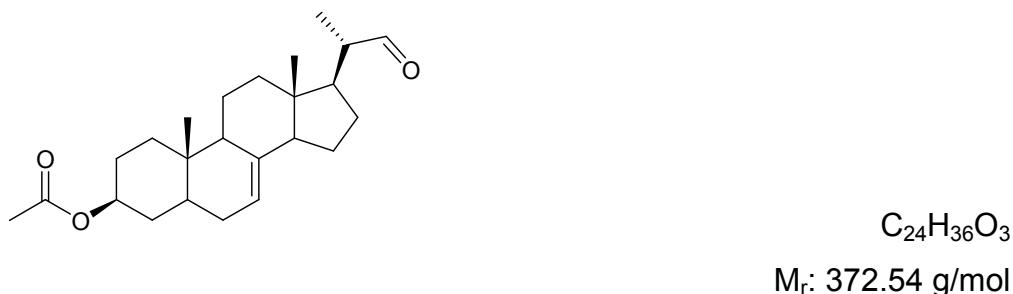
Abbildung 120: Übliche Nummerierung von Sterolen nach IUPAC am Beispiel von Ergosterol und Pregnan

Die Nummerierung weiterer Substituenten wird durch Einfügen eines Apostrophs gekennzeichnet und explizit in den einzelnen Synthesevorschriften angegeben.

Diastereotope Protonen werden in der Auswertung der NMR-spektroskopischen Daten mit **d** bzw. **d'** gekennzeichnet. Bei einer Zuordnung der räumlichen Position der Protonen bezüglich des Sterolgrundkörpers werden diese mit **a** (axial) bzw. **e** (äquatorial) gekennzeichnet.

6. 2. Synthesevorschriften

6.2.1 (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (3)



Modifizierte Synthesevorschrift zur Darstellung des Aldehyds **3**^{82, 83, 171}:

Eine Lösung von 5 α ,6-Dihydroergosterylacetat (**2**, 4.40 g, 10.0 mmol) und Pyridin (5.0 mL) in Dichlormethan (1000 mL) wird auf -70 °C gekühlt. Ozon wird eingeleitet (10 min, 40 L/h, 0.8 V, 16 mmol). Nach weiteren 2 min Rühren bei -70 °C wird MeOH (50 mL) und Dimethylsulfid (1.5 mL) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht auf RT erwärmt. Die Lösung wird im Vakuum aufkonzentriert und säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 95:5 → 85:15) aufgereinigt. Der Aldehyd **3** wird als weißer Feststoff (1.30 g, 3.5 mmol, 35 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 139 °C (Literatur: 136 - 138 °C¹⁷¹)

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -20.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 9.58 (d, $^3J_{\text{H-1'-H20}} = 3.2$ Hz, 1H, H-1'), 5.18 (m, 1H, H-7), 4.69 (m, 1H, H-3), 2.36 (m, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH_3CO), 1.96-1.20 (m, 20H), 1.11 - 1.03 (m, 1H, H-1d), 1.01 (d, $^3J_{\text{H21-H20}} = 6.8$ Hz, 3H, H-21), 0.82 (s, 3H, H-19), 0.57 (s, 3H, H-18).

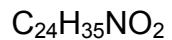
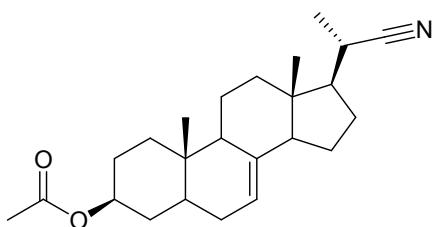
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 204.9 (CHO), 170.7 (CH_3CO), 138.7 (C-8), 118.0 (C-7), 73.4 (C-3), 54.3 (C-14), 51.0 (C-17), 49.8 (C-20), 49.3 (C-9), 43.9 (C-13), 40.0 (C-5), 39.2 (C-12), 36.8 (C-1), 34.2 (C-10), 33.8 (C-4), 29.5 (C-6), 27.5

(C-2), 26.8 (C-16), 23.3 (C-15), 21.4 (C-11 + CH₃CO), 13.6 (C-21), 12.9 (C-19), 12.3 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 373 (10, [M+1]⁺), 314 (60, [M-CH₃COOH+1]⁺)

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten^{82,83,171} überein.

6.2.2 (3S,20S)-20-Cyanopregn-7-en-3-ylacetat (4)



M_r: 369.54 g/mol

(3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (**3**, 150 mg, 0.40 mmol) und Hydroxylamin-Hydrochlorid (28 mg, 0.40 mmol) werden in Ameisensäure (0.3 mL) suspendiert und 30 min zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird mit 5%-iger wässriger Natronlauge neutralisiert. Die Suspension wird mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt und das daraus resultierende Rohprodukt säulen-chromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1 → 4:1) aufgereinigt. Das Nitril **4** wird als gelblich-weißer Feststoff (37 mg, 0.11 mmol, 28 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 155 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 10.0^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2947 (C-H), 2897 (C-H), 2278 (C≡N), 1732 (C=O), 1473 (Alkyl), 1448 (Alkyl), 1378 (Alkyl), 1364 (Alkyl), 1242 (C-O), 1028 (C=C-H)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.20 - 5.10 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.2 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.8 Hz, 1H, H-3), 2.46 - 2.29 (m, 1H, H-20), 2.03 (s, 3H, CH₃CO), 2.01 - 1.95 (m, 1H, H-12d), 1.88 - 1.23 (m, 22H), 1.11 (d, ³J_{H21-20} = 6.7 Hz, 3H, H-21), 0.92 - 0.87 (m, 1H, H1d), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.57 (s, 3H, H-18).

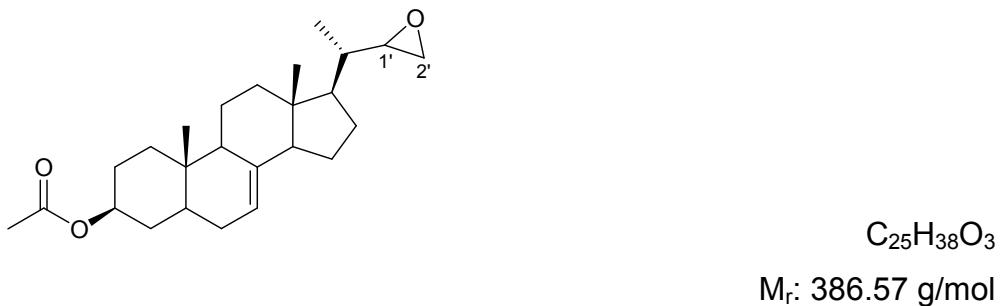
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 170.9 (CH₃CO), 157.1 (CN), 139.0 (C-8), 118.0 (C-7), 73.6 (C-3), 54.9 (C-14), 53.9 (C-17), 49.3 (C-9), 43.7 (C-13), 40.1 (C-5), 39.3 (C-12), 37.5 (C-20), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.4 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 18.2 (C-21), 13.1 (C-19), 12.3 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 370 (94, [M+1]⁺), 328 (10, [M-C₂H₂O+1]⁺), 310 (100, [M-CH₃COOH+1]⁺)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 369 (35, [M]⁺•), 309 (26, [M-CH₃COOH]⁺•), 294 (100, [M-CH₃COOH-CH₃]⁺•)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = gem.: 369.2627 (100, ber. für. C₂₄H₃₅NO₂: 369.2668)

6.2.3 (3S,20S)-20-Oxiranylpregn-7-en-3-ylacetat (5)



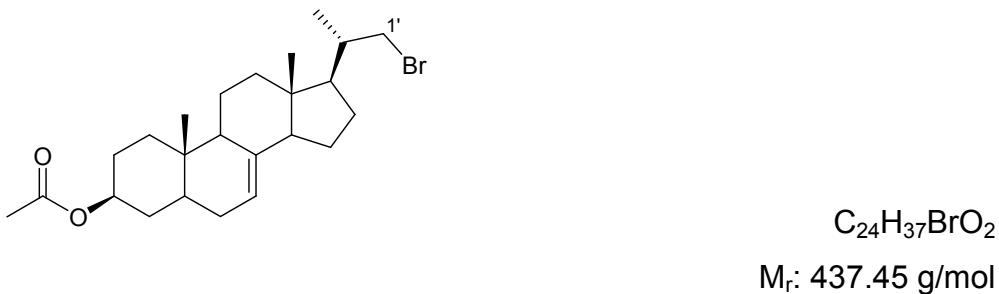
Dimethylsulfat (51 μ L, 68 mg, 0.54 mmol) und DMSO (38 μ L, 42 mg, 0.54 mmol) werden 24 h bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT werden (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (**3**, 200 mg, 0.54 mmol), ^tBuOH (27 μ L), Dichlormethan

(270 μ L), Wasser (11 μ L) und Kaliumhydroxid (75 mg, 1.34 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 7 h zum Rückfluss erhitzt. Die abgekühlte Lösung wird mit Wasser (5 mL) verdünnt und mit Dichlormethan extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt.

Massenspektrometrische Analytik des Rohprodukts:

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 387 (8, $[\text{M}+1]^+$), 373 (50, $[\text{M}-\text{CH}_2+1]^+$), 343 (20, $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}+1]^+$), 327 (12, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$), 313 [100, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_2+1]^+$],

6.2.4 (3S,20S)-20-Brommethylpregn-7-en-3-ylacetat (7)



Modifizierte Synthesevorschrift zur Darstellung des Alkylbromids **7**⁷⁶:

Zu einer Lösung von (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 100 mg, 0.27 mmol) und Tetrabrommethan (96 mg, 0.29 mmol) in Dichlormethan (2.0 mL) wird Triphenylphosphin (76 mg, 0.29 mmol) unter Schutzgas portionsweise bei 0 °C zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei 0 °C und 16 h bei RT gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird das verbleibende gelbe Öl säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 95:5 → 4:1) aufgereinigt und **7** als weißer Feststoff (70 mg, 0.16 mmol, 60 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 167 °C

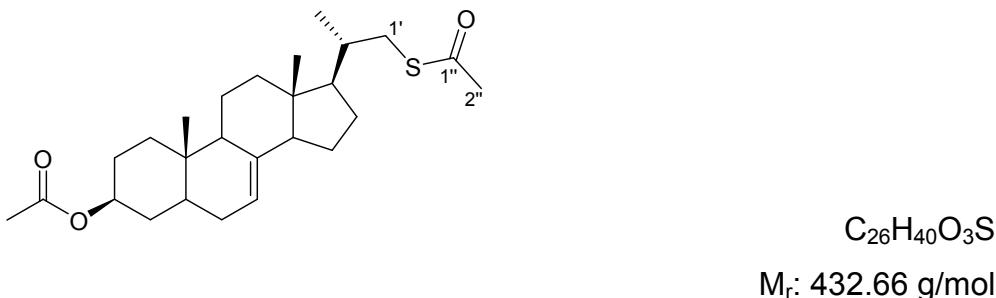
Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 6.6^\circ$ ($c = 5 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.14 (m, 1H, H-7), 4.68 (m, 1H, H-3), 3.43 (dd, $^2J_{H1'd'-H1'd}$ = 9.6 Hz, $^3J_{H1'd'-H20}$ = 2.4 Hz, 1H, H-1'd'), 3.29 (dd, $^2J_{H1'd-H1'd'}$ = 9.6 Hz, $^3J_{H1'd-H20}$ = 5.7 Hz, 1H, H-1'd), 2.02 (s, 3H, CH₃CO), 1.95 (ddd, $^3J_{H12a-H11a}$ = 12.6 Hz, $^2J_{H12a-H12e}$ = 3.6 Hz, $^3J_{H12a-H11e}$ = 3.0 Hz, 1H, H-12a), 1.08-1.98 (m, 19H), 1.03 (d, $^3J_{H21-H20}$ = 6.4 Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.56 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 170.7 (CH₃CO), 139.1 (C-8), 117.6 (C-7), 73.4 (C-3), 55.3 (C-17), 54.6 (C-14), 49.1 (C-9), 43.3 (C-13), 40.0 (C-5), 39.1 (C-12), 37.4 (C-20), 36.8 (C-1), 34.1 (C-10), 33.4 (C-4), 29.6 (C-6), 27.4 (C-2), 27.3 (C-16), 22.8 (C-15), 21.5 (C-11), 21.4 (CH₃CO), 20.9 (C-21), 20.9 (C-1'), 12.9 (C-19), 12.5 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 439/437 (5/8, [M+1]⁺), 379/377 (78/100, [M-CH₃COOH+1]⁺), 357 (24, [M-HBr+1]⁺, 297 (24, [M-CH₃COOH-HBr+1]⁺)

6.2.5 (3S,20S)-20-(Acetylthiomethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (9)



Zu einer Lösung von (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 100 mg, 0.27 mmol) und Triphenylphosphin (140 mg, 0.53 mmol) in THF (1.5 mL) wird Thioessigsäure (38 μ L, 41 mg, 0.53 mmol) und anschließend DIAD (106 μ L, 108 mg, 0.53 mmol) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt und das daraus resultierende Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1 \rightarrow 4:1) aufgereinigt. Das Produkt **9** fällt als gelblich-weißer Feststoff (87.7 mg, 0.20 mmol, 75 %) an.

Schmelzpunkt: 177 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +32.0^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2948 (C-H), 2869 (C-H), 2850 (C-H), 2800 (C-H), 1733 (C=O Ester), 1683 (C=O Thioester), 1469 (Alkyl), 1445 (Alkyl), 1366 (Alkyl), 1248 (C-O) 1240 (C-O), 1136 (C-O), 1032 (C-O), 950 (C=C-H), 627 (C=C-H)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.20 - 5.10 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.3 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.6 Hz, 1H, H-3), 3.17 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 13.2 Hz, ³J_{H1'd-H20} = 2.9 Hz, 1H, H-1'd), 2.58 (dd, ²J_{H1'd'-H1'd} = 13.2 Hz, ³J_{H1'd'-H20} = 8.5 Hz, 1H, H-1'd'), 2.33 (s, 3H, CH₃COSR), 2.03 - 2.01 (m, 3H, CH₃COOR), 2.00 - 1.89 (m, 2H, H-12d, H-2d), 1.87 - 1.18 (m, 18H), 1.17 - 1.07 (m, 1H, H-1d), 0.98 (d, ³J_{H21-H20} = 6.6 Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.53 (s, 3H, H-18).

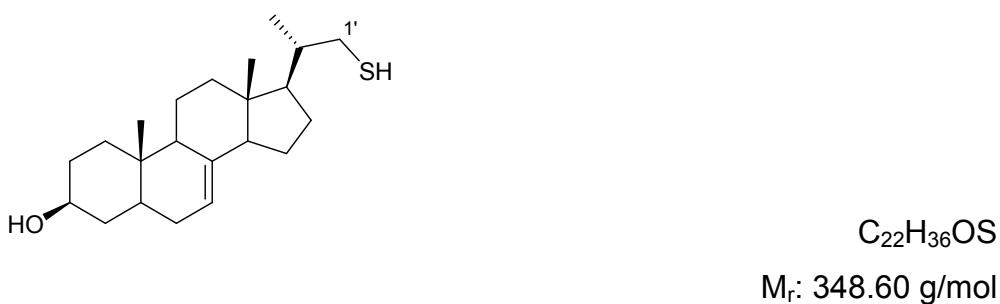
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 196.3 (C-1''), 170.9 (CH₃COO), 139.3 (C-8), 117.8 (C-7), 73.5 (C-3), 55.5 (C-17), 54.9 (C-14), 49.3 (C-9), 43.7 (C-13), 40.2 (C-5), 39.4 (C-12), 37.0 (C-20), 37.0 (C-1), 36.2 (C-1'), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 30.9 (C-2''), 29.6 (C-6), 27.8 (C-2), 27.6 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 18.9 (C-21), 13.1 (C-19), 12.1 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 433 (66, [M+1]⁺), 389 (5, [M-CO₂+1]⁺), 373 (100, [M-CH₃COOH+1]⁺), 357 (5, M-CH₃COSH+1]⁺), 331 (12, [M-CH₃COSH-C₂H₂O+1]⁺), 297 (7, [M-CH₃COSH-CH₃COOH+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 432.2701 (100.0, ber. für C₂₆H₄₀O₃S: 432.2698)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 72.11 (72.18), **H:** 9.44 (9.32), **S:** 7.62 (7.41)

6.2.6 (3S,20S)-20-Thiomethylpregn-7-en-3-ol (10)



Zu einer Suspension von LiAlH_4 (246 mg, 6.48 mmol) in THF (6.7 mL) wird langsam eine Lösung von (3S,20S)-20-(Acetylthiomethyl)pregn-7-en-3-ylacetat (**9**, 700 mg, 1.62 mmol) in THF (11 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei RT gerührt, anschließend mit verdünnter Salzsäure (2 M, 20 mL) versetzt und das zweiphasige Gemisch mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum aufkonzentriert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:0 \rightarrow 9:1) aufgereinigt und das Produkt **10** als weißer Feststoff (510 mg, 1.46 mmol, 90 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 107 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +38.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3363 (O-H), 2927 (C-H), 2871 (C-H), 2853 (C-H), 1445 (Alkyl), 1378 (Alkyl), 1094 (C-O), 1039 (C-O), 755 (C=C-H)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.20 - 5.13 (m, 1H, H-7), 3.59 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = 10.9$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = 3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 2.66 (ddd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}1'\text{d}'} = 13.1$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}-\text{sH}} = 8.1$ Hz, 1H, H-1'd), 2.39 - 2.32 (m, 1H, H-1'd'), 2.03 - 1.96 (m, 1H, H-12d), 1.91 - 1.16 (m, 21H), 1.09 (dt, $^3J_{\text{H}1\text{a}-\text{H}2\text{a}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H}1\text{a}-\text{H}2\text{e}} = 3.6$ Hz, 1H, H-1a), 1.05 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.79 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

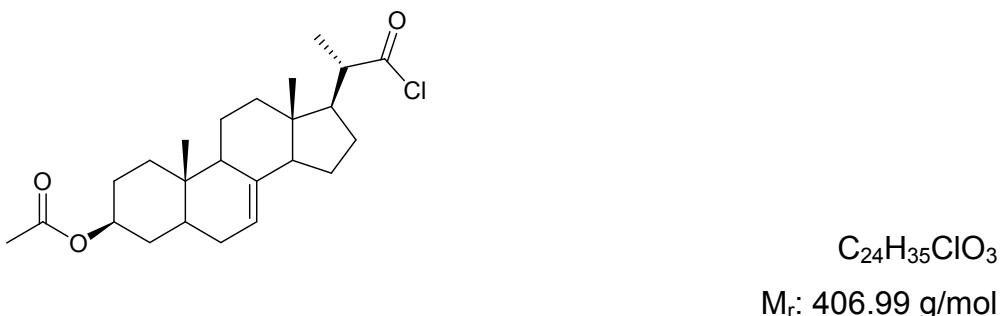
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 139.4 (C-8), 117.9 (C-7), 71.2 (C-3), 55.0 (C-14), 54.3 (C-17), 49.5 (C-9), 43.5 (C-13), 40.3 (C-5), 39.5 (C-12), 38.8 (C-20), 38.1 (C-2), 37.3 (C-1), 34.3 (C-10), 31.7 (C-1'), 31.6 (C-4), 29.8 (C-6), 27.7 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (C-11), 18.0 (C-21), 13.2 (C-19), 12.2 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 349 (33, [M+1]⁺), 331 (100, [M-H₂O+1]⁺), 315 (90, [M-H₂S+1]⁺), 297 (19, M-H₂O-H₂S+1]⁺)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 348 (16, [M]⁺⁺), 333 (5, [M-CH₃]⁺⁺), 315 (6, [M-HS]⁺⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 348.2475 (100.0, ber. für: C₂₂H₃₆OS: 348.2487)

6.2.7 (3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäurechlorid (11)^{82,83}



Zu einer gerührten Lösung von (3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäure (**8**, 150 mg, 0.37 mmol) in Dichlormethan (2.0 mL) wird unter Schutzgas Oxalylchlorid (150 µL, 222 mg, 1.75 mmol) und DMF (30 µL, 0.39 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei RT gerührt und anschließend im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wird als brauner Feststoff erhalten, der ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt werden kann. Zur analytischen Identifizierung wurde ein Ansatz säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) aufgereinigt.

Alternative Synthesevorschrift zur Darstellung des Säurechlorids 11:

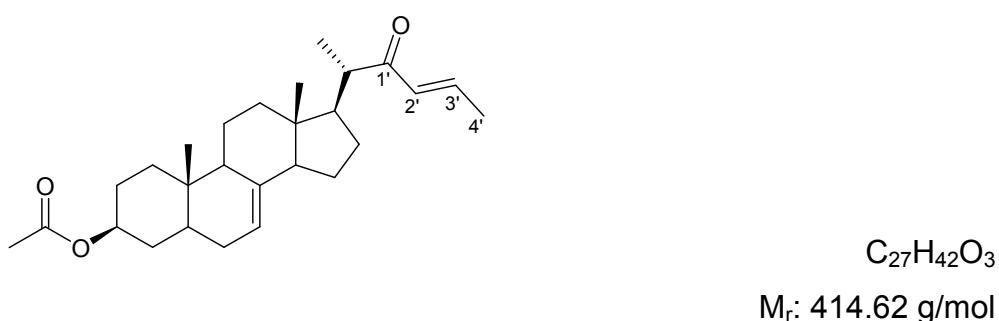
Zu einer gerührten Lösung von (3*S*,20*S*)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäure (**8**, 150 mg, 0.37 mmol) in Dichlormethan (0.5 mL) wird unter Schutzgas Thionylchlorid (54 μ L, mL, 88mg, 0.74 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wird als brauner Feststoff erhalten, der ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt werden kann. Zur analytischen Identifizierung wurde ein Ansatz säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) aufgereinigt.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ (ppm) = 5.20 - 5.10 (m, 1H, H-7), 4.73 - 4.65 (m, 1H, H-3), 2.84 - 2.75 (m, 1H, H-20), 2.03 (s, 3H, CH_3CO), 1.96 - 1.30 (m, 18H) mit 1.35 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.7$ Hz, 3H, H-21), 1.13 (dt, $^2J_{\text{H}1\text{a}-\text{H}1\text{b}} = ^3J_{\text{H}1\text{a}-\text{H}2\text{a}} = 12.8$ Hz, $^3J_{\text{H}1\text{a}-\text{H}2\text{e}} = 3.1$ Hz, 1H, H-1a), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.57 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ (ppm) = 177.1 (COCl), 170.7 (CH_3CO), 138.4 (C-8), 118.4 (C-7), 73.5 (C-3), 55.2 (C-20), 54.5 (C-14), 52.5 (C-17), 49.3 (C-9), 43.8 (C-13), 40.1 (C-5), 39.3 (C-12), 36.9 (C-1), 34.1 (C-10), 33.8 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.1 (C-16), 23.2 (C-15), 21.5 (CH_3CO), 21.4 (C-11), 17.1 (C-21), 13.0 (C-19), 12.3 (C-18).

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten^{82,83} überein.

6.2.8 (*E*)-((3*S*,20*S*)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl)-but-2-en-1-on (12)



Eine Suspension von Methyltriphenylphosphoniumbromid (369 mg, 1.03 mmol) in THF (1.6 mL) wird auf 0 °C gekühlt und langsam mit ⁷Butyllithium (2.5 M in Hexan, 434 µL, 70 mg, 1.09 mmol) versetzt. Nach 30 min Rühren wird eine Lösung von (3S,20S)-Acetoxypregn-7-en-20-yl-methansäurechlorid (**11**, 210 mg, 0.52 mmol) in THF (0.4 mL) zugegeben. Die Lösung wird langsam auf RT erwärmt und 3 h gerührt bevor sie in Wasser (5 mL) gegeben wird. Das zweiphasige Gemisch wird mit Diethylether (4 x 5 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und anschließend zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in Dichlormethan (0.8 mL) aufgenommen und nach Zugabe von Acetaldehyd (145 µL, 114 mg, 2.59 mmol) 72 h gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1) aufgereinigt. **12** wird als weißer Feststoff (89 mg, 0.22 mmol, 42 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 189 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 18.0^\circ$ (c = 2x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2945 (C-H), 2873 (C-H), 2852 (C-H), 2830 (C-H), 1730 (C=O), 1724 (C=O), 1473 (Alkyl), 1460 (Alkyl), 1447 (Alkyl), 1366 (Alkyl), 1264 (C-O), 1241 (C-O), 1158 (C-O), 1036 (C-O)

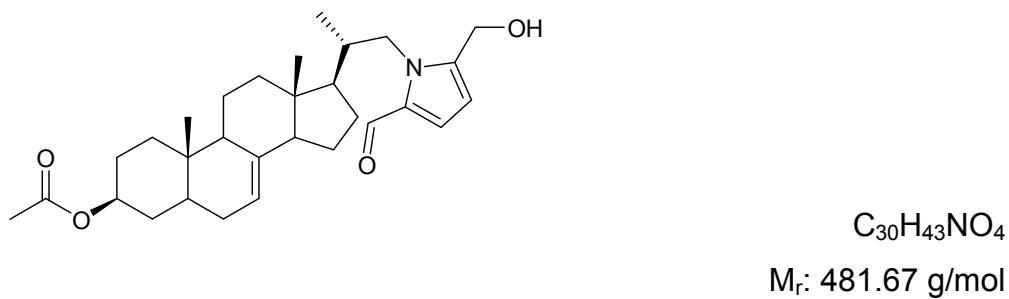
¹H NMR (500 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ (ppm) = 5.21 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.76 - 4.62 (m, 1H, H-3), 4.13 - 4.04 (m, 1H, H-3'), 3.60 - 3.55 (m, 1H, H-2'), 2.45 - 2.32 (m, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH₃CO), 1.98 - 1.92 (m, 1H, H-12d), 1.90 - 1.23 (m, 27H), 1.19 (d, ³J_{H21-H20} = 6.8 Hz, 3H, H-21), 1.17 - 1.09 (m, 1H, H-1d), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ (ppm) = 177.0 (C-1'), 170.9 (CH₃CO), 139.0 (C-8), 118.0 (C-7), 73.5 (C-3), 63.4 (C-20), 54.6 (C-14), 52.8 (C-17), 49.3 (C-9), 44.6 (C-2'), 43.5 (C-13), 43.2 (C-3'), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 29.3 (C-2), 27.6 (C-16), 26.3 (C-4'), 23.1 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 17.5 (C-21), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18).

MS (Cl): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 415 (16, [M+1]⁺), 355 (26, [M-CH₃COOH+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 414.3145 (12.0, ber. für $C_{27}H_{42}O_3$: 414.3134)

6.2.9 (3S,20S)-20-[1-(2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrolyl)-methyl]-pregn-7-en-3-ol (14)



Zu einer Suspension von [18]-Krone-6 (18 mg, 0.07 mmol) in Diethylether (2.0 mL) wird Kalium-*tert*-butoxid (38 mg, 0.34 mmol) gegeben. 5-(Hydroxymethyl)-1*H*-pyrrol-2-carbaldehyd (**16**, 43 mg, 0.34 mmol) wird unter Rühren zugegeben. Nach 15 min wird die Suspension auf 0 °C gekühlt und (3S,20S)-20-Brommethylpregn-7-en-3-ylacetat (**7**, 150 mg, 0.34 mmol) in Diethylether (1.0 mL) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird langsam auf RT erwärmt und 16 h gerührt. Wasser (5 mL) wird zugegeben und die beiden Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und anschließend im Vakuum zur Trockne eingedampft. Das so erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch ($CH_2Cl_2/MeOH$ 20:0 → 20:1) aufgereinigt und das Produkt als gelber Feststoff (14 mg, 0.03 mmol, 9 %) erhalten.

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 165 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -6.2^\circ$ ($c = 2 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3240 (O-H), 2940 (C-H), 2880 (C-H), 2856 (C-H), 1724 (C=O), 1650 (C=O), 1448 (Alkyl), 1376 (Alkyl), 1246 (C-O), 826 (C=C-H), 736 (C-H Aromat), 656 (C-H Aromat)

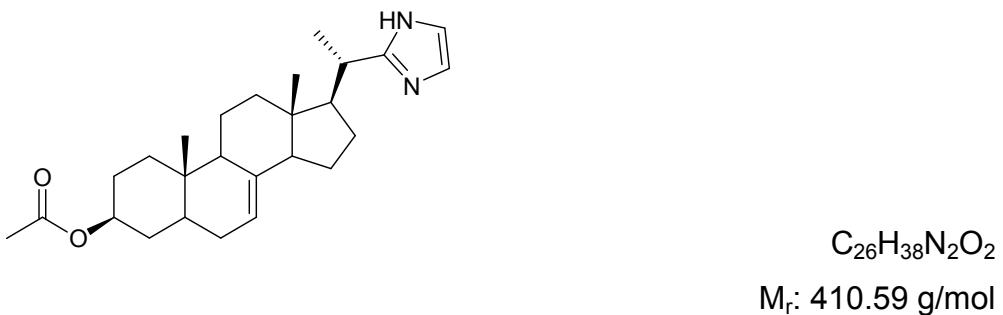
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 9.30 (s, 1H, CHO), 6.96 (d, $^3J_{H3''-H4''}$ = 3.6 Hz, 1H, H-3''), 6.23 (d, $^3J_{H4''-H3''}$ = 3.6 Hz, 1H, H-4''), 5.21 - 5.12 (m, 1H, H-7), 4.80 (s, 2H, 5''-CH₂), 4.73 - 4.63 (m, 1H, H-3), 4.55 - 4.30 (m, 1H, H-1'd), 3.81 - 3.69 (m, 1H, H-1'd'), 2.94 - 2.82 (m, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH₃CO) + 2.03 - 1.98 (m, 1H, H-12d), 1.85 - 1.10 (m, 20H), 1.14 (d, $^3J_{H21-H20}$ = 6.5 Hz, 3H, H-21), 0.82 (s, 3H, H-19), 0.56 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 179.4 (CHO), 170.4 (CH₃CO), 142.8 (C-5''), 138.6 (C-8), 132.3 (C.2''), 123.8 (C-3''), 118.7 (C-7), 110.0 (C-4''), 73.0 (C-3), 60.1 (5''-CH₂), 54.6 (C-1'), 53.9 (C-17), 53.6 (C-14), 49.1 (C.9), 44.0 (C-13), 40.1 (C-5), 39.7 (C-12), 38.7 (C-20), 34.5 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 28.3 (C-2), 27.1 (C-16), 25.6 (C-15), 21.6 (C-11), 21.5 (CH₃CO), 17.0 (C-21), 13.2 (C-19), 12.2 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 402 (30, [M-C₄O₂+1]⁺), 357 (42, [M-C₄O₂-HN(CH₃)₂+1]⁺), 342 (100, [M-C₅H₆N-CH₃COOH+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 481.3198 (4.0, ber. für C₃₀H₄₃NO₄: 481.3192)

6.2.10 (3S,20S)-20-(Imidazol-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (18)



Fein verriebenes homogenes Pulver von Kaliumpermanganat (144 mg, 0.91 mmol) auf Kieselgel (37 mg, 0.62 mmol) wird zu einer Lösung von (3S,20S)-20-(1H-Imidazolin-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**72**, 150 mg, 0.36 mmol) in Dichlormethan (0.6 mL) gegeben. Nach 16 h Rühren bei RT wird EtOH zugegeben, um das überschüssige Kaliumpermanganat zu reduzieren. Das Gemisch wird über Celit

filtriert bis das entstehende Mangan-(II)-oxid entfernt ist. Das Filtrat wird zur Trockne eingeengt und das so erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 40:1 → 20:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als weißer Feststoff (103 mg, 0.25 mmol, 69 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 230 °C (Zersetzung ab 198 °C)

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -30.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2940 (C-H), 2880 (C-H), 2856 (C-H), 1724 (C=O), 1446 (Alkyl), 1374 (Alkyl), 1248 (C-O), 830 (C=C-H), 740 (C-H Aromat), 658 (C-H Aromat)

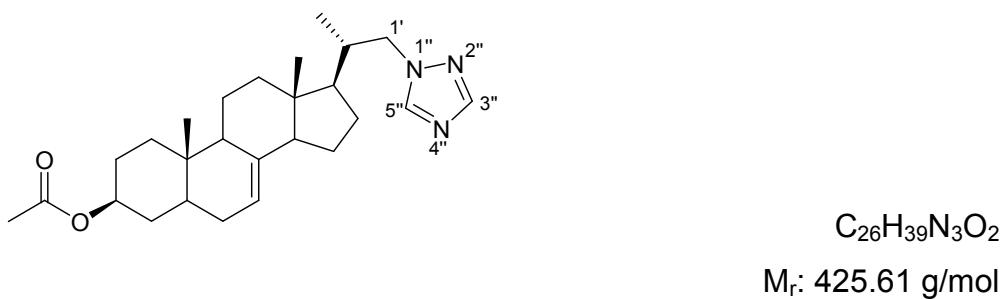
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.02 - 6.86 (m, 2H, H-arom.), 5.20 - 5.12 (m, 1H, H-7), 4.73 - 4.65 (m, 1H, H-3), 2.92 - 2.82 (m, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH_3CO) + 2.03 - 1.98 (m, 1H, H-12d), 1.85 - 1.17 (m, 19H), 1.16 - 1.12 (m, 1H, H-1d) + 1.16 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.5$ Hz, 3H, H-21), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.57 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 170.6 (CH_3CO), 145.8 (C-2'), 138.7 (C-8), 127.8 (C-4' + C-5'), 118.9 (C-7), 73.7 (C-3), 53.7 (C-14), 44.8 (C-17), 49.5 (C-9), 43.5 (C-13), 40.2 (C-5), 38.9 (C-20), 38.3 (C-12), 36.9 (C-1), 36.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 28.0 (C-2), 27.0 (C-16), 25.8 (C-15), 21.6 (C-11), 21.5 (CH_3CO), 20.3 (C-21), 13.9 (C-19), 13.0 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 411 (6, $[\text{M}+1]^+$), 344 (20, $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2+1]^+$), 351 (50, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 410.2950 (5.2, ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_2$: 410.2933)

6.2.11 (3S,20S)-20-(1,2,4-Triazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (19)



Tetraethylammoniumiodid (6 mg, 0.02 mmol), Kaliumcarbonat (41 mg, 0.30 mmol), 1,2,4-Triazol (21 mg, 0.30 mmol) und Natriumhydroxid (12 mg, 0.30 mmol) werden in Acetonitril (0.5 mL) suspendiert. (3S,20S)-20-Brommethylpregn-7-en-3-ylacetat (**7**, 100 mg, 0.23 mmol) wird in THF (0.5 mL) gelöst und zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 74 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird das Gemisch über Celit filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 40:1 \rightarrow 20:1) aufgereinigt. Das Produkt fällt als gelblich-weißer Feststoff (70 mg, 0.16 mmol, 53 %) an.

Schmelzpunkt: 232 °C (Zersetzung ab 218 °C)

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +1.0^\circ$ ($c = 1.5 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2940 (C-H), 1719 (C=O), 1654 (C=N), 1637 (C=N), 1508 (Alkyl), 1458 (Alkyl), 1438 (Alkyl), 1364 (Alkyl), 1255 (C-O), 1032 (C-O), 804 (C=C-H), 680 (C-H Ar), 669 (C-H Ar)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, 25 °C, CDCl_3): δ (ppm) = 8.03 (s, 1H, H-3''), 7.95 (s, 1H, H-5''), 5.20 - 5.13 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{e}} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 4.25 (dd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}1'\text{d}'} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}2\text{O}} = 3.6$ Hz, 1H, H-1'd), 3.80 (dd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}'-\text{H}1'\text{d}} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}'-\text{H}2\text{O}} = 9.4$ Hz, 1H, H-1'd'), 2.02 (s, 3H, CH_3CO) + 2.04 - 1.96 (m, 3H, H-12d, H-16), 1.87 - 1.19 (m, 17H), 1.16 - 1.08 (m, H-1d), 0.84 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}2\text{O}} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.58 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (126 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ (ppm) = 170.9 (CH₃CO), 150.8 (C-5''), 143.6 (C-3''), 138.9 (C-8), 118.1 (C-7), 73.5 (C-3), 55.5 (C-1'), 54.8 (C-14), 53.8 (C-20), 49.3 (C-9), 43.8 (C-13), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 37.9 (C-17), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.9 (C-16), 27.6 (C-2), 23.2 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 17.2 (C-21), 13.1 (C-19), 12.1 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 426 (100, [M+1]⁺), 366 (56, [M-CH₃COOH+1]⁺)

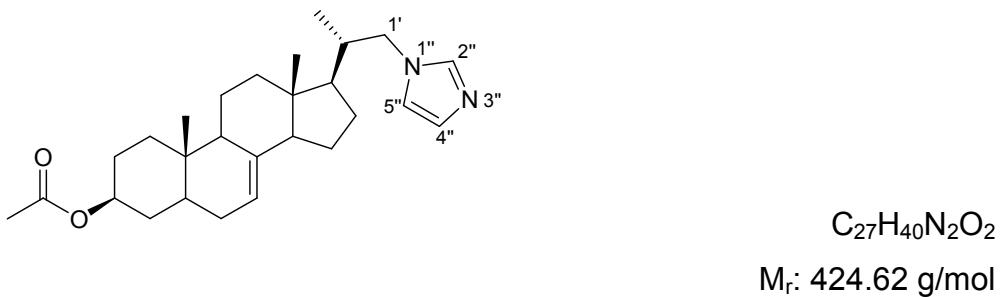
MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 425 (10, [M]⁺⁺), 410 (5, [M-CH₃]⁺⁺), 365 (12, [M-CH₃COOH]⁺⁺), 350 (18, [M-CH₃COOH-CH₃]⁺⁺), 281 (5, [M-C₂H₃N₃-CH₃COOH-CH₃]⁺⁺), 251 (100, [M-C₂H₃N₃-CH₃COOH-3xCH₃]⁺⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 425.3051 (9.7, ber. für C₂₆H₃₉N₃O₂: 425.3042)

6.2.12 (3S,20S)-20-(Imidazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (20) und (3S,20S)-20-(Imidazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ol (81)

(3S,20S)-20-Brommethylpregn-7-en-3-ylacetat (**7**, 200 mg, 0.46 mmol), Imidazol (31 mg, 0.46 mmol), Tetraethylammoniumiodid (24 mg, 0.09 mmol) und Natriumhydroxid (55 mg, 1.37 mmol) werden in Toluol (1.0 mL) suspendiert und 16 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird die Suspension mit Wasser (15 mL) versetzt und mit verdünnter Salzsäure (2 M) pH = 7 eingestellt. Das zweiphasige Gemisch wird mit Dichlormethan (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das nach Eindampfen des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/MeOH 40:1 → 20:1) aufgereinigt und die Produkte **20** (17 mg, 0.04 mmol, 8 %) und **81** (69 mg, 0.18 mmol, 40 %) als weiße Feststoffe erhalten (Elutionsreihenfolge: **20**, **81**).

(3S,20S)-20-(Imidazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (20)



Schmelzpunkt: 243 °C (Zersetzung ab 202 °C)

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +1.6^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

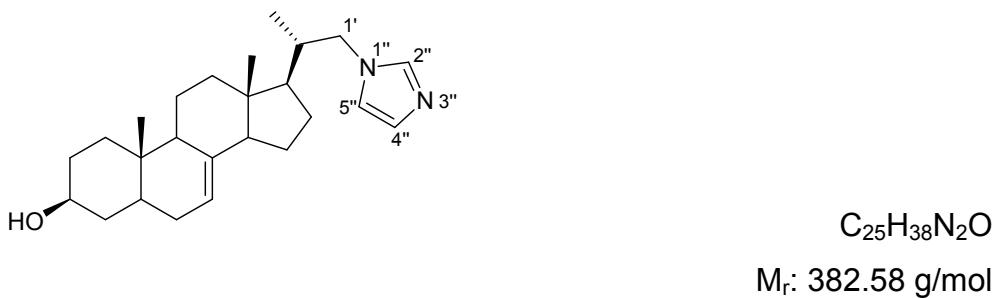
IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} \text{ (cm}^{-1}\text{)} = 1723 \text{ (C=O), } 2938 \text{ (C-H), } 2879 \text{ (C-H), } 2855 \text{ (C-H), } 1448$ (Alkyl), 1375 (Alkyl), 1250 (C-O), 828 (C=C-H), 745 (C-H Aromat), 660 (C-H Aromat)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 7.45 + 7.05 + 6.87 (6s, 3H, H-arom.), 5.21 - 5.13 (m, 1H, H-7), 4.68 (tt, $^3J_{H3-H2a} = ^3J_{H3-H4a} = 11.2$ Hz, $^3J_{H3-H2e} = ^3J_{H3-H4e} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 4.04 (dd, $^2J_{H1'd-H1'd'} = 13.6$ Hz, $^3J_{H1'd-H20} = 3.6$ Hz, 1H, H-1'd), 3.54 (dd, $^2J_{H1'd'-H1'd} = 13.6$ Hz, $^3J_{H1'd'-H20} = 9.4$ Hz, 1H, H1'd'), 2.02 (s, 3H, CH_3CO) + 2.04 - 1.99 (m, 1H, H-12d), 1.85 - 1.17 (m, 19H), 1.12 (dt, $^3J_{H1a-H2e} = ^2J_{H1a-H1e} = 4.0$ Hz, $^3J_{H1a-H2a} = 14.0$ Hz, 1H, H-1a), 0.85 (d, $^3J_{H21-H20} = 6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.57 (2s, 3H, H-18).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 170.8 (CH_3CO), 152.0 (C-arom.), 138.9 (C-8), 129.2 (C-arom.), 119.6 (C-arom.), 118.1 (C-7), 73.5 (C-3), 54.8 (C-17), 53.7 (C-14), 53.0 (C-1'), 49.2 (C-9), 43.7 (C-13), 40.1 (C-5), 39.3 (C-20), 39.1 (C-12), 36.9 (C-1), 34.3 (C10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 28.2 (C-2), 27.6 (C-16), 23.2 (C-15), 21.6 (C-11), 21.5 (CH_3CO), 17.3 (C-21), 13.1 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 425 (7, $[M+1]^+$), 395 (15, $[M-C_2H_6+1]^+$), 315 (16, $[M-Imidazol-C_2H_2O+1]^+$), 297 (15, $[M-Imidazol-CH_3COOH+1]^+$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 424.3071 (6.5, ber. für $C_{27}H_{40}N_2O_2$: 424.3090)

(3S,20S)-20-(Imidazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ol (81)

Schmelzpunkt: 258 °C (Zersetzung ab 218 °C)

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -1.2^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 3264$ (O-H), 2936 (C-H), 2877 (C-H), 2853 (C-H), 1509 (C-H), 1446 (Alkyl), 1380 (Alkyl), 1238 (C-O), 1101 (C-H Alkohol), 1056 (C-H Alkohol), 826 (C=C-H), 748 (C-H Aromat), 661 (C-H Aromat)

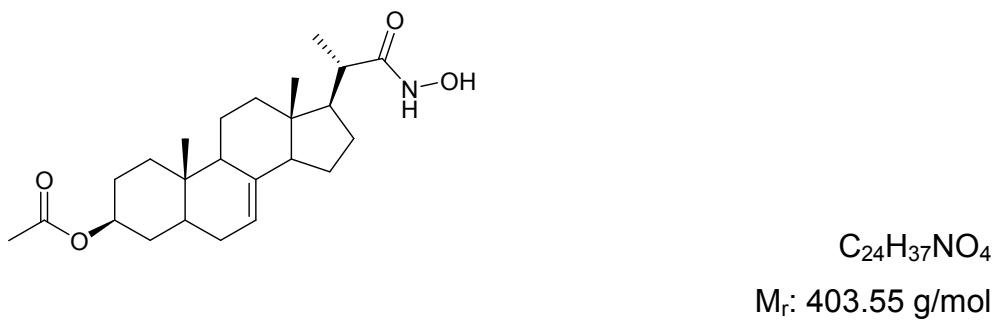
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 7.46 + 7.04 + 6.87 (3s, 3H, H-arom.), 5.21 - 5.13 (m, 1H, H-7), 4.01 (dd, $^2J_{H1'd-H1'd'} = 13.8$ Hz, $^3J_{H1'd-H20} = 3.5$ Hz, 1H, H-1'd), 3.66 - 3.49 (m, 2H, H-1'd' + H-3), 2.45 (bs, 1H, OH), 2.03 - 1.93 (m, 2H, H-12d + H-20), 1.83 - 1.15 (m, 20H), 1.11 - 1.01 (m, 1H, H-1d), 0.85 (d, $^3J_{H21-H20} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.56 (s, 3H, H-18).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 140.0 (C-8), 118.3 (C-7), 71.1 (C-3), 54.9 (C-17), 53.7 (C-14), 53.2 (C-1'), 49.4 (C-9), 43.8 (C-13), 40.3 (C-5), 39.4 (C-12), 39.0 (C-20), 38.0 (C-4), 37.2 (C-1), 34.3 (C-10), 31.6 (C-2), 29.7 (C-6), 28.2 (C-16), 23.2 (C-15), 21.6 (C-11), 17.3 (C-21), 13.2 (C-19), 12.1 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 383 (7, $[M+1]^+$), 365 (15, $[M-H_2O+1]^+$)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 78.08 (78.48), **H:** 9.92 (10.01), **N:** 7.19 (7.32)

6.2.13 (3S,20S)-20-(Hydroxycarbamoyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (21)



N-Hydroxysuccinimid (65 mg, 0.57 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre in Dichlormethan (0.7 mL) gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. DCC (112 mg, 0.54 mmol) und (3*S*,20*S*)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäure (**8**, 200 mg, 0.52 mmol) werden zugegeben. Die Lösung wird 2 h bei RT gerührt und der dabei entstehende Dicyclohexylharnstoff über Celit abfiltriert. Das Filtrat wird aufkonzentriert und der Rückstand in THF (0.5 mL) gelöst. Es wird Wasser (0.5 mL), Hydroxylamin-Hydrochlorid (89 mg, 0.13 mmol) und Natriumcarbonat (93 mg, 0.61 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei RT gerührt und im Anschluss über Celit filtriert. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 20:1). Das Produkt **21** wird als weißer Feststoff (93 mg, 0.23 mmol, 40 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 153 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -1.0^\circ$ (c = 2x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 3444 (CO-NH), 3303 (CO-NH), 3214 (O-H), 3097 (CO-NH), 2950 (C-H), 2870 (C-H), 2849 (C-H), 2799 (C-H), 1732 (C=O Ester), 1661 (C=O Amid), 1559 (C=O Amid), 1471 (O-H), 1446 (Alkyl), 1366 (Alkyl), 1246 (C-O), 1031 (C-O), 972 (C=C-H), 896 (C=C-H)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 6.30 (bs, 1H, OH), 5.17 - 5.08 (m, 1H, H-7), 4.65 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.2 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.4 Hz, H-3), 2.44 (dq, ³J_{H20-H17} = 10.0 Hz, ³J_{H20-H21} = 6.9 Hz, 1H, H-20), 1.98 (s, 3H, CH₃CO), 1.94 - 1.87 (m,

1H, H-12d), 1.86 - 1.23 (m, 19H), 1.19 (d, $^3J_{H21-H20} = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 1.13 - 1.04 (m, 1H, H-1d), 0.76 (s, 3H, H-19), 0.50 (s, 3H, H-18).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 177.5 (RCONHOH), 170.7 (CH_3CO), 138.7 (C-8) 118.0 (C-7), 73.4 (C-3), 54.5 (C-14), 52.7 (C-17), 49.1 (C-9), 43.5 (C-13), 41.3 (C-20), 40.0 (C-5), 39.2 (C-12), 36.8 (C-1), 34.2 (C-10), 33.8 (C-4), 29.5 (C-6), 27.5 (C-2), 26.8 (C-16), 23.0 (C-15), 21.5 (CH_3CO), 21.4 (C-11), 17.2 (C-21), 13.0 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 404 (30, $[\text{M}+1]^+$), 344 (54, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$)

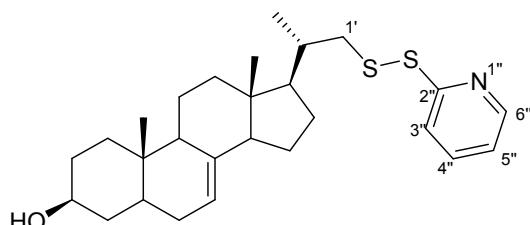
HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 403.2753 (0.5, ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{NO}_4$: 403.2723)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 71.16 (71.43), **H:** 9.39 (9.24), **N:** 3.57 (3.47)

6.2.14 Synthese der unsymmetrischen Disulfide 22 - 26

Eine Lösung von (3S,20S)-20-Thiomethylpregn-7-en-3-ol (**10**, 200 mg, 0.57 mmol) und NEt_3 (40 μL , 29 mg, 0.29 mmol) in Dichlormethan (2.5 mL) wird tropfenweise zu einer Lösung eines symmetrischen Disulfids (0.57 mmol, 1 eq.) in Dichlormethan (7.5 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei RT gerührt und im Anschluss mit fünfprozentiger wässriger Natronlauge (2 x 10 mL) und Wasser (2 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 4:1) aufgereinigt.

(3S,20S)-20-[(Pyridin-2-yl)-disulfanylmethyl]-pregn-7-en-3-ol (22)



M_r : 457.73 g/mol

Disulfid: 2,2'-Dithiodipyridin

Ausbeute: 146 mg (0.32 mmol, 56 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 178 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 266.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3421 (O-H), 3041 (C=C-H), 2955 (C-H), 2910 (C-H), 2865 (C-H), 2848 (C-H), 1656 (C=N), 1573 (C=C), 1560 (C=C), 1448 (C-H), 1417 (C-H), 1041 (C-O), 758 (arom. C-H)

¹H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 8.45 (ddd, $^3J_{\text{H}6''-\text{H}5''} = 4.8$ Hz, $^4J_{\text{H}6''-\text{H}4''} = 1.8$ Hz, $^5J_{\text{H}6''-\text{H}3''} = 1.0$ Hz, 1H, H-6''), 7.72 (dt, $^3J_{\text{H}3''-\text{H}4''} = 8.1$ Hz, $^4J_{\text{H}3''-\text{H}5''} = 5J_{\text{H}3''-\text{H}6''} = 1.0$ Hz, 1H, H-3''), 7.64 (ddd, $^3J_{\text{H}4''-\text{H}3''} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{H}4''-\text{H}5''} = 7.3$ Hz, $^4J_{\text{H}4''-\text{H}6''} = 1.8$ Hz, 1H, H-4''), 7.07 (ddd, $^3J_{\text{H}5''-\text{H}4''} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{H}5''-\text{H}6''} = 4.8$ Hz, $^4J_{\text{H}5''-\text{H}3''} = 1.0$ Hz, 1H, H-5''), 5.20 - 5.10 (m, 1H, H-7), 3.59 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\alpha} = 3J_{\text{H}3-\text{H}4\alpha} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\epsilon} = 3J_{\text{H}3-\text{H}4\epsilon} = 4.4$ Hz, 1H, H-3), 3.01 (dd, $^2J_{\text{H}1'd-\text{H}1'd'} = 12.7$ Hz, $^3J_{\text{H}1'd-\text{H}2\alpha} = 2.6$ Hz, 1H, H-1'd), 2.57 (dd, $^2J_{\text{H}1'd'-\text{H}1'd} = 12.7$ Hz, $^3J_{\text{H}1'd'-\text{H}2\alpha} = 8.9$ Hz, 1H, H-1'd'), 2.03 - 1.96 (m, 1H, H-12d), 1.90 - 1.18 (m, 20H), 1.14 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}2\alpha} = 6.5$ Hz, 3H, H-21), 1.11 - 1.03 (m, 1H, H-1d), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.51 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 160.9 (C-2''), 149.6 (C-6''), 139.3 (C-8), 137.1 (C-4''), 120.6 (C-5''), 119.8 (C-3''), 118.0 (C-7), 71.2 (C-3), 55.2 (C-17), 55.0 (C-14), 49.5 (C-9), 47.4 (C-1'), 43.8 (C-13), 40.4 (C-5), 39.5 (C-12), 38.1 (C-4), 37.3

(C-1), 37.0 (C-20), 34.3 (C-10), 31.6 (C-2), 29.8 (C-6), 28.0 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (C-11), 18.9 (C-21), 13.2 (C-19), 12.0 (C-18).

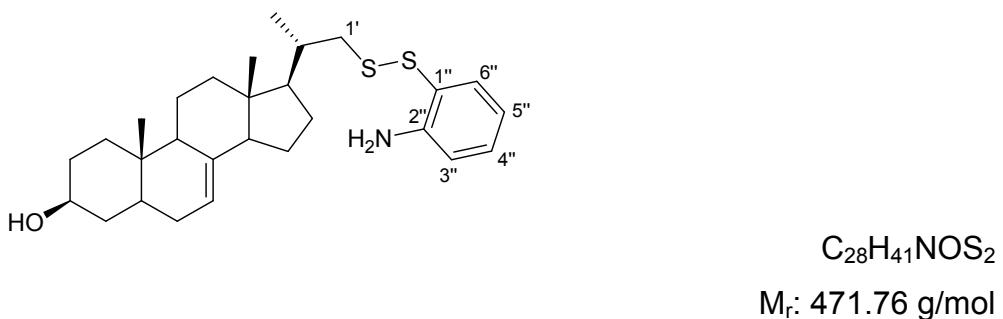
MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 458 (2, $[M+1]^+$), 315 (2, $[M-\text{PyrSSH}+1]^+$), 295 (26, $[M-\text{PyrSSH}-\text{H}_2\text{O}+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 457 (6, $[M]^{++}$), 442 (2, $[M-\text{CH}_3]^{++}$), 410 (5, $[M-\text{S}-\text{CH}_3]^{++}$), 346 (55, $[M-\text{PyrSH}]^{++}$), 331 (15, $[M-\text{PyrSH}-\text{CH}_3]^{++}$), 313 (10, $[M-\text{PyrSH-SH}]^{++}$), 297 (12, $[M-\text{PyrSSH-OH}]^{++}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 457.2489 (100.0, ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{NOS}_2$: 457.2473)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 70.68 (70.85), **H:** 8.69 (8.59), **N:** 3.14 (3.06), **S:** 13.63 (14.01)

(3S,20S)-20-[(2-Aminophenyl)-disulfanyl methyl]-pregn-7-en-3-ol (23)



Disulfid: Bis-(2-Aminophenyl)-disulfid

Ausbeute: 30 mg (0.06 mmol, 11 %) gelblicher Feststoff

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 120 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 198.6^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

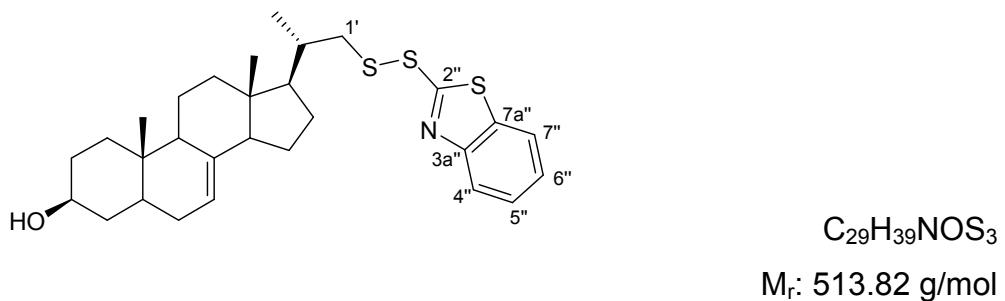
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.42 (dd, ³J_{H6"-H5"} = 7.6 Hz, ⁴J_{H6"-H4"} = 1.5 Hz, 1H, H-6"), 7.18 - 7.12 (m, 1H, H-4"), 6.73 (dd, ³J_{H3"-H4"} = 8.0 Hz, ⁴J_{H3"-H5"} = 1.2 Hz, 1H, H-3"), 6.67 (td, ³J_{H5"-H4"} = ³J_{H5"-H6"} = 7.6 Hz, ⁴J_{H5"-H3"} = 1.2 Hz, 1H, H-5"), 5.20 - 5.11 (m, 1H, H-7), 3.64 - 3.54 (m, 1H, H-3), 3.00 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 13.0 Hz, ³J_{H1'd-H-20} = 2.4 Hz, 1H, H-1'd), 2.43 (dd, ²J_{H1'd'-H1'd} = 13.0 Hz, ³J_{H1'd'-H-20} = 9.3 Hz, 1H, H-1'd'), 2.02 - 1.94 (m, 1H, H-12d), 1.89 - 1.05 (m, 26H), 1.01 (d, ³J_{H21-H20} = 6.5 Hz, 3H, H-21), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.53 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 148.0 (C-2"), 139.3 (C-8), 135.4 (C-1"), 131.0 (C-4"), 119.2 (C-1"), 118.4 (C-7), 117.9 (C-5"), 115.7 (C-3"), 71.1 (C-3), 55.4 (C-17), 55.0 (C-14), 49.4 (C-9), 46.6 (C-1'), 43.8 (C-13), 40.3 (C-5), 39.4 (C-12), 38.0 (C-4), 37.2 (C-1), 36.8 (C-20), 34.3 (C-10), 31.5 (C-2), 29.7 (C-6), 28.0 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (C-11), 18.7 (C-21), 13.2 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (EI): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 471 (78, [M]⁺•), 347, (100, [M-C₆H₆NS]⁺⁺•), 329 (38, [M-C₆H₆NS-H₂O]⁺•)

HR-MS (EI): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 471.2633 (100.0, ber. für C₂₈H₄₁NOS₂: 471.2630)

(3S,20S)-20-[(Benzothiazol-2-yl)-disulfanylmethyl]-pregn-7-en-3-ol (24)



Disulfid: 2,2'-Dithiobis-(benzothiazol)

Ausbeute: 89 mg (0.17 mmol, 30 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 175 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +172.5^\circ$ (c = 2x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 3424 (O-H), 2927 (C-H), 2870 (C-H), 1654 (C=N), 1559 (C=C), 1458 (C-H), 1425 (C-H), 1378 (O-H), 1309 (O-H), 1235 (C-O), 1040 (C-O), 1004 (C-H), 754 (arom. C-H)

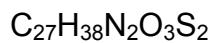
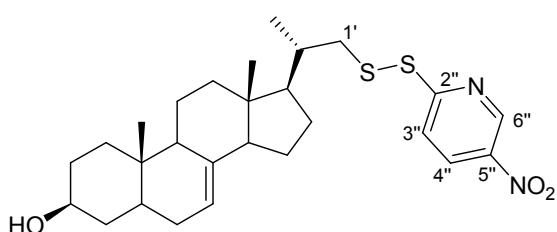
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.88 - 7.84 (m, 1H, H-4''), 7.83 - 7.80 (m, 1H, H-7''), 7.43 (ddd, ³J_{H5''-H4''} = 8.4 Hz, ³J_{H5''-H6''} = 7.3 Hz, ⁴J_{H5''-H7''} = 1.2 Hz, 1H, H-5''), 7.35 - 7.31 (m, 1H, H-6''), 5.17 - 5.12 (m, 1H, H-7), 3.59 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.0 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.5 Hz, 1H, H-3), 3.19 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 12.6 Hz, ³J_{H1'd-H-20} = 2.7 Hz, 1H, H-1'd), 2.76 (dd, ²J_{H1'd'-H1'd} = 12.6 Hz, ³J_{H1'd'-H-20} = 8.9 Hz, 1H, H-1'd'), 2.04 - 1.97 (m, 1H, H-12d), 1.97 - 1.20 (m, 20H), 1.17 (d, ³J_{H21-H20} = 6.5 Hz, 3H, H-21), 1.13 - 1.03 (m, 1H, H-1d), 0.79 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 173.5 (C-2''), 155.3 (C-3a''), 139.2 (C-8), 136.0 (C-7a''), 126.4 (C-5''), 124.7 (C-6''), 122.3 (C-7''), 121.3 (C-4''), 118.1 (C-7), 71.2 (C-3), 55.2 (C-17), 55.0 (C-14), 49.5 (C-9), 48.0 (C-1'), 43.9 (C-13), 40.4 (C-5), 39.5 (C-12), 38.1 (C-4), 37.3 (C-1), 37.2 (C-20), 34.3 (C-10), 31.6 (C-2) 29.8 (C-6), 28.0 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (C-11), 18.9 (C-21), 13.2 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 514 (2, [M+1]⁺), 496 (2, [M-H₂O+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = gem.: 513.2187 (61.5, ber. für C₂₉H₃₈NOS₃: 513.2194)

(3S,20S)-20-[(5-Nitropyridin-2-yl)-disulfanylmethyl]-pregn-7-en-3-ol (25)



M_r: 502.74 g/mol

Disulfid: 2,2'-Dithiobis-(5-nitropyridin)

Ausbeute: 60 mg (0.12 mmol, 21 %) gelblicher Feststoff

Schmelzpunkt: 175 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 150.0^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)

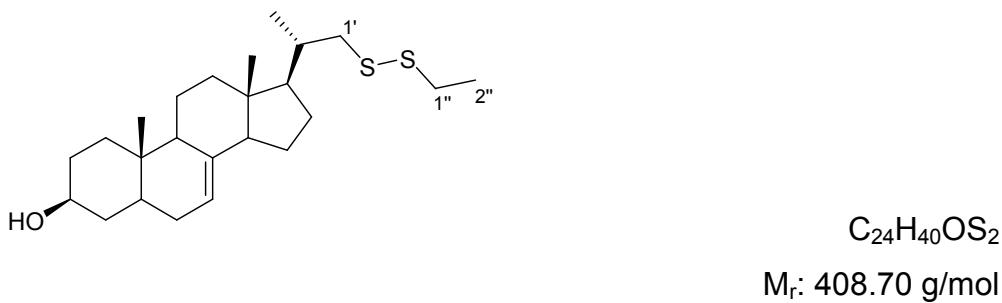
IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 3386 (O-H), 3031 (C=C-H), 2937 (C-H), 2869 (C-H), 2844 (C-H), 1654 (C=N), 1588 (arom. C=C), 1565 (C-NO₂), 1516 (arom. C=C), 1437 (C-H), 1380 (O-H), 1346 (C-NO₂), 1255 (C-O), 1098 (C-O), 1050 (C-O), 749 (arom. C-H)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 9.27 (dd, ⁴J_{H6''-H4''} = 2.6 Hz, ⁵J_{H6''-H3''} = 0.6 Hz, 1H, H-6''), 8.41 (dd, ³J_{H4''-H3''} = 8.9 Hz, ⁴J_{H4''-H6''} = 2.6 Hz, 1H, H-4''), 7.91 (dd, ³J_{H3''-H4''} = 8.9 Hz, ⁵J_{H3''-H6''} = 0.6 Hz, 1H, H-3''), 5.20 - 5.12 (m, 1H, H-7), 3.63 - 3.55 (m, 1H, H-3), 3.02 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 12.7 Hz, ³J_{H1'd-H20} = 2.6 Hz, 1H, H-1'd), 2.63 (dd, ²J_{H1'd'-H1'd} = 12.7 Hz, ³J_{H1'd'-H20} = 8.9 Hz, 1H, H-1'd'), 2.04 - 1.97 (m, 1H, H-12d), 1.91 - 1.19 (m, 20H), 1.17 (d, ³J_{H21-H20} = 6.6 Hz, 3H, H-21), 1.12 - 1.03 (m, 1H, H-1d), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.52 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 169.5 (C-2''), 145.3 (C-6''), 142.0 (C-5''), 139.1 (C-8), 131.7 (C-4''), 119.2 (C-3''), 118.1 (C-7), 71.1 (C-3), 55.1 (C-17), 55.0 (C-14), 49.4 (C-9), 47.3 (C-1'), 43.8 (C-13), 40.3 (C-5), 39.4 (C-12), 38.1 (C-4), 37.2 (C-1), 37.2 (C-20), 34.3 (C-10), 31.6 (C-2), 29.7 (C-6), 28.0 (C-16), 23.0 (C-15), 21.6 (C-11), 18.9 (C-21), 13.2 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (Cl): ^m/_z (rel. Int. in %) = 503 (2, [M+1]⁺), 485 (2, [M-H₂O+1]⁺), 347 (20, [M-HSPyrNO₂+1]⁺), 315 (32, [M-HSSPyrNO₂+1]⁺), 297 (8, [M-HSSPyrNO₂-H₂O +1]⁺)

HR-MS (EI): ^m/_z (rel. Int. in %) = gem.: 502.2340 (49.8, ber. für. C₂₇H₃₈N₂O₃S₂: 502.2324)

(3S,20S)-20-(Ethyldisulfanylmethyl)-pregn-7-en-3-ol (26)**Disulfid:** Diethyldisulfid**Ausbeute:** 230 mg (0.56 mmol, 98 %) weißer Feststoff**Schmelzpunkt:** 103 °C**Spezifische Drehung:** $[\alpha]_D^{20} = +42.0^\circ$ ($c = 5 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 3381$ (O-H), 3045 (C=C-H), 2943 (C-H), 2872 (C-H), 2848 (C-H), 2810 (C-H), 1472 (C-H), 1457 (C-H), 1444 (C-H), 1373 (O-H), 1252 (C-O), 1099 (C-O), 1042 (C-O)

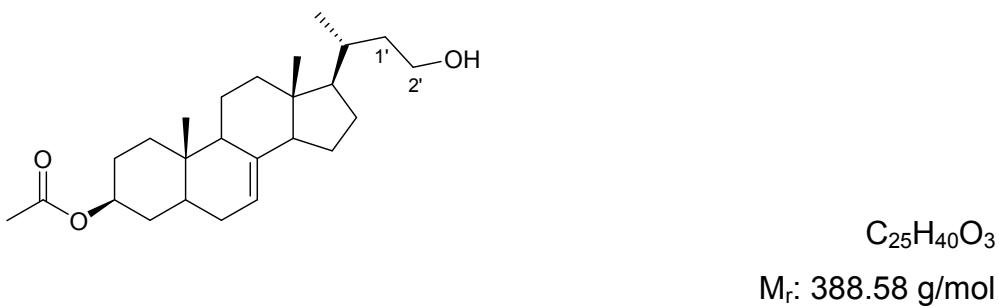
¹H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.20 - 5.11 (m, 1H, H-7), 3.56 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = 3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 10.9$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = 3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{e}} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 2.90 (dd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}1'\text{d}'} = 12.7$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}2\text{O}} = 2.6$ Hz, 1H, H-1'd), 2.66 (q, $^3J_{\text{H}1''-\text{H}2''} = 7.3$ Hz, 2H, H-1''), 2.41 (dd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}'-\text{H}1'\text{d}} = 12.7$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}'-\text{H}2\text{O}} = 9.1$ Hz, 1H, H-1'd'), 2.03 - 1.95 (m, 1H, H-20), 1.93 - 1.85 (m, 1H, H-12d), 1.82 - 1.17 (m, 22 H), 1.06 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}2\text{O}} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 1.10 - 1.01 (m, 1H, H-1d), 0.77 (s, 3H, H-19), 0.53 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 139.3 (C-8), 117.8 (C-7), 71.0 (C-3), 55.2 (C-17), 54.9 (C-14), 49.4 (C-9), 47.4 (C-1'), 43.7 (C-13), 40.3 (C-5), 39.4 (C-12), 37.9 (C-4), 37.2 (C-1), 37.0 (C-20), 34.2 (C-10), 32.64 (C-1''), 31.4 (C-2), 29.7 (C-6), 28.0 (C-16), 23.0 (C-15), 21.5 (C-11), 18.7 (C-21), 14.59 (C-2''), 13.1 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 408 (44, $[M]^{+*}$), 248 (22, $[M-C_2H_4S]^{+*}$), 333 (12, $[M-C_2H_4S-CH_3]^{+*}$), 315 (38, $[M-C_2H_5S_2]^{+*}$), 297 (50, $[M-C_2H_5S_2-H_5O]^{+*}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = gem.: 408.2520 (51.1) (ber. für. $C_{24}H_{40}OS_2$: 408.2521)

6.2.15 (3S,20S)-20-(1-Hydroxyeth-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (29)



Natriumborhydrid (11 mg, 0.29 mmol) wird zu einer Lösung von (3S,20S)-20-(Formylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**28**, 110 mg, 0.29 mmol) in einem Gemisch von Chloroform und MeOH (3:2, 3.0 mL) gegeben. Nach 10 min Rühren bei RT wird die Reaktionslösung mit gesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung (5 mL) versetzt. Das zweiphasige Gemisch wird mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1 → 4:1) aufgereinigt und **29** als weißer Feststoff (75 mg, 0.19 mmol, 88 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 170 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 12.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3320 (OH), 2948 (C-H), 2900 (C-H), 1736 (C=O), 1470 (Alkyl), 1442 (Alkyl), 1380 (Alkyl), 1368 (Alkyl), 1252 (C-O), 1032 (C=C-H)

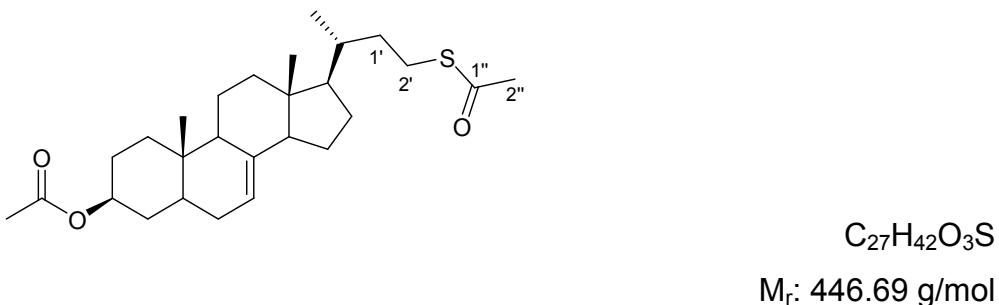
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.20 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.3 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.6 Hz, 1H, H-3), 3.72 (ddd, ²J_{H2'd-H2'd'} = 10.4 Hz, ³J_{H2'd-H1'd} = 8.2 Hz, ²J_{H2'd-H2'd'} = 4.7 Hz, 1H, H-2'd), 3.64 (dt, ²J_{H2'd'-H2'd} = 10.4 Hz, ³J_{H2'd'-H1'} = 7.6 Hz, 1H, H-2'd'), 2.02 (s, 3H, CH₃CO), 1.95 - 1.88 (s, 1H, H-12d), 1.86 - 1.18 (m, 22H), 1.17 - 1.09 (m, 1H, H-1d), 0.96 (d, ³J_{H21-H20} = 6.6 Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 170.9 (CH₃CO), 139.5 (C-8), 117.6 (C-7), 73.6 (C-3), 61.1(C-2'), 56.4 (C-17), 55.1 (C-14), 49.4 (C-9), 43.6 (C-13), 40.2 (C-5), 39.6 (C-12), 39.1 (C-20), 37.0 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 33.4 (C-1'), 29.7 (C-6), 28.2 (C-16), 27.6 (C-2), 23.1 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.6 (C-11), 19.1 (C-21), 13.1 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 389 (4, [M+1]⁺), 371 (30, [M-H₂O+1]⁺), 329 (100, [M-CH₃COOH+1]⁺) 311 (12 [M-CH₃COOH-H₂O+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 388.2993 (100.0, ber. für C₂₅H₄₀O₃: 388.2978)

6.2.16 (3S,20S)-20-(1-Acetylthioeth-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (30)



16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt und das daraus resultierende Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1) aufgereinigt. Das Produkt **30** fällt als gelblich-weißer Feststoff (125 mg, 0.28 mmol, 70 %) an.

Schmelzpunkt: 184 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -29.8^\circ$ (c = 0.5x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2946 (C-H), 2868 (C-H), 2848 (C-H), 2801 (C-H), 1734 (C=O Ester), 1680 (C=O Thioester), 1468 (Alkyl), 1442 (Alkyl), 1368 (Alkyl), 1248 (C-O) 1242 (C-O), 1138 (C-O)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.21 - 5.10 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.2 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.5 Hz, 1H, H-3), 3.00 - 2.90 (m, 1H, H-2'd), 2.35 - 2.08 (m, 3H, H-2'd' + H-2''), 2.02 (s, 3H, CH₃COO), 2.02 - 1.89 (m, 2H, H-12d, H-2d), 1.87 - 1.18 (m, 21H), 1.20 - 1.10 (m, 1H, H-1d), 0.93 (d, ³J_{H21-H20} = 6.5 Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

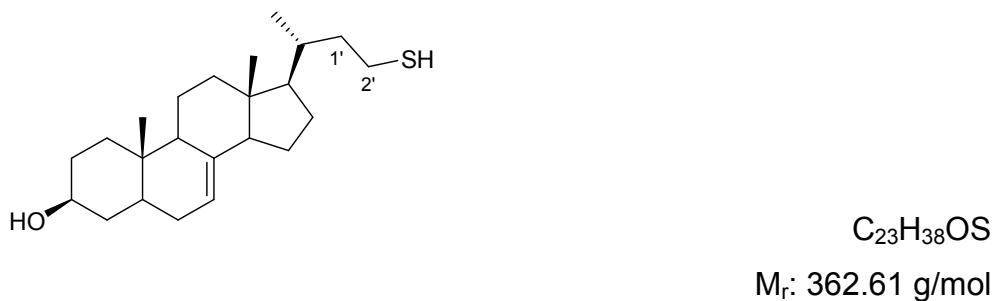
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 196.3 (C-1''), 170.9 (CH₃COO), 139.4 (C-8), 117.7 (C-7), 73.5 (C-3), 56.2 (C-17), 55.0 (C-14), 49.4 (C-9), 43.7 (C-13), 40.5 (C-20), 40.3 (C-5), 39.6 (C-12), 37.0 (C-1), 36.0 (C-2'), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 30.8 (C-2''), 29.6 (C-6), 28.0 (C-16), 27.8 (C-2), 23.1 (C-15), 22.9 (C-1'), 21.6 (CH₃CO), 21.6 (C-11), 19.2 (C-21), 13.1 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 447 (2, [M+1]⁺), 387 (14, [M-CH₃COOH+1]⁺)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 446 (30, [M]⁺⁺), 431 (10, [M-CH₃]⁺⁺), 386 (48, [M-CH₃COOH]⁺⁺), 371 (32, [M-CH₃COsH]⁺⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 446.2850 (100.0, ber. für C₂₇H₄₂O₃S: 446.2855)

6.2.17 (3S,20S)-20-(1-Thioeth-2-yl)-pregn-7-en-3-ol (31)



Zu einer Suspension von LiAlH_4 (51 mg, 0.13 mmol) in THF (2.3 mL) wird langsam eine Lösung von (3S,20S)-20-(1-Acetylthio-2-ethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**30**, 150 mg, 0.34 mmol) in THF (2.3 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2.5 h bei RT gerührt, anschließend mit verdünnter Salzsäure (2 M, 2 mL) versetzt und das zweiphasige Gemisch mit Diethylether (2 x 5 mL) und Dichlormethan (2 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum aufkonzentriert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:0 → 9:1) aufgereinigt und das Produkt **31** als weißer Feststoff (100 mg, 0.28 mmol, 82 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 111 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +35.0^\circ$ ($c = 0.2 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 3426$ (O-H), 2869 (C-H), 2844 (C-H), 2808 (C-H), 1472 (Alkyl), 1446 (Alkyl), 1372 (Alkyl), 1096 (C-O), 1038 (C-O), 632 (C=C-H)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.22 - 5.10 (m, 1H, H-7), 3.59 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = 3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 4.4$ Hz, 1H), 2.67 - 2.53 (m, 1H, H-2'd), 2.49 - 2.39 (m, 1H, H-2'd'), 2.05 - 1.96 (m, 1H, H-12d), 1.93 - 1.15 (m, 23H), 1.12 - 1.02 (m, 1H, H-1d), 0.93 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.5$ Hz, 3H, H-21), 0.79 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 139.5 (C-8), 117.8 (C-7), 71.2 (C-3), 56.0 (C-17), 55.1 (C-14), 49.5 (C-9), 43.5 (C-13), 40.8 (C-20), 40.4 (C-5), 39.7 (C-

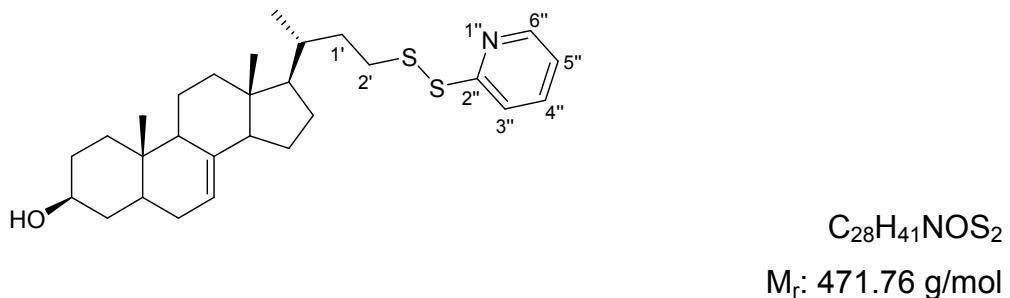
12), 38.1 (C-2), 37.3 (C-1), 35.7 (C-2'), 34.3 (C-10), 31.6 (C-4), 29.8 (C-6), 28.1 (C-16), 23.1 (C-15), 22.1 (C-1'), 21.7 (C-11), 18.6 (C-21), 13.2 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 363 (52, $[M+1]^+$), 345 (100, $[M-H_2O+1]^+$), 329 (54, $[M-H_2S+1]^+$), 311 (12, $M-H_2O-H_2S+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 362 (26, $[\text{M}]^{+*}$), 347 (10, $[\text{M}-\text{CH}_3]^{+*}$), 329 (6, $[\text{M}-\text{HS}]^{+*}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 362.2641 (100.0, ber. für: C₂₃H₃₈OS: 362.2643)

6.2.18 (3*S*,20*S*)-20-[1-(Pyridin-2-yl)-disulfanyleth-2-yl]-pregn-7-en-3-ol (32)



Eine Lösung von (3S,20S)-20-(1-Thio-2-ethyl)-pregn-7-en-3-ol (**31**, 100 mg, 0.28 mmol) und NEt₃ (19 µL, 14 mg, 0.14 mmol) in Dichlormethan (1.7 mL) wird 30 min bei RT gerührt und anschließend tropfenweise zu einer Lösung von 2,2'-Dithiodipyridin (61 mg, 0.28 mmol) in Dichlormethan (3.1 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 48 h bei RT gerührt und im Anschluss mit fünfprozentiger wässriger Natronlauge (2 x 10 mL) und Wasser (2 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 4:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als weißer Feststoff (94 mg, 0.20 mmol, 72 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 183 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +60.0^\circ$ ($c = 0.1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\nu_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 3356$ (O-H), 2940 (C-H), 2909 (C-H), 2871 (C-H), 2852 (C-H), 1654 (C=N), 1576 (C=C), 1561 (C=C), 1446 (C-H), 1420 (C-H), 1056 (C-O), 1044 (C-O), 766 (arom. C-H)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 8.53 - 8.43 (m, 1H, H-6''), 7.78 - 7.72 (m, 1H, H-3''), 7.69 - 7.64 (m, 1H, H-4''), 7.10 (ddd, $^3J_{\text{H}5''-\text{H}4''} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{H}5''-\text{H}6''} = 4.9$ Hz, $^4J_{\text{H}5''-\text{H}3''} = 1.0$ Hz, 1H, H-5''), 5.21 - 5.10 (m, 1H, H-7), 3.59 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 11.0$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{e}} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 2.92 - 2.85 (m, 1H, H-2'd), 2.77 - 2.70 (m, 1H, H-2'd'), 2.01 - 1.96 (m, 1H, H-12d), 1.89 - 1.16 (m, 22H), 1.11 - 1.03 (m, 1H, H-1d), 0.93 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.5$ Hz, 3H, H-21), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.52 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 161.2 (C-2''), 150.3 (C-6''), 139.4 (C-8), 138.1 (C-4''), 121.9 (C-5''), 120.9 (C-3''), 118.2 (C-7), 71.0 (C-3), 55.6 (C-17), 55.1 (C-14), 49.8 (C-9), 46.8 (C-2'), 44.0 (C-13), 43.8 (C-1'), 40.5 (C-5), 39.6 (C-12), 38.2 (C-4), 37.3 (C-1), 37.1 (C-20), 34.5 (C-10), 31.5 (C-2), 29.9 (C-6), 28.1 (C-16), 23.2 (C-15), 21.5 (C-11), 19.1 (C-21), 13.2 (C-19), 12.1 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 472 (2, $[\text{M}+1]^+$), 329 (2, $[\text{M}-\text{PyrSSH}+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 471 (2, $[\text{M}]^{+\bullet}$), 360 (16, $[\text{M}-\text{PyrSH}]^{+\bullet}$), 345 (8, $[\text{M}-\text{PyrSH}-\text{CH}_3]^{+\bullet}$)

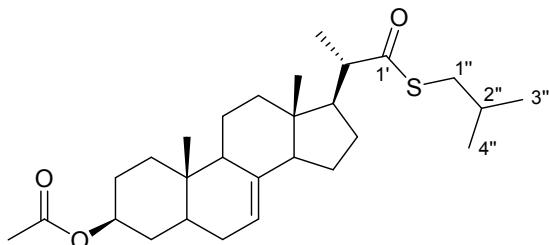
HRMS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 471.2629 (100.0, ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{NOS}_2$: 471.2630)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 71.15 (71.29), **H:** 8.63 (8.76), **N:** 2.75 (2.97), **S:** 13.92 (13.59)

6.2.19 Synthese der Thioester 33 - 35

Eine Lösung eines Thiols (0.39 mmol, 1 eq.), *N*-Methylimidazol (49 μ L, 48 mg, 0.58 mmol) und TMEDA (86 μ L, 67 mg, 0.58 mmol) in Acetonitril (0.4 mL) wird im Eisbad gerührt. Eine Lösung von (3*S*,20*S*)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäurechlorid (**11**, 163 mg, 0.39 mmol) in Dichlormethan (1.0 mL) wird langsam zugetropft und das Reaktionsgemisch 48 h bei RT gerührt. Es wird Wasser (5 mL) zugegeben und mit EtOAc (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (10 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/EtOAc 95:5).

(3*S*,20*S*)-20-(*t*Butylsulfanylcarbonyl-methyl)-pregn-7-en-3-yacetat (33)



$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3\text{S}$

M_r : 460.71 g/mol

Alkylthiol: *t*Butylthiol

Ausbeute: 126 mg (0.27 mmol, 71 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 145 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 15.0^\circ$ ($c = 3 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2959 (C-H), 2872 (C-H), 2848 (C-H), 1731 (C=O COOR), 1677 (C=O COSR), 1467 (Alkyl), 1446 (Alkyl), 1457 (Alkyl), 1381 (Alkyl), 1366 (Alkyl), 1254(C-O), 1029 (C-O), 968 (C=C-H)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.18 - 5.10 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.3 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.6 Hz, 1H, H-3), 2.80 (dd, ²J_{H1''d-H1''d'} = 13.3 Hz, ³J_{H1''d-H2''} = 6.6 Hz, 1H, H-1''d), 2.73 (dd, ²J_{H1''d'-H1''d} = 13.3 Hz, ³J_{H1''d'-H2''} = 6.6 Hz, 1H, H-1''d'), 2.59 (dq, ³J_{H20-H17} = 9.9 Hz, ³J_{H20-H21} = 6.8 Hz, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH₃CO), 1.94 (dt, ²J_{H12e-H12a} = 12.4 Hz, ³J_{H12e-H11e} = ³J_{H12e-H11a} = 3.4 Hz, 1H, H-12e), 1.88 - 1.23 (m, 19H), 1.21 (d, ³J_{H21-H20} = 6.8 Hz, 3H, H-21), 1.17 - 1.10 (m, 1H, H-1d), 0.95 (d, ³J_{H3'/H4'-H2'} = 6.7 Hz, 6H, H-3'', H-4''), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.57 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 203.7 (C-1'), 170.9 (CH₃CO), 139.0 (C-8), 118.0 (C-7), 73.5 (C-3), 54.4 (C-14), 52.7 (C-17), 52.4 (C-20), 49.3 (C-9), 43.7 (C-13), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 37.0 + 36.9 (C-1 + C-1''), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 28.9 (C-2''), 27.8 (C-2), 27.0 (C-16), 23.2 (C-15), 21.9 (C-3'' + C-4''), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 18.1 (C-21), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18).

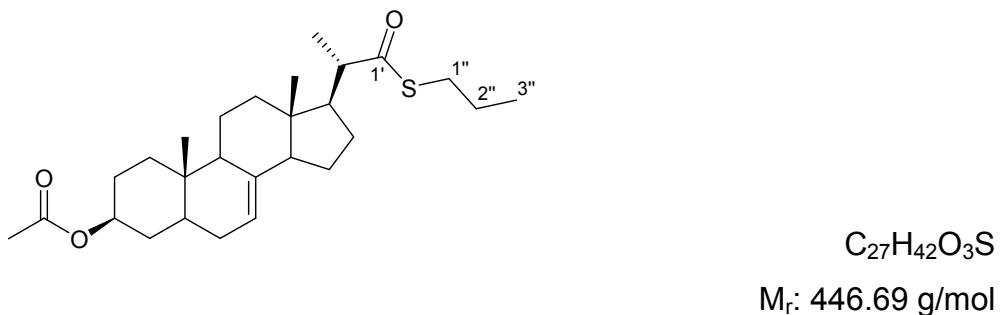
MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 461 (46, $[M+1]^+$), 401 (100, $[M-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$), 343 (64, $[M-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{OS}+1]^+$), 283 (50, $[M-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{OS}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$).

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 460 (8, $[M]^{+•}$), 343 (72, $[M-C_5H_9OS]^{+•}$), 283 (100, $[M-C_5H_9OS-CH_3COOH]^{+•}$).

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = ber.: 460.3011, gem.: 460.3007 (100%)

Elektrolyse (gem.ber., %): C: 72.94 (73.00), H: 9.64 (9.63), S: 7.35 (6.96)

(3S,20S)-20-(Propylsulfanylcarbonyl-methyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (34)



Alkylthiol: 1-Propylthiol**Ausbeute:** 98 mg (0.22 mmol, 56 %) gelblich-weißer Feststoff**Schmelzpunkt:** 152 °C**Spezifische Drehung:** $[\alpha]_D^{20} = + 75.0^\circ$ (c = 0.8x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2957 (C-H), 2926 (C-H), 2854 (C-H), 2809 (C-H), 1735 (C=O Ester), 1686 (C=O Thioester), 1459 (Alkyl), 1376 (Alkyl), 1260 (C-O), 1093 (C-O), 1031 (C-O), 964 (C=C-H), 802 (C=C-H)

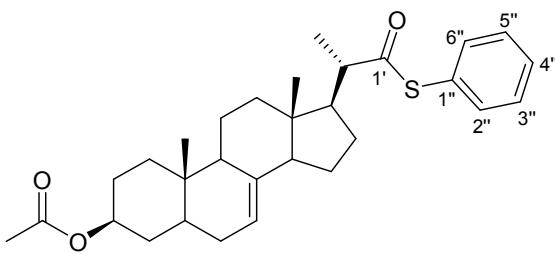
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.12 - 5.18 (m, 1H, H-7), 4.76 - 4.60 (m, 1H, H-3), 2.77 - 2.88 (m, 2H, H-1''), 2.62 - 2.53 (m, 1H, H-20), 2.03 (s, 3H, CH₃CO), 1.97 - 1.90 (m, 1H, H-12d), 1.87 - 1.30 (m, 20H), 1.21 (d, ³J_{H21-20} = 6.8 Hz, 3H, H-21), 1.17 - 1.09 (m, 1H, H-1d), 0.96 (t, ³J_{H3''-H2''} = 7.4 Hz, 3H, H-3''), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.55 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 203.8 (C-1'), 170.9 (CH₃CO), 139.0 (C-8), 118.0 (C-7), 73.6 (C-3), 54.4 (C-14), 52.7 (C-17), 52.3 (C-20), 49.3 (C-9), 43.7 (C-13), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 30.6 (C-1''), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.0 (C-16), 23.2 (C-15 + C-2''), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 18.1 (C-21), 13.5 (C-3''), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18).

MS (CI): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 447 (38, [M+1]⁺), 387 (100, [M-CH₃COOH+1]⁺), 371 (10, [M-PrSH+1]⁺), 343 (64, [M-HCOSPr+1]⁺), 311 (10, [M-CH₃COOH-PrSH+1]⁺), 283 (28, [M-HCOSPr-CH₃COOH+1]⁺)

MS (EI): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 446 (16, [M]⁺⁺), 371 (14, [M-SPr]⁺⁺), 343 (100, [M-COSPr]⁺⁺), 283 (90, [M-COSPr-CH₃COOH]⁺⁺)

HR-MS (EI): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 446.2861 (100, ber. für C₂₇H₄₂O₃S: 446.2855)

(3S,20S)-20-(Phenylsulfanylcarbonyl-methyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (35) $C_{30}H_{40}O_3S$ $M_r: 480.70 \text{ g/mol}$ **Alkylthiol:** Thiophenol**Ausbeute:** 119 mg (0.25 mmol, 64 %) gelblich-weißer Feststoff**schmelzpunkt:** 160 °C**Spezifische Drehung:** $[\alpha]_D^{20} = + 106.7^\circ$ ($c = 1.5 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 2943$ (C-H), 2869 (C-H), 2846 (C-H), 1735 (C=O Ester), 1697 (C=O Thioester), 1440 (Alkyl), 1364 (Alkyl), 1239 (C-O), 1030 (C-O), 961 (C=C-H), 745 (Ar), 687 (Ar)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.45 - 7.37 (m, 5H, H-Ar), 5.21 - 5.12 (m, 1H, H-7), 4.70 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{e}} = 4.6$ Hz, 1H, H-3), 2.70 (dq, 1H, $^3J_{\text{H}2\text{0}-\text{H}1\text{7}} = 10.0$ Hz, $^3J_{\text{H}2\text{0}-\text{H}2\text{1}} = 6.8$ Hz, 1H, H-20), 2.03 (s, CH_3CO , 3H), 1.98 - 1.92 (m, 1H, H-12d), 1.93 - 1.32 (m, 21H), 1.27 - 1.23 (m, 1H, H-6d), 1.30 (d, $^3J_{\text{H}2\text{1}-\text{H}2\text{0}} = 6.8$ Hz, 3H, H-21), 1.18-1.08 (m, 1H, H-1d), 0.82 (s, 3H, H-19), 0.59 (s, 3H, H-18).

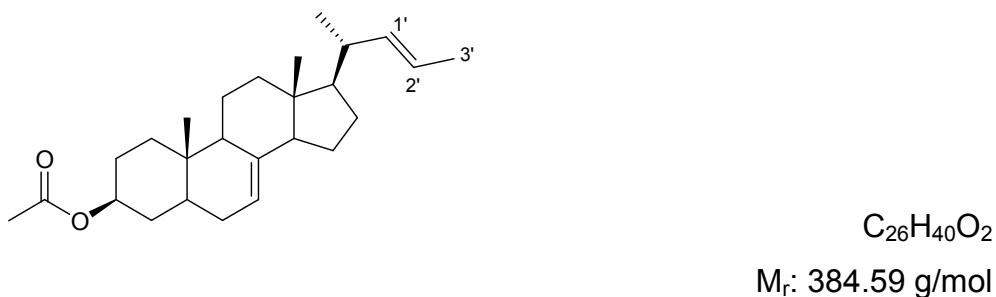
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 201.2 (C-1'), 170.9 (CH_3CO), 138.9 (C-8), 134.5, 129.3, 129.3 (5C, C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6''), 128.2 (C-1''), 118.1 (C-7), 73.5 (C-3), 54.4 (C-14), 52.9 (C-17), 52.0 (C-20), 49.3 (C-9), 43.8 (C-13), 40.1 (C-5), 39.3 (C-12), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.1 (C-16), 23.2 (C-15), 21.6 (CH_3CO), 21.5 (C-11), 18.0 (C-21), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18)

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 481 (100, $[M+1]^+$), 421 (100, $[M-CH_3COOH+1]^+$), 371 (10, $[M-PhSH+1]^+$), 343 (54, $[M-CHOSPh+1]^+$), 311 (10, $[M-PhSH-CH_3COOH+1]^+$), 283 (30, $[M-CHOSPh-CH_3COOH+1]^+$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 480.2693 (100, ber. für $C_{30}H_{40}O_3S$: 480.2698)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 75.06 (74.96), **H:** 8.42 (8.39), **S:** 6.64 (6.67)

6.2.20 (3S,20S)-20-((E)-Prop-1-enyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (36)



Eine Lösung von Ethyltriphenylphosphoniumbromid (199 mg, 0.54 mmol) in THF (4.0 mL) wird auf 0 °C gekühlt und mit $^7\text{BuLi}$ (1.6 M in THF, 340 μL , 35 mg, 0.54 mmol) versetzt. Nach Erwärmen auf RT wird tropfenweise eine Lösung von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (3, 200 mg, 0.54 mmol) in THF (4.0 mL) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt und anschließend mit Wasser (10 mL) versetzt. Das Gemisch wird mit Diethylether (2 x 10 mL) und Dichlormethan (10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/EtOAc 9:1) und das Produkt als weißer Feststoff (42 mg, 0.11 mmol, 20 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 168 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +4.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 2947$ (C-H), 2848 (C-H), 1734 (C=O Ester), 1447 (Alkyl), 1368 (Alkyl), 1248 (C-O), 1032 (C-O), 905 (C=C-H),

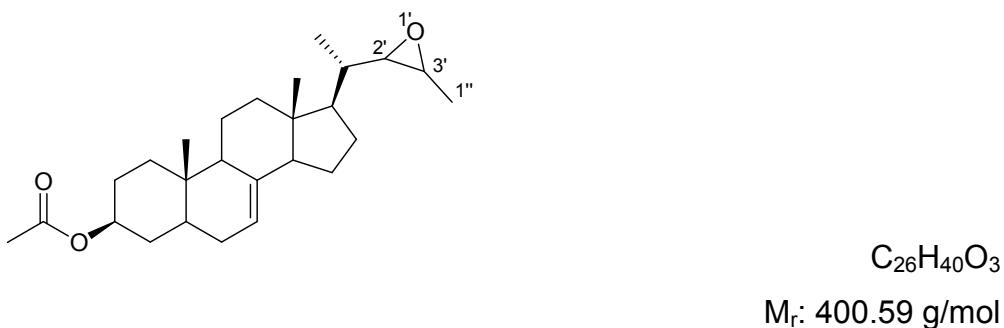
¹H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.40 - 5.05 (m, 3H, H-7, H-1', H-2'), 4.77 - 4.61 (m, 1H, H-3), 2.52 - 2.29 (m, 1H, H-20), 2.02 (s, CH_3CO , 3H) + 2.10 - 1.92 (m, 1H, H-12d), 1.89 - 1.25 (m, 22H), 0.96 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.7$ Hz, 3H, H-21), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.57 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 170.8 (CH_3CO), 139.6 (C-8), 137.6 (C-1'), 120.6 (C-2'), 117.5 (C-7), 73.6 (C-3), 56.3 (C-17), 55.2 (C-14), 49.4 (C-9), 43.4 (C-13), 40.2 (C-5), 39.6 (C-12), 37.0 (C-1), 34.4 (C-20), 34.2 (C-10), 34.0 (C-4), 29.9 (C-3'), 29.7 (C-6), 27.7 (C-16), 27.6 (C-2), 23.0 (C-15), 21.6 ($\text{CH}_3\text{CO} + \text{C-11}$), 20.8 (C-21), 13.1 (C-19), 12.3 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 385 (20, $[\text{M}+1]^+$), 325 (100, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 384.2999 (100, ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_2$: 384.3028)

6.2.21 (3S,20S)-20-(3-Methyloxiran-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (37)



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von *m*CPBA (45 mg, 0.35 mmol) in Diethylether (0.4 mL) wird (3S,20S)-20-((*E*)-Prop-1-enyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**28**, 100 mg, 0.26 mmol) portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei 0 °C gerührt und anschließend mit Diethylether (5 mL) verdünnt. Es wird mit 10%-iger

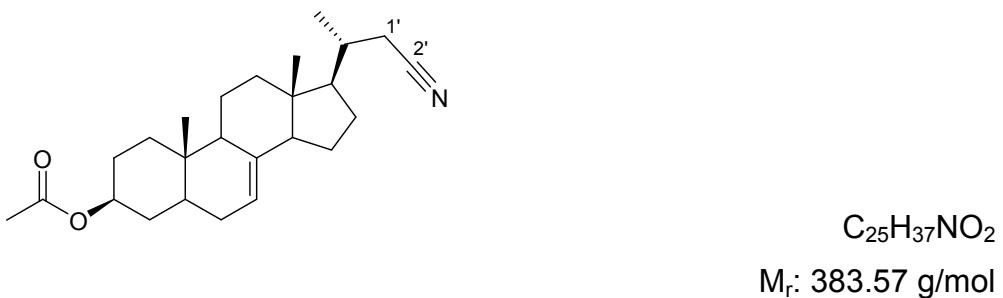
Natronlauge (5 mL) und Wasser (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Massenspektrometrische Analytik des Rohprodukts:

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 415 (50, $[\text{M}^2-\text{H}_2+1]^+$), 397 (28, $[\text{M}^2-\text{H}_2-\text{H}_2\text{O}+1]^+$), 389 (10, $[\text{M}^2-\text{H}_2-\text{C}_2\text{H}_2+1]^+$), 373 (26, $[\text{M}^2-\text{H}_2-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}+1]^+$), 355 (100, $[\text{M}^2-\text{H}_2-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$), 337 (44, $[\text{M}^2-\text{H}_2-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}+1]^+$), 329 (30, $[\text{M}^2-\text{H}_2-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{C}_2\text{H}_2+1]^+$), 313 (22, $[\text{M}^2-\text{H}_2-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}+1]^+$) / 399 (8, $[\text{M}^1-\text{H}_2+1]^+$), 373 (26, $[\text{M}^1-\text{H}_2-\text{C}_2\text{H}_2+1]^+$), 359 (24, $[\text{M}^1-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}+1]^+$), 357 (12, $[\text{M}^1-\text{H}_2-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}+1]^+$), 341 (12, $[\text{M}^1-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$), 339 (14, $[\text{M}^1-\text{H}_2-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$), 337 (44, $[\text{M}^2-\text{H}_2-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{O}+1]^+$), 329 (30, $[\text{M}^2-\text{H}_2-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{C}_2\text{H}_2+1]^+$), 313 (22, $[\text{M}^2-\text{H}_2-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}+1]^+$)

Die massenspektrometrische Analytik des Rohprodukts deutet neben den möglichen einfach epoxidierten Produkten **37a** und **37b** (M^1 , vgl.: Kapitel 3.2.3, Abbildung 49) auf ein zweifach epoxidiertes Produkt **37c** (M^2 , vgl.: Kapitel 3.2.3, Abbildung 49) hin.

6.2.22 (3S,20S)-20-Cyanomethylpregn-7-en-3-ylacetat (38)



Eine Suspension von (3S,20S)-20-Brommethylpregn-7-en-3-ylacetat (**7**, 100 mg, 0.23 mmol) und Kaliumcyanid (74 mg, 1.14 mmol) in Aceton (1.0 mL) wird 16 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird das Reaktionsgemisch fast bis zur Trockne eingedampft, in Dichlormethan (5 mL) wieder aufgenommen und über Celit filtriert. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1) aufgereinigt. Das Nitril **30** wird als weißer Feststoff (35 mg, 0.09 mmol, 38 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 162 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +2.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2950 (C-H), 2894 (C-H), 2280 (C≡N), 1734 (C=O), 1474 (Alkyl), 1448 (Alkyl), 1380 (Alkyl), 1364 (Alkyl), 1240 (C-O), 1032 (C=C-H)

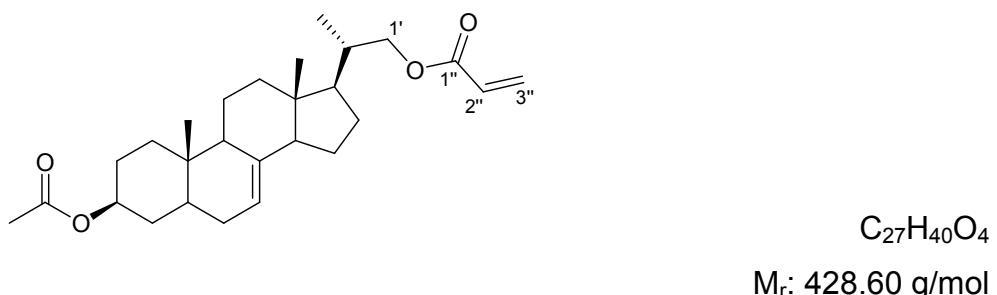
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.21 - 5.08 (m, 1H, H-7), 4.77 - 4.59 (m, 1H, H-3), 3.50 (dd, $^2J_{\text{H}1'd-\text{H}1'd'} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H}1'd-\text{H}20} = 2.6$ Hz, 1H, H-1'd), 3.34 (dd, $^2J_{\text{H}1'd'-\text{H}1'd} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H}1'd'-\text{H}20} = 6.1$ Hz, 1H, H-1'd'), 2.02 (s, 3H, CH_3CO), 2.00 - 1.95 (m, 1H, H-12d), 1.88 - 1.23 (m, 21H), 1.19 - 1.12 (m, 1H, H1d), 1.09 (d, $^3J_{\text{H}21-20} = 6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.55 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 170.9 (CH_3CO), 157.9 (C-2'), 139.0 (C-8), 118.0 (C-7), 73.6 (C-3), 54.9 (C-14), 53.9 (C-17), 49.3 (C-9), 43.7 (C-13), 40.1 (C-5), 39.3 (C-12), 28.5 (C-1'), 37.5 (C-20), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.4 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (CH_3CO), 21.5 (C-11), 18.5 (C-21), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 384 (48, $[\text{M}+1]^+$), 324 (100, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 383.2830 (100.0, ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{NO}_2$: 383.2824)

6.2.23 (3S,20S)-20-(Propenoyloxymethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (39)



Eine Lösung von (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 130 mg, 0.35 mmol) in Dichlormethan (1.0 mL) wird unter Schutzgas auf 0 °C gekühlt. Triethylamin (121 µL, 88 mg, 0.87 mmol) und Acryloylchlorid (56 µL, 63 mg, 0.69 mmol) werden tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 30 min bei 0 °C und 16 h bei RT gerührt. Es wird mit Diethylether (5 mL) verdünnt und mit verdünnter Salzsäure (2 M, 2 x 5 mL), gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 x 5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (5 mL) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ wird die organische Phase im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1) aufgereinigt. Das Produkt **31** wird als weißer Feststoff (35 mg, 0.08 mmol, 23 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 167 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 2.0^\circ$ (c = 0.5x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 3429, 2926 (C-H), 2869 (C-H), 2851 (C-H), 1725 (C=O), 1636 (C=C), 1618 (C=C), 1466 (Alkyl), 1410 (Alkyl), 1377 (Alkyl), 1247 (C-O), 1181 (C-O), 1053 (C-O), 1029 (C-O), 988 (C=C-H), 812 (C=C-H)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 6.39 (dd, ³J_{H3"E-H2"} = 17.3 Hz, ²J_{H3"E-H3"Z} = 1.5 Hz, 1H, H-3"E), 6.13 (dd, ³J_{H2"-H3"E} = 17.3 Hz, ³J_{H2"-H3"Z} = 10.4 Hz, 1H, H-2"), 5.81 (dd, ³J_{H3"Z-H2"} = 10.4 Hz, ²J_{H3"Z-H3"E} = 1.5 Hz, 1H, H-3"Z), 5.18 - 5.11 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.2 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.5 Hz, 1H, H-3), 4.17 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 10.8 Hz, ³J_{H1'd-H20} = 3.2 Hz, 1H, H-1'd), 3.87 (dd, ²J_{H1'd'-H1'd} = 10.8 Hz, ³J_{H1'd'-H20} = 7.4 Hz, 1H, H-1'd'), 2.02 (s, 3H, CH₃CO) + 2.04 - 1.97 (m, 1H, H-12d), 1.93 - 1.20 (m, 19H), 1.17 - 1.09 (m, 1H, H-1d), 1.04 (d, ³J_{H21-H20} = 6.6 Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.56 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 170.9 (CH₃CO), 166.6 (C-1"), 139.2 (C-8), 130.6 (C-3"), 128.8 (C-2"), 117.8 (C-7), 73.6 (C-3), 69.7 (C-1'), 54.8 (C-14) 52.8 (C-17), 49.3 (C-9), 43.7 (C-13), 40.2 (C-5), 39.4 (C-12), 37.0 (C-1), 36.4 (C-20), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.6 (C-16), 23.2 (C-15), 21.6 (C-11), 21.6 (CH₃CO), 17.5 (C-21), 13.1 (C-19), 12.1 (C-18).

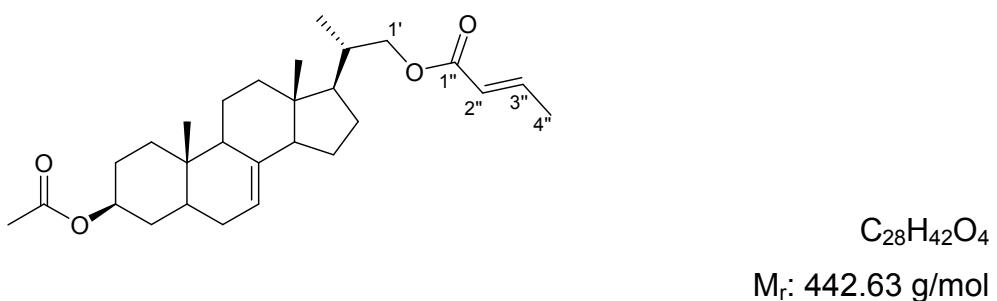
MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 369 (76, $[M-CH_3COOH+1]^+$), 357 (100, $[M-CH_2CHCOOH+1]^+$), 297 (80, $[M-CH_2CHCOOH-CH_3COOH+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 428 (42, $[M]^{+*}$), 413 (10, $[M-CH_3]^{+*}$), 368 (82, $[M-CH_3COOH]^{+*}$), 356 (20, $[M-CH_2CHCOOH]^{+*}$), 353 (50, $[M-CH_3-CH_3COOH]^{+*}$), 341 (36, $[M-CH_3COOH-C_2H_3]^{+*}$), 313 (20, $[M-CH_3CHCHCOOH-C_2H_3O]^{+*}$), 296 (12, $[M-CH_2CHCOOH-CH_3COOH+1]^{+*}$), 281 (48, $[M-CH_2CHCOOH-CH_3COOH-CH_3]^{+*}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 428.29200 (100, ber. für $C_{27}H_{40}O_4$: 428.29266)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 75.43 (75.66), **H:** 9.95 (9.41)

6.2.24 (3S,20S)-20-((E)-But-2-enoyloxymethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (40)



Eine Lösung von (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 130 mg, 0.35 mmol) in THF (0.8 mL) wird unter Schutzgas auf -78 °C gekühlt. $^7\text{BuLi}$ in Hexan (2.5 M, 146 μL , 0.36 mmol) wird zugetropft und die Reaktionslösung 30 min bei -78 °C gerührt. Crotonylchlorid (50 μL , 55 mg, 0.52 mmol) wird tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird langsam auf RT erwärmt und 16 h gerührt bevor mit Diethylether (10 mL) verdünnt wird. Es wird mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (5 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit Dichlormethan (5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft und säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als weißer Feststoff (87 mg, 0.20 mmol, 57 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 153 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +8.0^\circ$ ($c = 0.5 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2948 (C-H), 2870 (C-H), 2851 (C-H), 1735 (C=O), 1715 (C=O), 1655 (C=C), 1466 (Alkyl), 1446 (Alkyl), 1369 (Alkyl), 1247 (C-O), 1171 (C-O), 1101 (C-O), 1032 (C-O), 1002 (C=C-H), 970 (C=C-H)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 6.96 (dq, $^3J_{\text{H}3''-\text{H}2''} = 15.4$ Hz, $^3J_{\text{H}3''-\text{H}4''} = 6.9$ Hz, 1H, H-3''), 5.85 (dq, $^3J_{\text{H}2''-\text{H}3''} = 15.5$ Hz, $^4J_{\text{H}2''-\text{H}4''} = 1.7$ Hz, 1H H-2''), 5.21 - 5.10 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{e}} = 4.4$ Hz, 1H, H-3), 4.13 (dd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}1'\text{d}'} = 10.8$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}2\text{O}} = 3.4$ Hz, 1H, H-1'd), 3.84 (dd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}1'\text{d}} = 10.8$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}2\text{O}} = 7.4$ Hz, 1H, H-1'd'), 2.01 (s, 3H, CH_3CO), 1.88 (dd, $^3J_{\text{H}4''-\text{H}3''} = 6.9$ Hz, $^4J_{\text{H}4''-\text{H}2''} = 1.7$ Hz, 3H, H-4''), 1.84 - 1.09 (m, 21H), 1.03 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}2\text{O}} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.56 (s, 3H, H-18).

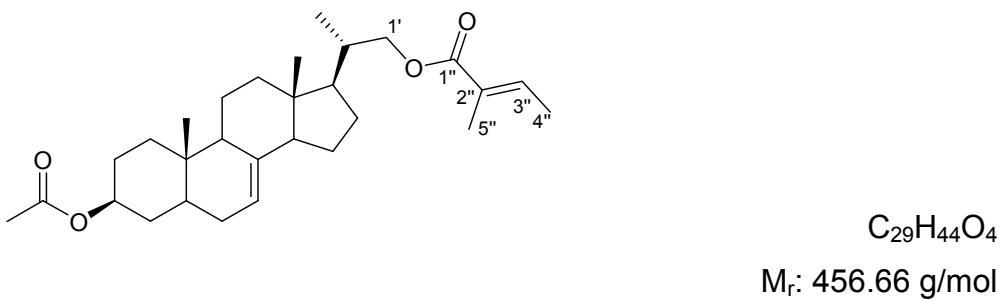
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 171.0 (CH_3CO), 167.1 (C-1''), 144.6 (C-3''), 139.3 (C-8), 123.1 (C-2''), 117.8 (C-7), 73.7 (C-3), 69.4 (C-1'), 54.9 (C-14), 52.9 (C-17), 49.4 (C-9), 43.7 (C-13), 40.2 (C-5), 39.5 (C-12), 37.0 (C-1), 36.5 (C-20), 34.4 (C-10), 34.0 (C-4), 29.7 (C-6), 27.7 (C-2), 27.6 (C-16), 23.2 (C-15), 21.7 (CH_3CO), 21.6 (C-11), 18.2 (C-4''), 17.6 (C-21), 13.2 (C-19), 12.1 (C-18)

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 383 (60, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$), 357 (100, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHCHCOOH}+1]^+$), 297 (100, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHCHCOOH}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 442 (14, $[\text{M}]^{++}$), 382 (26, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}]^{++}$), 356 (30, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHCHCOOH}]^{++}$), 341 (34, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHCHCOOH}-\text{CH}_3]^{++}$), 313 (48, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHCHCOOH}-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^{++}$), 296 (14, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHCHCOOH}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^{++}$), 281 (48, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHCHCOOH}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3]^{++}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 442.3089 (100, ber.: $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_4$, 442.3083)

6.2.25 (3S,20S)-20-[(*E*)-2-Methylbut-2-enoyloxy]-methyl]-pregn-7-en-3-yl-acetat (41)



Zu einer Lösung von Tiglinsäure (40 mg, 0.40 mmol) und (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 100 mg, 0.27 mmol) in Dichlormethan (1.3 mL) wird DMAP (4 mg, 0.03 mmol) gegeben. Nach 10 min Rühren wird portionsweise DCC (83 mg, 0.40 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei RT gerührt. Der entstehende Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und mit kaltem EtOAc gewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und der Rückstand in kaltem EtOAc aufgenommen. Der hierbei erneut ausfallende Dicyclohexylharnstoff wird entfernt. Dieser Vorgang wird bis zur vollständigen Entfernung des Dicyclohexylharnstoffs wiederholt. Der nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum resultierende Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/EtOAc 95:5 → 90:10). Das Produkt fällt als weißer Feststoff (55 mg, 0.12 mmol, 44 %) an.

Schmelzpunkt: 139 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 15.0^\circ$ ($c = 0.4 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 2948$ (C-H), 2870 (C-H), 2850 (C-H), 1733 (C=O), 1711 (C=O), 1653 (C=C), 1447 (Alkyl), 1381 (Alkyl), 1247 (C-O), 1152 (C-O), 1135 (C-O), 1074 (C-O), 1033 (C-O), 973 (C=C-H), 738 (C=C-H)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 6.85 (qq, $^3J_{\text{H}3''-\text{H}4''} = 7.0$ Hz, $^4J_{\text{H}3''-\text{H}5''} = 1.4$ Hz, 1H, H-3''), 5.18 - 5.14 (m, 1H, H-7), 4.70 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{e}} = 4.6$ Hz, 1H, H-3), 4.15 (dd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}1'\text{d}'} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}2\text{O}} = 3.4$ Hz, 1H, H-1'd), 3.84 (dd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}'-\text{H}1'\text{d}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}'-\text{H}2\text{O}} = 7.4$ Hz, 1H, H-1'd'), 2.03 (s, 3H,

CH_3CO) + 2.04 - 2.00 (m, 1H, H-12d), 1.92 - 1.21 (m, 25H), 1.17 - 1.10 (m, 1H, H-1d), 1.05 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.57 (s, 3H, H-18).

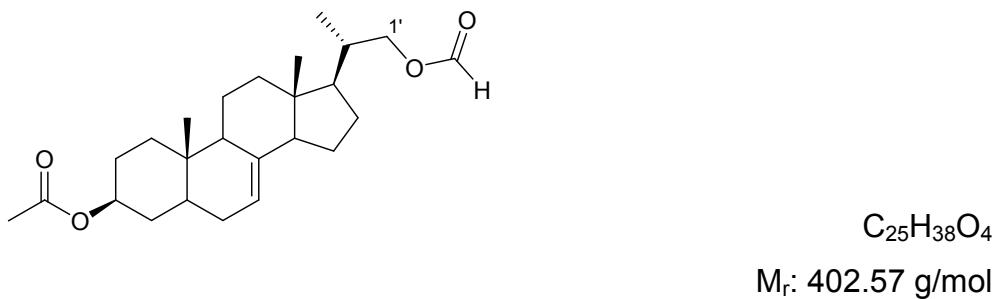
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 170.8 (CH_3CO), 168.5 (C-1''), 139.3 (C-8), 136.9 (C-3''), 129.0 (C-2''), 117.8 (C-7), 73.6 (C-3), 69.6 (C-1'), 54.8 (C-14), 53.0 (C-17), 49.4 (C-9), 43.7 (C-13), 40.2 (C-5), 39.5 (C-12), 37.0 (C-1), 36.5 (C-20), 34.4 (C-10), 33.9 (C-4), 29.7 (C-6), 27.6 (C-2), 27.6 (C-16), 23.2 (C-15), 21.60 ($\text{CH}_3\text{CO} + \text{C-11}$), 17.6 (C-21), 14.5 (C-4''), 13.1 (C-19), 12.2 (C-5''), 12.1 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 457 (2, $[\text{M}+1]^+$), 397 (19, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$), 357 (32, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{COOH}+1]^+$), 297 (34, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$), 101 (100, $[\text{CH}_3\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{COOH}+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 456 (18, $[\text{M}]^{++}$), 396 (30, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}]^{++}$), 381 (18, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3]^{++}$), 356 (50, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{COOH}]^{++}$), 341 (46, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{COOH}-\text{CH}_3]^{++}$), 313 (100, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{COOH}-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^{++}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 456.32409 (100, ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_4$: 456.32396)

6.2.26 (3S,20S)-20-(Formyloxymethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (42)



Eine Lösung von (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 270 mg, 0.72 mmol) in Chloroform (0.5 mL) wird mit Tiglinsäure (48 mg, 0.48 mmol), *para*-Toluolsulfinsäure (3 mg, 0.02 mmol) und *ortho*-Ameisensäuretrimethylester (63 μL , 62 mg, 0.58 mmol) versetzt und 2 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wird

mit Chloroform (5 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger Natriumhydrogen-carbonat-Lösung (5 mL) und Wasser (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 95:5 → 90:10) aufgereinigt und das Produkt **34** als weißer Feststoff (103 mg, 0.26 mmol, 45 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 142 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -14.0^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2948 (C-H), 2871 (C-H), 2850 (C-H), 1732 (C=O), 1469 (Alkyl), 1445 (Alkyl), 1382 (Alkyl), 1366 (Alkyl), 1249 (C-O), 1165 (C-O), 1032 (C-O), 897 (C=C-H)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 8.09 (s, 1H, CHO), 5.18 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.2 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.8 Hz, 1H, H-3), 4.19 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 10.7 Hz, ³J_{H1'd-H20} = 3.2 Hz, 1H, H-1'd), 3.90 (dd, ²J_{H1'd'-H1'd} = 10.7 Hz, ³J_{H1'd'-H20} = 7.3 Hz, 1H, H-1'd'), 2.02 (s, 3H, CH₃CO) + 2.04 - 1.96 (m, 1H, H-12d), 1.90 - 1.20 (m, 20H), 1.17 - 1.08 (m, 1H, H-1d), 1.04 (d, ³J_{H21-H20} = 6.6 Hz, 3H, H-21), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.56 (s, 3H, H-18)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 170.9 (CH₃CO), 161.5 (CHO), 139.2 (C-8), 117.9 (C-7), 73.6 (C-3), 69.1 (C-1'), 54.8 (C-14), 52.6 (C-17), 49.3 (C-9), 43.6 (C-13), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 36.3 (C-20), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.5 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (C-11), 21.6 (CH₃CO), 17.4 (C-21), 13.1 (C-19), 12.0 (C-18).

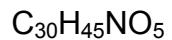
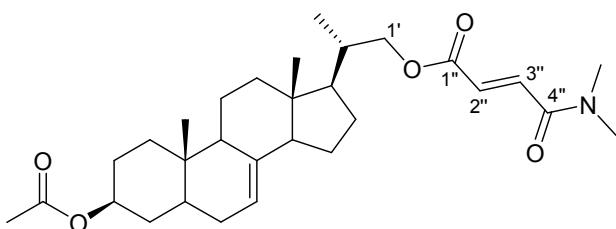
MS (Cl): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 357 (30, [M-HCOOH+1]⁺), 343 (100, [M-CH₃COOH+1]⁺), 297 (54, [M-CH₃COOH-HCOOH+1]⁺)

MS (EI): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 402 (70, [M]⁺⁺), 387 (22, [M-CH₃]⁺⁺), 342 (60, [M-CH₃COOH]⁺⁺), 327 (60, [M-CH₃COOH-CH₃]⁺⁺)

HR-MS (EI): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 402.27946 (100, ber. für C₂₅H₃₈O₄: 402.27701)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 74.74 (74.59), **H:** 9.87 (9.51)

6.2.27 (E)-(3S,20S)-20-(N,N-Dimethylamino-1,4-dioxobut-2-enylcarboxymethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (43)



M_r : 499.68 g/mol

Zu einer gerührten Lösung von (*E*)-3-Dimethylcarbamoyl-acrylsäure (**49**, 100 mg, 0.70 mmol) in Dichlormethan (5.0 mL) wird Oxalylchlorid (293 μ L, 434 mg, 3.42 mmol) und ein Tropfen DMF gegeben. Nach einer Stunde wird das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt und das entstandene (*E*)-3-Dimethylcarbamoyl-acryloylchlorid erneut in Dichlormethan (0.4 mL) aufgenommen. Eine Lösung von (3*S*,20*S*)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 100mg, 0.27 mmol), *N*-Methylimidazol (32 μ L, 33 mg, 0.40 mmol), und TMEDA (60 μ L, 46 mg, 0.40 mmol) in Acetonitril (0.3 mL) wird im Eisbad gekühlt. Die Lösung von (*E*)-3-Dimethylcarbamoylacyloylchlorid wird langsam zugetropft und das Reaktionsgemisch 24 h bei RT gerührt. Es wird Wasser (10 mL) zugegeben und mit EtOAc (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (10 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1) aufgereinigt. Das Produkt fällt als weißer Feststoff (60 mg, 0.12 mmol, 46 %) an.

Schmelzpunkt: 154 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -3.0^\circ$ ($c = 2 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} \text{ (cm}^{-1}\text{)} = 2944 \text{ (C-H), } 2874 \text{ (C-H), } 2851 \text{ (C-H), } 1727 \text{ (C=O), } 1659$ (C=O), 1623 (C=O), 1473 (Alkyl), 1446 (Alkyl), 1381 (Alkyl), 1366 (Alkyl), 1288 (C-O), 1262 (C-O), 1173 (C-O), 1033 (C-O), 973 (C=C-H)

Doppelter Satz der NMR-Signale aufgrund von Rotameren:

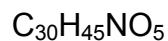
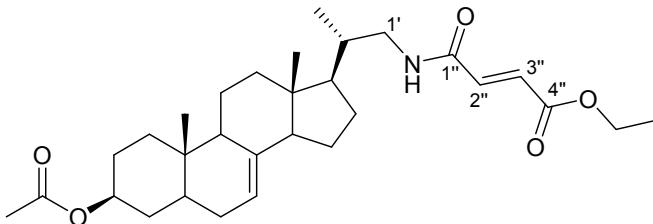
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.41 (d, ³J_{H2"-H3"} = 15.3 Hz) + 7.40 (d, ³J_{H2"-H3"} = 15.3 Hz) (1H, H-2"), 6.79 (d, ³J_{H3"-H2"} = 15.3 Hz) + 6.78 (d, ³J_{H3"-H2"} = 15.3 Hz) (1H, H-3"), 5.22 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.76 - 4.62 (m, 1H, H-3), 3.65 - 3.50 (m) + 3.48 - 3.39 (m) + 3.22 - 3.08 (m) (2H, H-1'), 3.03 (s) + 2.93 (s) (6H, 2 x NCH₃), 2.03 (s, 3H, CH₃CO) + 2.07 - 1.98 (m, 1H, H-12d), 1.90 - 1.22 (m, 19H), 1.18 - 1.06 (m, 1H, H-1d), 0.90 + 0.89 (2d, ³J_{H21-H20} = 6.5 Hz, 3H, H-21), 0.80 + 0.80 (s, 3H, H-19), 0.56 + 0.55 (2s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 171.1 + 171.1 (CH₃CO), 166.2 + 166.2 (C-1"), 166.5 + 165.5 (C-4"), 139.4 + 139.2 (C-8), 134.5 + 134.5 (C-3"), 131.4 + 131.3 (C-2"), 118.3 + 118.0 (C-7), 73.8 + 73.7 (C-3), 61.5 + 61.4 (C-1'), 56.0 (C-1'), 55.0 + 54.9 (C-14), 54.8 + 54.6 (C-17), 49.5 + 49.5 (C-9), 44.1 + 44.1 (C-13), 40.3 (C-5), 39.6 (C-12), 37.1 (C-1), 36.9 + 36.7 (NCH₃), 35.7 (C-20), 34.9 (C-10), 34.5 + 34.1 (C-4), 29.8 (C-6), 28.2 + 28.1 (C-2), 27.8 (C-16), 23.4 + 23.4 (C-15), 21.8 (CH₃CO), 21.7 (C-11), 17.1 + 16.9 (C-21), 13.3 (C-19), 12.3 + 12.3 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 500 (20, [M+1]⁺), 485 (12, [M-CH₃+1]⁺), 440 (100, [M-CH₃COOH+1]⁺); 357 (18, [M-(CH₃)₂NCOCHCHCOOH+1]⁺), 297 (8, [M-(CH₃)₂NCOCHCHCOOH-CH₃COOH+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 499.3303 (100, ber. für C₃₀H₄₅NO₅: 499.3298)

3.2.28 (3S,20S)-20-((E)-4-Ethoxy-1,4-dioxobut-2-enylamino)-pregn-7-en-3-yl-acetat (44)



M_r : 499.68 g/mol

Eine Lösung von Monoethylfumarat (116 mg, 0.80 mmol) in Dichlormethan (1.0 mL) wird auf -20 °C gekühlt. *N*-Methylmorpholin (88 µL, 81 mg, 0.80 mmol) und Ethylchloroformiat (76 µL, 87 mg, 0.80 mmol) werden zugegeben und die Lösung 30 min gerührt. Eine Lösung von (3S,20S)-20-(Aminomethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**38**, 150 mg, 0.40 mmol) in Dichlormethan (0.2 mL) wird zugegeben und weitere 30 min bei - 20 °C sowie anschließend 4 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit Dichlormethan (5 mL) verdünnt und mit wässriger 2%-iger Zitronensäure (5 mL), gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingedampft. Der daraus resultierende Rückstand wird säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1) aufgereinigt und das Produkt als gelblich-weißer Feststoff (170 mg, 0.34 mmol, 85 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 139 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -2.3^\circ$ ($c = 4 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2949 (C-H), 2874 (C-H), 2851 (C-H), 1730 (C=O), 1656 (C=O), 1628 (C=O), 1474 (Alkyl), 1445 (Alkyl), 1379 (Alkyl), 1365 (Alkyl), 1289 (C-O), 1241 (C-O), 1032 (C-O), 897 (C=C-H)

Doppelter Satz der NMR-Signale aufgrund von Rotameren:

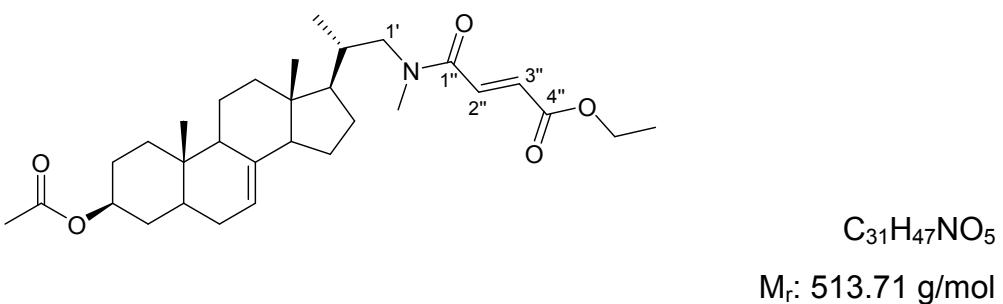
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.42 (d, ³J_{H3"-H2"} = 15.2 Hz, 1H, H-3"), 6.76 (d, ³J_{H2"-H3"} = 15.3 Hz, 1H, H-2"), 5.21 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.74 - 4.60 (m, 1H, H-3), 4.31 - 4.17 (m, 2H, OCH₂), 3.55 - 3.41 + 3.37 - 3.35 + 3.02 - 2.86 (3m, 2H, H-1'), 2.05 - 1.97 (m, 4H, CH₃CO + H-12d), 1.90 - 1.07 (m, 24H), 0.90 + 0.88 (2d, ³J_{H21-H20} = 7.1 Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.55 + 0.55 (2s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 170.9 (CH₃CO), 166.1 (C-4"), 165.4 (C-1"), 139.2 + 139.0 (C-8), 134.9 (C-3"), 130.8 (C-2"), 118.1 + 117.8 (C-7), 73.6 + 73.5 (C-3), 61.2 (OCH₂CH₃), 54.8 + 54.7 (C-1'), 54.7 (C-14), 54.4 (C-17), 49.3 + 49.3 (C-9), 43.9 + 43.9 (C-13), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 35.1 (C-20), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 28.0 (C-2), 27.6 (C-16), 23.3 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 17.1 + 16.9 (C-21), 14.3 (OCH₂CH₃), 13.1 (C-19), 12.1 + 12.0 (C-18).

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 499 (8, [M]⁺•), 356 (8, [M-H₂NCOCHCHCOOEt]⁺•), 313 (30, [M-H₂NCOCHCHCOOEt-CH₃CO]⁺•)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 499.3299 (2.3, ber. für C₃₀H₄₅NO₅: 499.3298)

3.2.29 (3S,20S)-20-((E)-N-Methyl-4-ethoxy-1,4-dioxobut-2-enylamino)-pregn-7-en-3-yl-acetat (45)



Zu einer auf -20 °C gekühlten Lösung von Monoethylfumarat (149 mg, 1.03 mmol) in Dichlormethan (2.0 mL) wird *N*-Methylmorpholin (114 µL, 104 mg, 1.03 mmol) und

Ethylchloroformiat (98 μ L, 112 mg, 1.03 mmol) zugegeben und die Lösung 30 min gerührt. (3S,20S)-20-(Methylamino-methyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**39**, 200 mg, 0.52 mmol) wird zugegeben und das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt. Es wird 16 h gerührt und anschließend zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in EtOAc (10 mL) aufgenommen. Die organische Lösung wird mit 2%-iger Zitronensäure (5 mL), gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 4:1) aufgereinigt. **45** wird als gelblich-weißer Feststoff (154 mg, 0.31 mmol, 60 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 158 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -6.3^\circ$ ($c = 3 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2950 (C-H), 2876 (C-H), 2850 (C-H), 1734 (C=O), 1660 (C=O), 1636 (C=O), 1450 (Alkyl), 1382 (Alkyl), 1360 (Alkyl), 1238 (C-O), 1032 (C-O), 901 (C=C-H)

Doppelter Satz der NMR-Signale aufgrund von Rotameren:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.40 (2d, $^3J_{\text{H}3''-\text{H}2''} = 15.3$ Hz, 1H, H-3''), 6.78 (2d, $^3J_{\text{H}2''-\text{H}3''} = 15.3$ Hz, 1H, H-2''), 5.22 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.76 - 4.62 (m, 1H, H-3), 4.25 (q, $^3J_{\text{OCH}_2\text{CH}_3-\text{OCH}_2\text{CH}_3} = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2), 3.51 (dd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}1'\text{d}'} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}-\text{H}2\text{d}} = 11.2$ Hz) + 3.35 (dd, $^2J_{\text{H}1'\text{d}'-\text{H}1'\text{d}} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H}1'\text{d}'-\text{H}2\text{d}} = 3.5$ Hz) + 3.18 - 3.10 (m) (2H, H1'd + H1'd'), 3.08 + 2.98 (2s, 3H, NCH_3), 2.07 - 1.98 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CO} + \text{H-12d}$), 1.89 - 1.08 (m, 23H), 0.90 + 0.89 (2d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.5$ Hz, 3H, H-21), 0.80 + 0.80 (2s, 3H, H-19), 0.56 + 0.56 (2s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 171.1 + 171.1 (CH_3CO), 166.2 + 166.2 (C-4''), 165.5 + 165.3 (C-1''), 139.4 + 139.2 (C-8), 134.5 + 134.5 (C-3''), 131.4 + 131.3 (C-2''), 118.3 + 118.0 (C-7), 73.8 + 73.7 (C-3), 61.5 + 61.4 (OCH_2), 56.0 + 53.9 (C-1'), 55.0 + 54.9 (C-14), 54.2 + 54.6 (C-17), 49.5 + 49.5 (C-9), 44.1 + 44.1 (C-13),

40.3 (C-5), 39.6 (C-12), 37.1 (C-1), 36.9 + 35.7 (C-20), 36.7 + 34.9(NCH₃), 34.5 (C-10), 34.1 (C-4), 29.8 (C-6), 28.2 + 28.1 (C-2), 27.8 (C-16), 23.4 + 23.4 (C-15), 21.8 (CH₃CO), 21.7 (C-11), 17.1 + 16.9 (C-21), 14.5 (OCH₂CH₃), 13.3 (C-19), 12.3 + 12.3 (C-18).

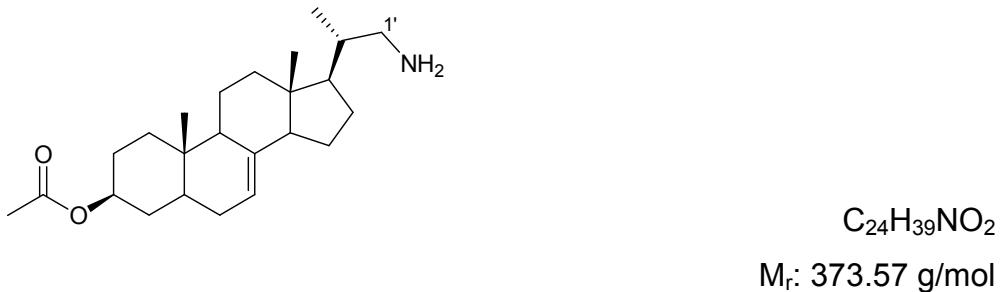
MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 514 (100, [M+1]⁺), 454 (50, [M-CH₃COOH+1]⁺)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 513 (14, [M]⁺•), 498 (8, [M-CH₃]⁺⁺•), 468 (8, [M-C₂H₅O]⁺⁺•), 438 (6, [M-CH₃COOH-CH₃]⁺⁺•)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 513.3453 (53.3, ber. für C₃₁H₄₇NO₅: 513.3454)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 72.57 (72.48), **H:** 9.28 (9.22), **N:** 2.65 (2.73)

3.2.30 (3S,20S)-20-(Aminomethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (46)



(3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (**3**, 200 mg, 0.54 mmol) wird in einem Gemisch von THF und EtOH (3:1, 4.0 mL) gelöst. Natriumcyanoborhydrid (34 mg, 0.54 mmol), Ammoniumacetat (166 mg, 0.21 mmol) und Zinkchlorid (37 mg, 0.27 mmol) werden zugegeben. Die Suspension wird 16 h bei RT gerührt, dann mit verdünnter Natronlauge (2 M, 5 mL) versetzt und mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (10 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc/NEt₃ 4:1:0 → 1:1:0.1)

aufgereinigt. Das Produkt wird als weißer Feststoff (170 mg, 0.46 mmol, 85 %) erhalten.

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 222 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +35.0^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2949 (C-H), 2868 (C-H), 1732 (C=O), 1459 (Alkyl), 1445 (Alkyl), 1358 (Alkyl), 1242 (C-O), 1030 (C-O), 974 (C=C-H), 898 (C=C-H)

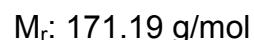
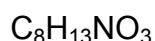
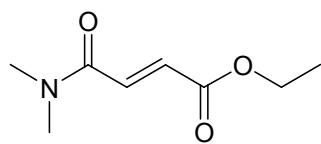
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ (ppm) = 5.19 - 5.10 (m, 1H, H-7), 4.68 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.2 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.8 Hz, 1H, H-3), 2.56 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 11.7 Hz, ³J_{H1'd-H20} = 3.0 Hz, 1H, H-1'd), 2.29 (t, ²J_{H1'd'-H1'd} = 11.7 Hz, ³J_{H1'd'-H20} = 9.0 Hz, 1H, H-1'd'), 2.03 (s, 3H, CH₃CO) + 2.05 - 1.95 (m, 1H, H-12d), 1.89 - 1.18 (m, 19H), 1.12 (dt, ³J_{H1a-H2a} = 14.1 Hz, ³J_{H1a-H2e} = ²J_{H1a-H1e} = 4.2 Hz, 1H, H-1a), 0.99 (d, ³J_{H21-H20} = 6.4 Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ (ppm) = 170.9 (CH₃CO), 139.5 (C-8), 117.6 (C-7), 73.6 (C-3), 55.7 (C-1'), 54.9 (C-14), 54.5 (C-17), 49.3 (C-9), 43.7 (C-13), 40.2 (C-5), 39.6 (C-12), 36.9 (C-1), 36.8 (C-20), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.9 (C-16), 27.6 (C-2), 23.2 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.6 (C-11), 17.9 (C-21), 13.1 (C-19), 12.1 (C-18).

MS (Cl): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 374 (100, [M+1]⁺), 314 (52, [M-CH₃COOH+1]⁺)

HR-MS (EI): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 373.3009 (0.3, ber. für C₂₄H₃₉NO₂: 373.2981)

6.2.31 (*E*)-3-Dimethylcarbamoylacrylsäureethylester (48)



Alternative Synthesevorschrift für (*E*)-3-Dimethylcarbamoylacrylsäureethylester (48)^{172,173}:

Eine Lösung von Monoethylfumarat (250 mg, 1.73 mmol) in Dichlormethan (1.5 mL) wird auf -20 °C gekühlt. *N*-Methylmorpholin (191 µL, 175 mg, 1.73 mmol) und Ethylchloroformiat (165 µL, 188 mg, 1.73 mmol) werden zugegeben und die Reaktionslösung 30 min gerührt. Dimethylamin-Lösung (2 M in THF, 1.74 mL, 3.47 mmol) wird langsam zugegeben und weitere 30 min bei -20 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird langsam auf RT erwärmt, weitere 4 h gerührt und dann zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in EtOAc (10 mL) aufgenommen und mit 2%-iger wässriger Zitronensäure (5 mL), gesättigter wässriger Natriumcarbonat-Lösung (5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel destillativ im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 1:1) aufgereinigt und das Produkt als farbloses Öl (135 mg, 0.79 mmol, 46 %) erhalten.

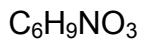
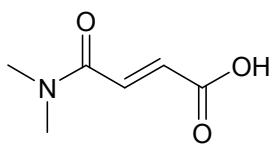
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.39 (d, ³J_{Me₂NCOCH-CHCOOEt} = 15.3 Hz, 1H, Me₂NCOCH), 6.77 (d, ³J_{CHCOOEt-Me₂NCOCH} = 15.3 Hz, 1H, CHCOOEt), 4.24 (q, ³J_{CH₂CH₃-CH₂CH₃} = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.12 (s, 3H, NCH₃), 3.03 (s, 3H, NCH₃), 1.30 (t, ³J_{CH₂CH₃-CH₂CH₃} = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ (ppm) = 165.8 (COOEt), 164.8 (CONMe₂), 133.8 (Me₂NCOCH), 131.1 (CHCOOEt), 61.1 (CH₂CH₃), 37.6 (NCH₃), 35.8 (NCH₃), 14.2 (CH₂CH₃).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 172 (100, $[M+1]^+$)

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur¹⁷³ angegebenen Daten überein.

6.2.32 (*E*)-3-Dimethylcarbamoylacrylsäure (**49**)



M_r : 143.14 g/mol

Alternative Synthesevorschrift für (*E*)-3-Dimethylcarbamoylacrylsäure (**49**)^{172,174}:

Zu einer Lösung von (*E*)-3-Dimethylcarbamoylacrylsäureethylester (**48**, 100 mg, 0.59 mmol) in EtOH (4.0 mL) wird eine wässrige Lösung von Kaliumhydroxid (2.0 mL, 115mg/1.0 mL, 4.09 mmol). Das Reaktionsgemisch wird 18 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend unter Kühlung im Eisbad mit verdünnter Salzsäure angesäuert (pH = 5). Das Gemisch wird mit Diethylether (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel destillativ im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (CH_2Cl_2) aufgereinigt und das Produkt als weißer Feststoff (80 mg, 0.56 mmol, 95 %) erhalten.

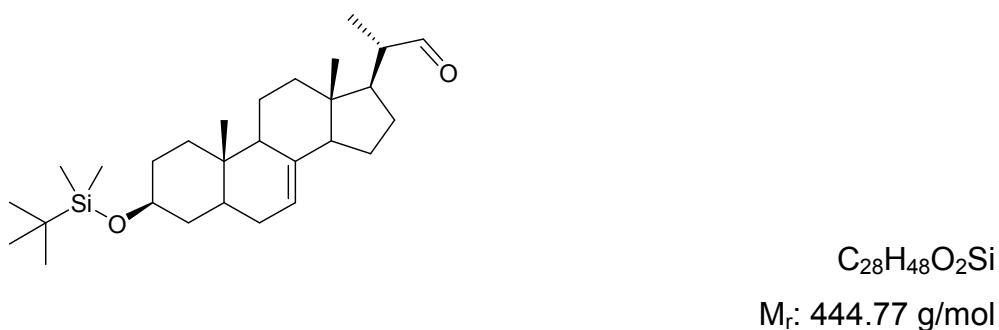
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.46 (d, $^3J_{\text{Me}_2\text{NCOCH}-\text{CHCOOEt}} = 15.3$ Hz, 1H, Me_2NCOCH), 6.78 (d, $^3J_{\text{CHCOOEt}-\text{Me}_2\text{NCOCH}} = 15.3$ Hz, 1H, CHCOOH), 3.13 (s, 3H, NCH_3), 3.05 (s, 3H, NCH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ (ppm) = 166.4 (COOH), 164.0 (CONMe₂), 134.1 (Me₂NCOCH), 130.6 (CHCOOH), 36.8 (NCH₃), 35.0 (NCH₃).

MS (CI): m/z (rel. Int. in %) = 144 (100, $[M+1]^+$)

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur¹⁷² angegebenen Daten überein.

6.2.33 (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-yl-*tert*-butyldimethylsilylether (51)



Variante A:

5 α ,6-Dihydroergosteryl-*tert*-butyldimethylsilylether (**78**, 390 mg, 0.76 mmol) und Pyridin (0.4 mL, 392 mg, 4.96 mmol) werden in Dichlormethan (7.6 mL) gelöst und unter Rühren auf - 75 °C gekühlt. Es wird Ozon eingeleitet (3 min, 40 L/h, 0.8 V, 4.80 mmol) und weitere 2 min gerührt. Methanol (3.8 mL) und Dimethylsulfid (0.1 mL) werden zugegeben, die Reaktionslösung langsam auf RT erwärmt und 16 h gerührt. Die Lösungsmittel werden im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (CH_2Cl_2) aufgereinigt. Das Produkt **51** wird als weißer kristalliner Feststoff (35 mg, 0.08 mmol, 11 %) erhalten.

Variante B:

(3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ol (**79**, 399 mg, 1.21 mmol) wird in einem Gemisch aus DMF und Pyridin (3:1, 6.0 mL) gelöst. TBDMS-Chlorid (455 mg, 3.02 mmol) und Imidazol (411 mg, 6.04 mmol) werden zugegeben und die Reaktionslösung 48 h bei RT gerührt. Es wird Wasser zugegeben (15 mL) und mit Dichlormethan (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt

(Hexan/EtOAc 95:5). Das Produkt **51** wird als weißer kristalliner Feststoff (230 mg, 0.52 mmol, 43 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 200 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -8.2^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2958 (C-H), 2930 (C-H), 2870 (C-H), 2855 (C-H), 1734 (C=O), 1473 (Alkyl), 1460 (Alkyl), 1380 (C-H ^tBu), 1369 (C-H ^tBu), 1255 (C-O), 1087 (C-O), 873 (C=C-H), 835 (C=C-H)

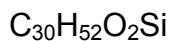
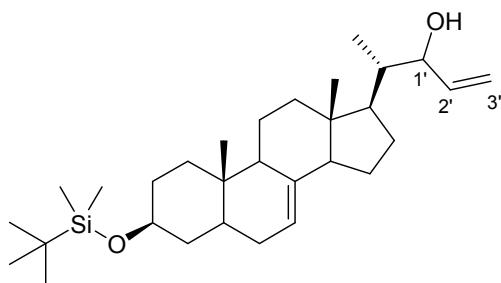
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 9.55 (d, ³J_{CHO-C20} = 5.0 Hz, 1H, CHO), 5.19 - 5.13 (m, 1H, H-7), 3.58 - 3.49 (m, 1H, H-3), 2.39 - 2.24 (m, 1H, H-20), 1.80 - 1.10 (m, 20H), 1.04 (d, ³J_{H21-H20} = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.76 (m, 3H, H-19), 0.53 (s, 3H, H-18), 0.05 (s, 6H, (CH₃)₂Si).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 206.0 (CHO), 138.9 (C-8), 118.3 (C-7), 72.0 (C-3), 54.6 (C-17), 52.0 (C-14), 49.5 (C-20), 49.2 (C-9), 43.2 (C-13), 40.5 (C-5), 38.6 (C-12), 38.4 (C-4), 37.4 (C-1), 34.4 (C-10), 32.0 (C-2), 29.8 (C-6), 26.3 (C-16), 26.1 (C(CH₃)₃), 22.7 (C-15), 21.3 (C-11), 18.4 (C(CH₃)₃), 13.6 (C-21), 13.2 (C-19), 13.0 (C-18), -4.4 (CH₃Si), -4.4 (CH₃Si).

MS (Cl): ^m/z (rel. Int. in %) = 445 (16, [M+1]⁺), 427 (8, [M-H₂O+1]⁺), 387 (10, [M-^tBuOH+1]⁺), 357 (8, [M-tBuOH-2CH₃+1]⁺), 313 (100, [M-TBDMSOH+1]⁺), 295 (32, [M-TBDMSOH-H₂O+1]⁺)

HR-MS (EI): ^m/z (rel. Int. in %) = 444.3410 (100.0), 444.3439 (100.0), 444.3438 (100.0) (ber. für: C₂₈H₄₈O₂Si: 444.3424)

6.2.34 (3S,20S)-20-(1-Hydroxyprop-2-en-1-yl)-pregn-7-en-3-yl-*tert*-butyl-dimethylsilyl-ether (52)



Eine Lösung von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-yl-*tert*-butyldimethylsilylether (**51**, 216 mg, 0.49 mmol) in THF (0.1 mL) wird mit dem entsprechenden Vinylmagnesiumbromid in THF (1.0 M, 590 μ L, 0.59 mmol) versetzt und 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird Eis zugegeben und der entstehende Niederschlag mit halbkonzentrierter Salzsäure (5 mL) gelöst. Es wird mit Diethylether (2 x 5 mL) und mit Dichlormethan (2 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Natriumhydrogensulfit-Lösung (10 mL), gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) und Wasser (10 mL) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wird die Lösung im Vakuum eingeengt und der Rückstand säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 95:5) aufgereinigt. Das Produkt wird als weißer Feststoff (104 mg, 0.22 mmol, 45 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 170 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -4.0^\circ$ ($c = 3 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3426 (O-H), 2948 (C-H), 2888 (C-H), 2856 (C-H), 1462 (Alkyl), 1377 (C-H ^tBu), 1254 (C-O), 1098 (C-O), 1082 (C-O), 874 (C=C-H), 833 (C=C-H), 772 (C=C-H)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 5.90 - 5.79 (m, 1H, H-2'), 5.20 - 5.08 (m, 3H, H-7 und H-3'), 3.96 - 3.87 (m, 1H, H-1'), 3.60 - 3.49 (m, 1H, H-3), 1.97 (dt, $^2J_{\text{H}12\text{e}-\text{H}12\text{a}} = 12.0$ Hz, $^3J_{\text{H}12\text{e}-\text{H}11\text{e}} = ^3J_{\text{H}12\text{e}-\text{H}11\text{a}} = 3.2$ Hz, 1H, H-12e), 1.93 - 1.23 (m, 20H),

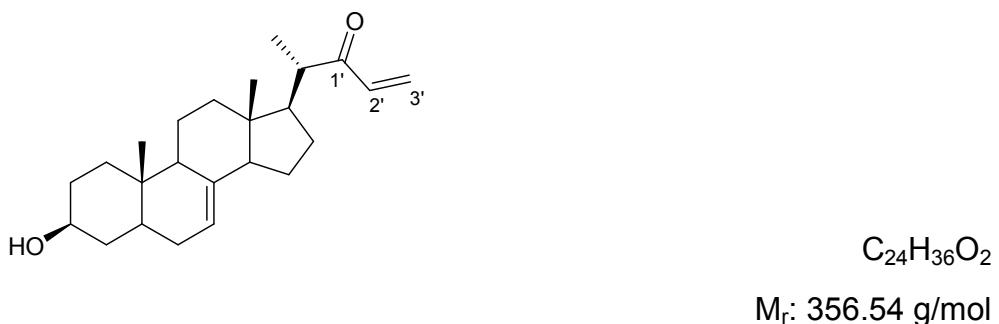
1.04 (dt, $^3J_{H1a-H2a} = ^2J_{H1a-H1e} = 13.7$ Hz, $^3J_{H1a-H2e} = 3.5$ Hz, 1H, H-1a), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.86 (d, $^3J_{H21-H20} = 6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18), 0.05 (s, 6H, (CH₃)₂Si).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 139.6 (C-8), 134.2 (C-3'), 118.1 (C-7), 117.2 (C-2'), 72.2 (C-3), 71.8 (C-1'), 55.1 (C-14), 52.4 (C-17), 49.7 (C-9), 43.4 (C-13), 40.6 (C-5), 39.8 (C-20), 39.4 (C-12), 38.7 (C-4), 37.5 (C-1), 34.5 (C-10), 32.1 (C-2), 29.9 (C-6), 27.8 (C-16), 26.2 (C(CH₃)₃), 23.0 (C-15), 21.7 (C-11), 18.5 (C(CH₃)₃), 13.4 (C-19), 12.5 (C-18), 11.8 (C-21), -4.3 (CH₃Si), -4.4 (CH₃Si).

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 415 (54, [M-^tBu]⁺), 397 (2, [M-^tBu-H₂O]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 472.3736 (7.1, ber. für C₃₀H₅₂O₂Si: 472.3737)

6.2.35 (3S,20S)-20-(1-Oxoprop-2-en-1-yl)-pregn-7-en-3-ol (54)



Eine Lösung von Cyanurchlorid (43 mg, 0.23 mmol) in Dichlormethan (0.5 mL) wird auf - 60 °C gekühlt und eine Lösung von DMSO (36 µL, 40 mg, 0.51 mmol) in Dichlormethan (0.1 mL) langsam zugegeben. Nach 10 min Rühren wird eine Lösung von (3S,20S)-20-(1-Hydroxyprop-2-en-1-yl)-pregn-7-en-3-yl-*tert*-butyl-dimethylsilyl-ether (**52**, 100 mg, 0.21 mmol) in Dichlormethan (0.2 mL) zugegeben und weitere 15 min gerührt. Nach der Zugabe von Triethylamin (147 µL, 107 mg, 1.06 mmol) wird auf 0 °C erwärmt. Die Reaktionslösung wird mit THF (3 mL) verdünnt und TBAF (138 mg, 0.53 mmol) zugegeben. Nach 16 h Rühren bei RT wird die Reaktion mit Dichlormethan (5 mL) verdünnt und das Gemisch mit verdünnter Salzsäure (1 M, 2 x

5 mL) und Wasser (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Produkt wird als weißer Feststoff (39 mg, 0.11 mmol, 44 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 151 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +8.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3420 (O-H), 2946 (C-H), 2886 (C-H), 2860 (C-H), 1690 (C=O), 1460 (Alkyl), 1256 (C-O), 1088 (C-O), 876 (C=C-H), 835 (C=C-H), 768 (C=C-H)

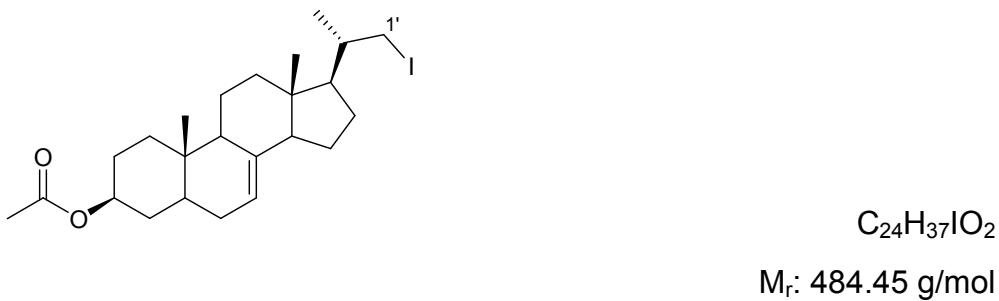
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ (ppm) = 5.91 - 5.80 (m, 1H, H-2'), 5.29 - 5.07 (m, 3H, H-7 + H-3'), 3.62 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 11.6$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{e}} = 4.4$ Hz, 1H, H-3), 2.0 - 1.93 (m, 1H, H-12d), 1.89 - 1.21 (m, 21H), 0.87 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.5$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.56 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 139.4 (C-8), 135.9 (C-3'), 117.8 (C-7), 117.0, 71.2 (C-3), 55.0 (C-17), 52.5 (C-14), 51.8 (C-20), 49.5 (C-9), 43.4 (C-13), 41.4 (C-5) 39.6 (C-20), 39.2 (C-12), 38.1 (C-4), 37.2 (C-1), 34.3 (C-10), 31.6 (C-2), 29.8 (C-6), 27.7 (C-16), 23.0 (C-15), 21.6 (C-11), 13.2 (C-21), 12.5 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 357 (4, $[\text{M}+1]^+$), 341 (100, $[\text{M}-\text{O}+1]^+$), 323 (22, $[\text{M}-\text{O}-\text{H}_2\text{O}+1]^+$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 356.2700 (100, ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_2$: 356.2715)

6.2.36 (3S,20S)-20-Iodmethylpregn-7-en-3-ylacetat (58)



Modifizierte Synthesevorschrift zur Darstellung des bekannten Alkyliodids **57**⁸³:

Eine Lösung von Iod (75 mg, 0.29 mmol) in Dichlormethan (1.0 mL) wird auf 0 °C gekühlt und portionsweise Triphenylphosphin (84 mg, 0.32 mmol) zugegeben. Nach Erwärmen auf RT wird 1 h gerührt und Triethylamin (59 µL, 43 mg, 0.43 mmol) zugegeben. Es wird (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 100 mg, 0.27 mmol) zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit Dichlormethan (5 mL) verdünnt und mit verdünnter Salzsäure (2 M, 5 mL) und Wasser (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Das so erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 95:5) aufgereinigt und das Produkt als weißer Feststoff (121 mg, 0.25 mmol, 93 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 166 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 7.8^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 3442$ (C-H), 2948 (C-H), 1734 (C=O), 1247 (C-O), 1031 (C-O)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 5.18 - 5.12 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, $^3J_{H3-H2a} = 11.3$ Hz, $^3J_{H3-H4a} = 4.6$ Hz, 1H, H-3), 3.33 (dd, $^2J_{H1'd'-H1'd} = 9.6$ Hz, $^3J_{H1'd'-H20} = 2.5$ Hz, 1H, H-1'd'), 3.16 (dd, $^2J_{H1'd-H1'd'} = 9.6$ Hz, $^3J_{H1'd-H20} = 5.6$ Hz, 1H, H-1'd), 2.03 (s, 3H, CH_3CO), 1.99 - 1.94 (m, 1H, H-12d), 1.92 - 1.07 (m, 20H), 1.03 (d, $^3J_{H21-H20} = 6.2$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.56 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 170.9 (CH₃CO), 139.2 (C-8), 117.8 (C-7), 73.6 (C-3), 55.4 (C-17), 54.8 (C-14), 49.2 (C-9), 43.5 (C-13), 40.1 (C-5), 39.3 (C-12), 37.6 (C-20), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.4 (C-16), 22.9 (C-15), 21.6 (C-11), 21.5 (CH₃CO), 21.1 (C-1'), 21.0 (C-21), 13.1 (C-19), 12.7 (C-18).

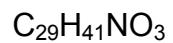
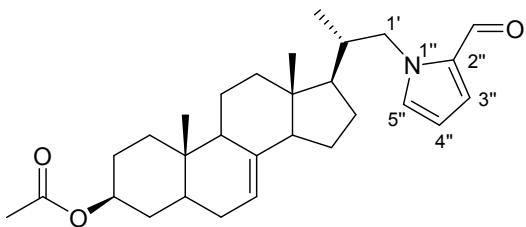
MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 485 (10, [M+H]⁺), 425 (100, [M-CH₃COOH+1]⁺), 357 (12, [M-HI+1]⁺

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 484 (28, [M]⁺), 469 (16, [M-CH₃]⁺) 424 (8, [M-CH₃COOH]⁺), 409 (28, [M-CH₃COOH-CH₃]⁺), 357 (18, [M-I]⁺), 315 (26, [M-C₂H₂O-I]⁺), 297 (50, [M-CH₃COOH-I]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 484.1839 (100, ber.: C₂₄H₃₇IO₂, 484.1838)

6.2.37 (3S,20S)-20-[(2-Formylpyrrol-1-yl)-methyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (59) und (3S,20S)-20-[(2-Formylpyrrol-1-yl)-methyl]-pregn-7-en-3-ol (60)

Zu einer Lösung von (3S,20S)-20-Brommethylpregn-7-en-3-ylacetat (**7**, 150 mg, 0.34 mmol) und Pyrrol-2-carbaldehyd (32 mg, 0.34 mmol) in DMF (10 mL) wird Kalium-*tert*-butylat (154 mg, 1.38 mmol) zugegeben und 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt und der Rückstand in Dichlormethan (5 mL) aufgenommen. Die Suspension wird über Celit filtriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 4:1) aufgereinigt und die Produkte **59** und **60** erhalten (Elutionsreihenfolge: **59**, **60**).

(3S,20S)-20-[(2-Formylpyrrol-1-yl)-methyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (59) $M_r: 451.64 \text{ g/mol}$ **Ausbeute:** 28 mg (0.061 mmol, 18 %) gelber Feststoff**Schmelzpunkt:** Zersetzung ab 210 °C**Spezifische Drehung:** $[\alpha]_D^{20} = + 12.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 2952$ (C-H), 2930 (C-H), 2854 (C-H), 1732 (C=O Ester), 1664 (C=O Aldehyd), 1508 (Alkyl), 1449 (C=C), 1256 (C-O), 1046 (C-O), 810 (C=C-H), 768 (C-H Ar)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 9.53 (s, 1H, CHO), 6.92 - 6.87 (m, 2H, H-3'' + H-5''), 6.21 (dd, $^3J_{\text{H}4''-\text{H}5''} = 4.1$ Hz, $^3J_{\text{H}4''-\text{H}3''} = 2.5$ Hz, 1H, H-4''), 5.22 - 5.14 (m, 1H, H-7), 4.69 - 4.54 (m, 1H, H-3), 4.60 - 4.50 (m, 1H, H-1'd), 3.82 - 3.71 (m, 1H, H-1'd'), 2.02 (s, 3H, CH_3CO) + 2.03 - 1.99 (m, 1H, H-12d), 1.90 - 0.99 (m, 19H), 0.92 - 0.84 (m, 1H, H-1d), 0.79 (s, 3H, H-19), 0.76 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.56 (s, 3H, H-18).

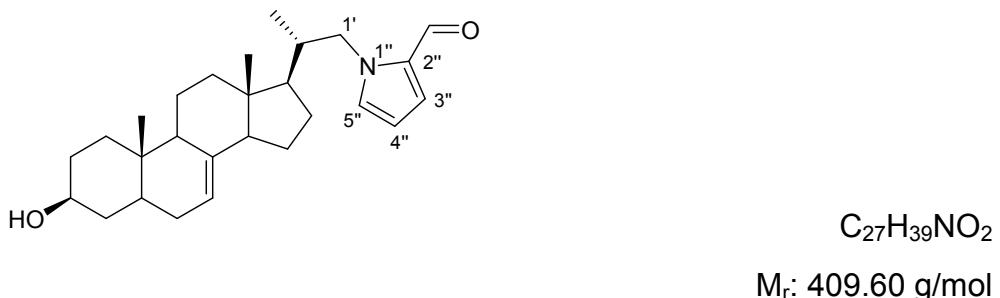
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 179.4 (CHO), 170.9 (CH_3CO), 139.3 (C-8) 132.4 (C-5''), 131.8 (C-2'' + C-3''), 118.1 (C-7), 109.4 (C-4''), 73.5 (C-3), 54.7 (C-14), 52.7 (C-17), 54.7 (C-1'), 49.5 (C-9), 43.8 (C-13), 39.8 (C-5), 39.6 (C-12), 38.7 (C-20), 37.0 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.7 (C-6), 27.6 (C-16), 27.5 (C-2), 23.3 (C-15), 21.6 (CH_3CO), 21.6 (C-11), 15.5 (C-21), 13.2 (C-19), 12.1 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 452 (64, $[M+H]^+$), 392 (100, $[M-CH_3COOH+1]^+$), 357 (56, $[M-Pyrrol+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 451 (100, $[M]^{+*}$), 420 (72, $[M-CH_2O]^{+*}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 451.3090 (100.0, ber. für $C_{29}H_{41}NO_3$: 451.3086)

(3S,20S)-20-[(2-Formylpyrrol-1-yl)-methyl]-pregn-7-en-3-ol (60)



Ausbeute: 29 mg (0.071 mmol, 21 %) gelber Feststoff

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 214 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 2.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 2954$ (C-H), 2934 (C-H), 2855 (C-H), 1664 (C=O), 1506 (Alkyl), 1450 (C=C), 1254 (C-O), 1046 (C-O), 812 (C=C-H), 766 (C-H Ar)

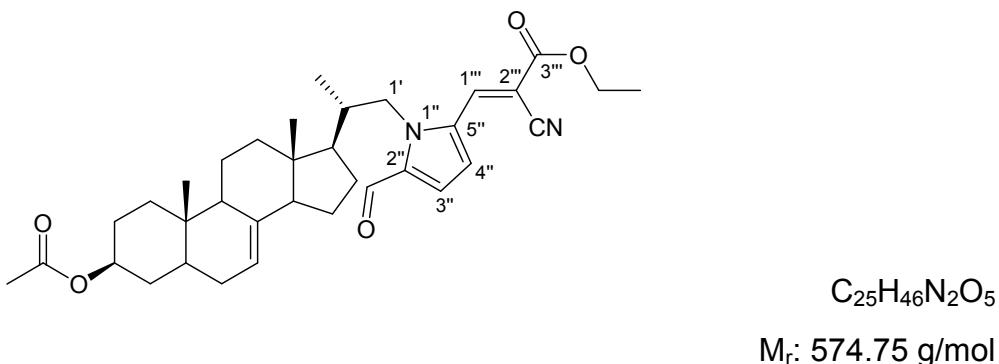
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 9.52 (s, 1H, CHO), 6.92 (dd, $^3J_{H5''-H4''} = 4.0$ Hz, $^4J_{H5''-H3''} = 1.7$ Hz, 1H, H-5''), 6.91 - 6.88 (m, 1H, H-3''), 6.21 (dd, $^3J_{H4''-H5''} = 4.0$, $^3J_{H4''-H3''} = 2.5$ Hz, 1H, H-4''), 5.22 - 5.14 (m, 1H, H-7), 4.55 (dd, $^2J_{H1'd-H1'd'} = 13.2$ Hz, $^3J_{H1'd-H20} = 3.9$ Hz, 1H, H-1'd), 3.81 - 3.71 (m, 1H, H-1'd'), 3.65 - 3.54 (tt, $^3J_{H3-H2a} = 3^3J_{H3-H4a} = 11.0$ Hz, $^3J_{H3-H2e} = 3^3J_{H3-H4e} = 4.4$ Hz, 1H, H-3), 2.03 - 0.99 (m, 21H), 0.92 - 0.84 (m, 1H, H-1d), 0.79 (s, 3H, H-19), 0.73 (d, $^3J_{H21-H20} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.56 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 179.4 (CHO), 139.3 (C-8) 132.4 (C-5''), 131.8 (C-2'' + C-3''), 118.1 (C-7), 109.4 (C-4''), 71.2 (C-3), 54.9 (C-17), 54.7 (C-14), 54.6 (C-1'), 49.5 (C-9), 44.0 (C-13), 40.4 (C-5), 39.6 (C-12), 38.7 (C-20), 38.1 (C-4), 37.3 (C-1), 34.3 (C-10), 31.6 (C-2), 29.8 (C-6), 27.2 (C-16), 23.3 (C-15), 21.6 (C-11), 16.5 (C-21), 13.2 (C-19), 12.1 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 410 (58, [M+H]⁺), 392 (100, [M-H₂O+1]⁺), 315 (40, [M-Pyrrol+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 409.3000 (100, ber. für C₂₇H₃₉NO₂: 409.2981)

6.2.38 (E)-3-{1-[(3S,20S)-(3-Acetylpregn-7-en-20-yl)-methyl]-2-formyl-1*H*-pyrrol-5-yl}-2-cyano-propensäureethylester (61)



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von Triphenylphosphin (280 mg, 1.07 mmol) in THF (2.0 mL) wird langsam DIAD (212 µL, 216 mg, 1.07 mmol) zugegeben und 30 min gerührt. Eine Suspension von (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 200 mg, 0.53 mmol) und (E)-2-Cyano-3-(5-formyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-propensäureethylester (**56**, 233 mg, 1.07 mmol) in THF (1 mL) wird tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird im Verlauf von 2 h auf RT erwärmt und 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 4:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als gelber Feststoff (63 mg, 0.11 mmol, 20 %) erhalten.

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 202 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +7.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 2954$ (C-H), 2928 (C-H), 2860 (C-H), 2206 (C≡N), 1736 (C=O Ester), 1728 (C=O Ester), 1660 (C=O Aldehyd), 1508 (Alkyl), 1460 (Alkyl), 1450 (C=C), 1256 (C-O), 1048 (C-O), 808 (C=C-H), 763 (C-H Ar)

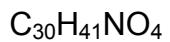
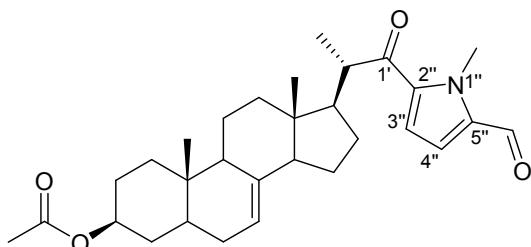
¹H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 9.72 (s, 1H, CHO), 8.13 (s, 1H, H-1''), 7.24 - 7.18 (m, 1H, H-3''), 7.11 - 7.01 (m, 1H, H-4''), 5.21 - 5.01 (m, 1H, H-7), 4.77 - 4.69 - 4.58 (m, 1H, H-3), 4.39 (q, $^3J_{\text{OCH}_2-\text{OCH}_2\text{CH}_3} = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2), 3.64 (dd, $^2J_{\text{H}_1\text{d}-\text{H}_1\text{d}'} = 10.5$ Hz, $^3J_{\text{H}_1\text{d}-\text{H}_2\text{O}} = 3.1$ Hz, 1H, H-1'd), 3.38 (dd, $^2J_{\text{H}_1\text{d}'-\text{H}_1\text{d}} = 10.5$ Hz, $^3J_{\text{H}_1\text{d}'-\text{H}_2\text{O}} = 6.8$ Hz, 1H, H-1'd'), 2.03 (s, 3H, CH_3CO) + 2.05 - 1.97 (m, 1H, H-12d), 1.93 - 1.18 (m, 23H), 1.17 - 1.11 (m, 1H, H-1d), 1.05 (d, $^3J_{\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.55 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 180.2 (CHO), 170.9 (CH_3CO), 162.4 (COOEt), 142.1 (C-1''), 139.4 (C-8), 136.6 (C-5''), 131.0 (C-2''), 121.3 (C-3''), 120.4 (C-4''), 117.7 (C-7), 116.5 (CN), 100.3 (C-2''), 73.6 (C-3), 68.1 (C-1'), 63.1 (OCH_2), 54.8 (C-14), 52.4 (C-17), 49.3 (C-9), 43.6 (C-13), 40.1 (C-20), 39.5 (C-5), 39.3 (C-12), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-16), 27.6 (C-2), 23.2 (C-15), 21.6 (CH_3CO), 21.6 (C-11), 17.0 (C-21), 14.3 (OCH_2CH_3), 13.1 (C-19), 12.1 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 379 (16, $[\text{M}-195+\text{H}]^+$), 357 (12, $[\text{M}-\text{Pyrrol}+1]^+$), 315 (58, $[\text{M}-\text{Pyrrol}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}+1]^+$, 297 (28, $[\text{M}-\text{Pyrrol}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 574.3414 (7.4, ber. für $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_5$: 574.3407)

6.2.39 2-[1-((3S,20S)-3-Acetylpregn-7-en-20-yl)-oxomethyl]-1-methyl-1*H*-pyrrol-5-carbaldehyd (62)



Zu einer Lösung von 2-Tributylstanny-N-methylpyrrol-5-carbaldehyd (**17**, 154 mg, 0.39 mmol) und Bis-triphenylphosphin-palladium(II)-dichlorid (3 mg, 1 mol%) in Toluol (10 mL) wird langsam eine Lösung von (3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäurechlorid (**11**, 157 mg, 0.39 mmol) in Toluol (10 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend mit Dichlormethan (50 mL) verdünnt. Das Gemisch wird mit Wasser (2 x 30 mL) und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und anschließend über Aktivkohle filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum zur Trockne eingedampft und erneut in Acetonitril (5 mL) gelöst. Zu der Lösung wird Kaliumfluorid (200 mg, 0.34 mmol) gegeben und 2 h bei RT gerührt. Die Suspension wird über Celit filtriert. und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 4:1) aufgereinigt und das Produkt als gelblich-weißer Feststoff (110 mg, 0.23 mmol, 59 %) erhalten.

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 212 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 13.2^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2954 (C-H), 2928 (C-H), 2860 (C-H), 1723 (C=O Ester), 1660 (C=O Aldehyd), 1508 (Alkyl), 1460 (Alkyl), 1450 (C=C), 1257 (C-O), 1045 (C-O), 804 (C=C-H), 770 (C-H Ar)

¹H NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ (ppm) = 9.78 (s, 1H, CHO), 6.96 (d, ³J_{H3''-H4''} = 4.4 Hz, 1H, H-3''), 6.89 (d, ³J_{H4''-H3''} = 4.4 Hz, 1H, H-4''), 5.20 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.70 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.2 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.8 Hz, 1H, H-3), 4.24 (s, 3H, NCH₃), 3.28 - 3.14 (m, 1H, H-20), 2.03 (s, 3H, CH₃CO) + 2.04 - 1.97 (m, 1H, H-12d), 1.95 - 1.31 (m, 18H), 1.22 (d, ³J_{H21-H20} = 6.8 Hz, 3H, H-21), 1.20 - 1.10 (m, 1H, H-1d), 0.82 (s, 3H, H-19), 0.62 (s, 3H, H-18).

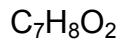
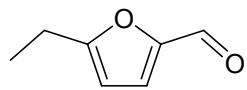
¹³C NMR (100 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ (ppm) = 198.2 (CHO), 182.0 (C-1'), 170.8 (CH₃CO), 139.0 (C-8), 136.5 (C-2''), 136.1 (C-5''), 121.7 (C-4''), 118.0 (C-3''), 117.3 (C-7), 73.5 (C-3), 54.3 (C-14), 52.8 (C-20), 49.3 (C-9), 46.2 (NCH₃), 43.7 (C-13), 40.1 (C-5), 39.5 (C-12), 36.9 (C-1), 35.2 (C-17), 34.4 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-16), 27.4 (C-2), 23.2 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.6 (C-11), 18.0 (C-21), 13.1 (C-19), 12.4 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 480 (70, [M+1]⁺), 420 (100, [M-CH₃COOH+1]⁺)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 479 (90, [M]⁺), 450 (100, [M-CHO]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 479.3026 (100, ber. für C₃₀H₄₁NO₄: 479.3036)

6.2.40 5-Ethylfuran-2-carbaldehyd (63)



M_r: 124.14 g/mol

Alternative Synthesevorschrift für 5-Ethylfuran-2-carbaldehyd (63)¹⁷⁵:

Zu einer auf -78 °C gekühlten Lösung von *N*-Methylpiperazin (400 µL, 361 mg, 3.60 mmol) in THF (10 mL) wird langsam ⁷BuLi (2.5 M in Hexan, 1.32 mL, 3.30 mmol) zugegeben und 15 min gerührt. Furan-2-carbaldehyd (248 µL, 288 mg, 3.00 mmol) wird zugegeben und die Lösung weitere 15 min bei -78 °C gerührt. TMEDA (1.35 mL,

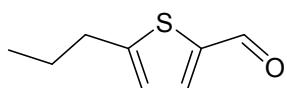
1.05 g, 9.00 mmol) und $^7\text{BuLi}$ (2.5 M in Hexan, 3.60 mL, 9.00 mmol) werden zugegeben und die Lösung 3 h bei -23 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird auf -78°C gekühlt und Ethyliodid (1.44 mL, 2.81 g, 18.0 mmol) zugegeben. Nachdem die Reaktionslösung erneut RT erreicht hat, wird sie in stark gerührtes Eiswasser (20 mL) gegeben. Das Gemisch wird mit Diethylether (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel werden im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1 → 4:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als hellgelbes Öl (190 mg, 1.53 mmol, 51 %) erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 9.61 (s, 1H, CHO), 7.51 (d, $^3J_{\text{H3-H4}} = 3.6$ Hz, 1H, H-3), 6.25 - 6.11 (m, 1H, H-4), 2.49 - 2.42 (m, 2H, CH_2), 1.24 (t, $^3J_{\text{CH3-CH2}} = 7.4$ Hz, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 177.9 (CHO), 165.1 (C-5), 152.0 (C-2), 123.7 (C-3), 108.6 (C-4), 21.2 (CH_2), 12.9 (CH_3)

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁷⁵ überein.

6.2.41 5-Propylthiophen-2-carbaldehyd (64)



$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{OS}$

M_r : 154.23 g/mol

Alternative Synthesevorschrift für 5-Propylthiophen-2-carbaldehyd (64)¹⁷⁶:

Zu einer auf -78 °C gekühlten Lösung von *N*-Methylpiperazin (400 μL , 361 mg, 3.60 mmol) in THF (10 mL) wird langsam $^7\text{BuLi}$ (2.5 M in Hexan, 1.32 mL, 3.30 mmol) zugegeben und 15 min gerührt. Thiophen-2-carbaldehyd (280 μL , 336 mg, 3.00

mmol) wird zugegeben und die Lösung weitere 15 min bei -78 °C gerührt. TMEDA (1.35 mL, 1.05 g, 9.00 mmol) und ⁷BuLi (2.5 M in Hexan, 3.60 mL, 9.00 mmol) werden zugegeben und die Lösung 3 h bei -23 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird auf -78°C gekühlt und *n*-Propyliodid (1.75 mL, 3.06 g, 18.0 mmol) zugegeben. Nachdem die Reaktionslösung erneut RT erreicht hat, wird sie in stark gerührtes Eiswasser (20 mL) gegeben. Das Gemisch wird mit Diethylether (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel werden im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1 → 4:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als hellgelbes Öl (319 mg, 2.07 mmol, 69 %) erhalten.

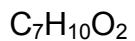
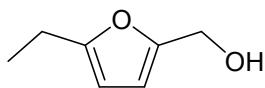
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 9.81 (s, 1H, CHO), 7.61 (d, ³J_{H3-H4} = 3.8 Hz, 1H, H-3), 6.95 - 6.84 (m, 1H, H-4), 2.84 (t, ³J_{H1'-H2'} = 7.6 Hz, 2H, H-1'), 1.78 - 1.69 (m, 2H, H-2'), 0.99 (t, ³J_{H3'-H2'} = 7.3 Hz, 3H, H-3').

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 182.8 (CHO), 157.6 (C-5), 141.8 (C-2), 137.2 (C-3), 126.1 (C-4), 32.9 (C-1'), 24.7 (C-2'), 13.7 (C-3').

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁷⁶ überein.

6.2.42 Reduktion der heteroaromatischen Aldehyde

Zu einer Lösung des heteroaromatischen Aldehyds (0.32 mmol) in einem Gemisch aus Dichlormethan und MeOH (3:2, 3.3 mL) wird Natriumborhydrid (15 mg, 0.40 mmol) gegeben. Es wird 1 h bei RT gerührt und anschließend gesättigte wässrige Ammoniumchlorid-Lösung (5 mL) zugegeben. Das zweiphasige Gemisch wird mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1 → 4:1) aufgereinigt.

(5-Ethylfuran-2-yl)-methanol (65)M_r: 126.15 g/mol

Alternative Synthesevorschrift für (5-Ethylfuran-2-yl)-methanol (**65**)¹⁷⁷.

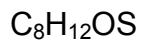
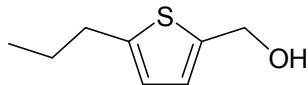
Edukt: 5-Ethylfuran-2-carbaldehyd (**63**)

Ausbeute: 9 mg (0.07 mmol, 22 %) gelbliches Öl

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 6.12 - 6.08 (m, 1H, H-3), 5.94 - 5.90 (m, 1H, H-4), 4.64 - 4.60 (m, 2H, CH₂O), 2.44 - 2.39 (m, 2H, CH₂), 1.72 (t, ³J_{CH3-CH2} = 7.5 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 155.1 (C-5), 149.4 (C-2), 113.4 (C-3), 107.8 (C-4), 61.8 (CH₂O), 21.5 (CH₂), 13.6 (CH₃)

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁷⁷ überein.

(5-Propylthiophen-2-yl)-methanol (66)M_r: 156.25 g/mol

Alternative Synthesevorschrift für (5-Propylthiophen-2-yl)-methanol (**66**)¹⁷⁸.

Edukt: 5-Propylthiophen-2-carbaldehyd (**64**)

Ausbeute: 38 mg (0.24 mmol, 75 %) hellgelbes Öl

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 6.81 (d, ³J_{H3-H4} = 3.4 Hz, 1H, H-3), 6.63 (d, ³J_{H4-H3} = 3.4 Hz, 1H, H-4), 4.75 (s, 2H, CH₂O), 2.76 (t, ³J_{H1'-H2'} = 7.5 Hz, 2H, H-1'), 1.78 - 1.64 (m, 3H, H-2' und OH), 0.97 (t, ³J_{H3'-H2'} = 7.3 Hz, 3H, H-3').

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 146.6 (C-5), 141.4 (C-2), 125.6 (C-3), 123.9 (C-4), 60.4 (CH₂O), 32.4 (C-1'), 25.0 (C-2'), 13.8 (C-3').

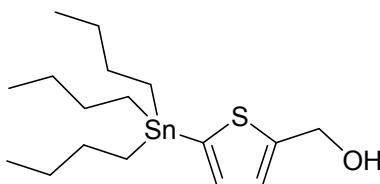
MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 157 (3, [M+1]⁺), 139 (100, [M-H₂O+1]⁺)

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁷⁸ überein.

6.2.43 Reduktion der stannylierten heteroaromatischen Aldehyde

Der stannylierte heteroaromatische Aldehyd (0.25 mmol) wird in einem Gemisch aus Dichlormethan und MeOH (3:2, 2.5 mL) gelöst. Es wird Natriumborhydrid (19 mg, 0.50 mmol) zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit gesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung (5 mL) versetzt und mit Diethylether (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel destillativ im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 100:0 → 90:10) aufgereinigt.

[(5-(Tributylstannylyl)thiophen-2-yl)]-methanol (72)



M_r: 403.21 g/mol

Alternative Synthesevorschrift für [(5-(Tributylstannyl)thiophen-2-yl)]-methanol (**72**)¹⁷⁹.

Edukt: 5-(Tributylstannyl)-thiophen-2-carbaldehyd (**67**)

Ausbeute: 52 mg (0.13 mmol, 52 %) gelbes Öl

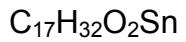
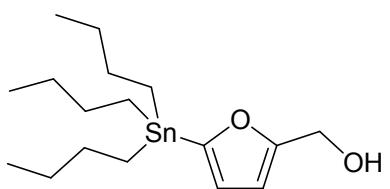
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 7.88 - 7.82 (m, 1H, H-4), 7.15 – 7.09 (m, 1H, H-3), 4.65 - 4.57 (m, 2H, CH₂O), 1.66 - 1.45 (m, 6H, 3 x SnCH₂CH₂), 1.36 - 1.23 (m, 6H, 3 x SnCH₂CH₂CH₂), 1.21 - 1.07 (m, 6H, 3 x SnCH₂), 0.88 (t, $^3J_{\text{SnCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CH}_3}$ = 7.3 Hz, 9H, 3 x CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 154.0 (C-2), 151.4 (C-5), 138.2 (C-4 + C-3), 58.0 (CH₂O), 30.3 (SnCH₂CH₂CH₂), 27.0 (SnCH₂CH₂), 14.1 (CH₃), 12.0 (SnCH₂).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 405/404/403/402/99 (100/40/78/30/42, [M+1]⁺), 345/344/343/342/341 (30/12/20/10/14, [M-C₄H₁₀+1]⁺)

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁷⁸ überein.

[(5-(Tributylstannyl)furan-2-yl)]-methanol (**73**)



M_r: 387.14 g/mol

Alternative Synthesevorschrift für [(5-(Tributylstannyl)furan-2-yl)]-methanol (**73**)¹⁸⁰.

Edukt: 5-(Tributylstannyl)-furan-2-carbaldehyd (**68**)

Ausbeute: 62 mg (0.16 mmol, 60 %) gelbes Öl

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 6.58 (d, ³J_{H4-H3} = 3.2 Hz, 1H, H-4), 6.27 (d, ³J_{H3-H4} = 3.2 Hz, 1H, H-3), 4.62 - 4.56 (m, 2H, CH₂O), 1.62 - 1.46 (m, 6H, 3 x SnCH₂CH₂), 1.35 - 1.22 (m, 6H, 3 x SnCH₂CH₂CH₂), 1.21 - 1.04 (m, 6H, 3 x SnCH₂), 0.87 (t, ³J_{SnCH₂CH₂CH₂-CH₃} = 7.3 Hz, 9H, 3 x CH₃).

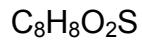
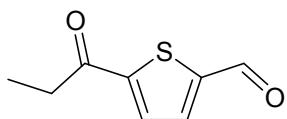
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 174.2 (C-2), 160.0, (C-5), 124.8 (C-4), 181.2 (C-3), 57.6 (CH₂O), 28.9 (SnCH₂CH₂CH₂), 27.0 (SnCH₂CH₂), 13.6 (CH₃), 10.3 (SnCH₂).

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁸⁰ überein.

6.2.44 Acylierung der 5-stannylierten Heteroaromataten nach *Stille*

Eine Suspension der 5-Tributylstannyly-heteroaromataten (0.26 mmol), Propionylchlorid (26 µL, 27 mg, 0.30 mmol) und Bis(triphenylphosphin)-palladiumdichlorid (14 mg, 0.02 mmol) in Dioxan (1.0 mL) wird unter Rühren 16 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird mit EtOAc (5 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Das daraus resultierende Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 4:1) aufgereinigt.

5-Propionylthiophen-2-carbaldehyd (69)



Alternative Synthesevorschrift für 5-Propionylthiophen-2-carbaldehyd (**69**)¹⁸¹.

Edukt: 5-(Tributylstannyl)-thiophen-2-carbaldehyd (**67**)

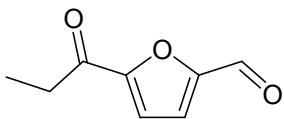
Ausbeute: 22 mg (0.13 mmol, 50 %) gelbliches Öl

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 9.66 (s, 1H, CHO), 7.67 - 7.58 (m, 2H, H-4 + H-3), 2.93 - 2.89 (m, 2H, CH₂), 1.21 - 1.12 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 190.1 (CO), 183.0 (CHO), 152.0 (C-2), 151.4 (C-5), 138.9 (C-3), 135.5 (C-4), 34.9 (CH₂), 7.9 (CH₃).

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁸¹ überein.

5-Propionylfuran-2-carbaldehyd (**70**)



C₈H₈O₃

M_r: 152.15 g/mol

Alternative Synthesevorschrift für 5-Propionylfuran-2-carbaldehyd (**70**)¹⁸².

Edukt: 5-(Tributylstannyl)-furan-2-carbaldehyd (**68**)

Ausbeute: 18 mg (0.12 mmol, 46 %) gelbliches Öl

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 9.80 (s, 1H, CHO), 7.29 (d, ³J_{H3-H4} = 3.7 Hz, 1H, H-3), 7.25 (d, ³J_{H4-H3} = 3.7 Hz, 1H, H-4), 2.98 (q, ³J_{CH3-CH2} = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.23 (t, ³J_{CH3-CH2} = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

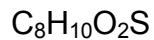
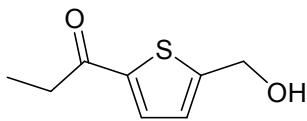
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 191.2 (CO), 179.2 (CHO), 154.8 (C-2), 153.2 (C-5), 120.1 (C-3), 116.6 (C-4), 32.4 (CH₂), 7.6 (CH₃).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 153 (100, [M+1]⁺)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 152 (20, [M]⁺), 123 (42, [M-CHO]⁺), 95 (24, [M-C₂H₅CO]⁺), 57 (100, [C₂H₅CO]⁺)

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁸² überein.

1-[5-(Hydroxymethyl)-thiophen-2-yl]-propan-1-on (74)



M_r: 170.23 g/mol

Alternative Synthesevorschrift für 1-[5-(Hydroxymethyl)-thiophen-2-yl]-propan-1-on (74)¹⁸³.

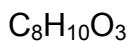
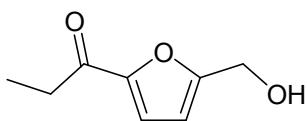
Edukt: [5-(Tributylstannyl)-thiophen-2-yl]-methanol (72)

Ausbeute: 9 mg (0.05 mmol, 19 %) gelblicher Feststoff

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 7.32 - 7.29 (m, 1H, H-4), 6.60 - 6.56 (H-3), 4.79 - 4.73 (m, 2 H, 2-CH₂), 2.90 - 2-84 (m, 2H, CH₂), 1.19 - 1.12 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 192.4 (CO), 147.2 (C-2), 141.4, (C-5), 133.3 (C-4), 128.0 (C-3), 60.0 (2-CH₂), 34.9 (CH₂), 7.9 (CH₃).

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁸³ überein.

1-[5-(Hydroxymethyl)-furan-2-yl]-propan-1-on (75)
 $M_r: 154.16 \text{ g/mol}$

Synthesevorschrift für 1-[5-(Hydroxymethyl)-furan-2-yl]-propan-1-on (**75**). **75** ist eins der bei Rösten bzw. Kochen von D-Glucose und Phenylalanin entstehenden sowie identifizierten Produkte.¹⁸⁴

Edukt: [5-(Tributylstannyl)-furan-2-yl]-methanol (**73**)

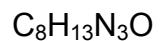
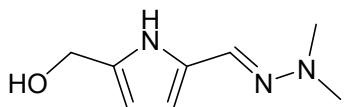
Ausbeute: 9 mg (0.06 mmol, 25 %) gelblicher Feststoff

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 7.12 - 7.06 (m, 1H, H-4), 6.61 - 6.55 (m, 1H, H-3), 4.64 - 4.58 (m, 2 H, 2- CH_2), 2.76 - 2.65 (m, 2H, CH_2), 1.28 (t, $^3J_{CH_3-CH_2} = 7.2$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD , 25 °C): δ (ppm) = 188.1 (CO), 157.3 (C-2), 151.8, (C-5), 125.0 (C-4), 113.0 (C-3), 56.7 (2- CH_2), 31.6 (CH_2), 9.0 (CH_3).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 155 (80, $[M+1]^+$), 137 (100, $[M-H_2O+1]^+$)

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁸⁴ überein.

6.2.45 [5-(Dimethyl-hydrazone-methyl)-1H-pyrrol-2-yl]-methanol (76)
 $M_r: 167.21 \text{ g/mol}$

5-(Hydroxymethyl)-pyrrol-2-carbaldehyd (**16**, 100 mg, 0.80 mmol) und *N,N*-Dimethylhydrazin (246 μ L, 192 mg, 3.20 mmol) werden in EtOH (2 mL) gelöst und 2 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 1:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als brauner Feststoff (50 mg, 0.30 mmol, 38 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 95 °C

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.37 (s, 1H, CH), 6.18 (d, $^3J_{\text{H4-H3}} = 3.4$ Hz, 1H, H-4), 5.89 (d, $^3J_{\text{H3-H4}} = 3.4$ Hz, 1H, H-3), 2.81 - 2.73 (m, 8H, $\text{CH}_2 + 2 \times \text{NCH}_3$).

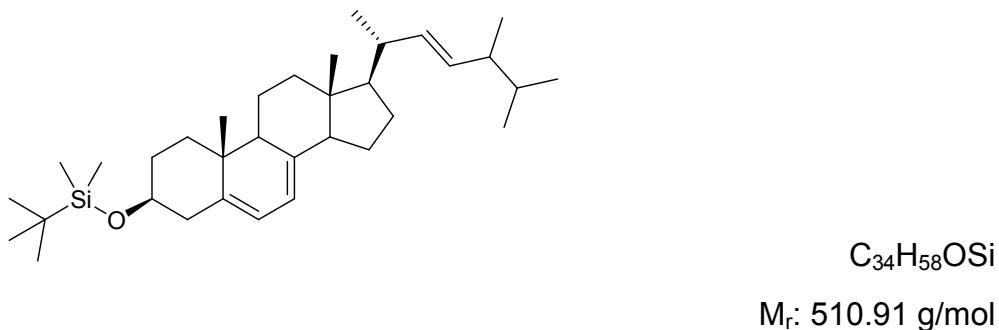
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , 25 °C): δ (ppm) = 133.9 (C-2), 133.6 (C-5), 129.8 (C-4), 112.1 (CH), 108.4 (C-3), 44.2 (CH_2), 27.4 (2 x NCH_3).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 168 (75, $[\text{M}+1]^+$), 150 (100, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 167 (42, $[\text{M}]^{+\bullet}$), 150 (78, $[\text{M}-\text{OH}]^{+\bullet}$), 137 (80, $[\text{M}-2\text{CH}_3]^{+\bullet}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 167.1051 (80.0, ber.: $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$, 167.1059)

6.2.46 Ergosteryl-*tert*-butyldimethylsilylether (**77**)



Alternative Synthesevorschrift für Ergosteryl-*tert*-butyldimethyl-silylether (**77**)¹⁴⁰:

Eine Lösung von Ergosterol (500 mg, 1.26 mmol) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (215 mg, 1.43 mmol) in Pyridin (10 mL) wird 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit Chloroform (25 mL) verdünnt und mit verdünnter Salzsäure (1 M, 2 x 15 mL) und Wasser (2 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (CH₂Cl₂) aufgereinigt und das Produkt als weißer kristalliner Feststoff erhalten (208 mg, 0.47 mmol, 37 %) erhalten.

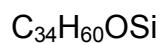
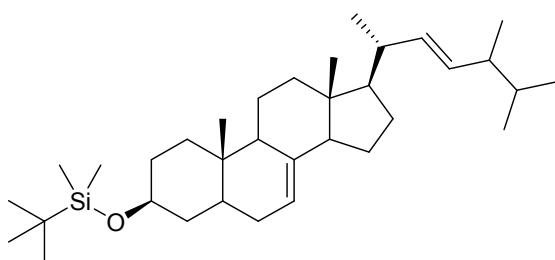
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.56 - 5.51 (m, 1 H, H-6), 5.25 - 5.10 (m, 3H, H-7, H-22, H-23), 3.60 - 3.51 (m, 1H, H-3), 2.07 - 1.96 (m, 2H, H-12d, H-20), 1.88 - 1.19 (m, 20H), 1.02 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H-21), 0.91 (d, $^3J_{H28-H24}$ = 6.8 Hz, 3H, H-28), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.85 - 0.80 (m, 6H, H-26, H-27), 0.80 (s, 3H, H19), 0.56 (s, 3H, H-18), 0.05 (s, 6H, (CH₃)₂Si).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 140.7 (C-8), 137.5 (C-5), 135.6 (C-22), 132.0 (C-23), 120.2 (C-6), 117.4 (C-7), 72.1 (C-3), 56.2 (C-17), 55.3 (C-14), 46.4 (C-9), 43.0 (C-13 + C-24), 40.6 (C-20), 39.4 (C-12), 37.5 (C-1), 36.9 (C-10), 36.2 (C-4), 33.2 (C-25), 32.1 (C-2), 28.3 (C-16), 26.1 (C(CH₃)₃), 23.1 (C-15), 21.7 (C-11), 21.3 (C-21), 20.1 (C-27), 19.8 (C-26), 18.4 (C(CH₃)₃), 17.8 (C-28), 13.2 (C-19), 12.1 (C-18), -4.4 (CH₃Si), -4.4 (CH₃Si).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 512/511 (14/8, [M+1]⁺), 496 (2, [M-CH₃+1]⁺), 453 (2, [M-^tBu+1]⁺), 379 (100, [M-TBDMSOH+1]⁺)

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten¹⁴⁰ überein.

6.2.47 **5 α ,6-Dihydroergosteryl *tert*-butyldimethylsilylether (78)**



M_r : 512.93 g/mol

Nickel-Aluminium-Legierung (2.13 g) wird portionsweise zu einer im Eisbad gekühlten Lösung von NaOH (2.66 g) in destilliertem Wasser (10 mL) gegeben. Die Temperatur muss währenddessen unter 25 °C bleiben. Das Reaktionsgemisch wird im Verlauf von 1 h auf RT erwärmt und 2 h bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wird der Katalysator mit. Wasser (~10 x 10 mL) bis zum Erreichen von pH = 7 gewaschen. Es wird mit EtOH (3 x 10 mL) und EtOAc (3 x 10 mL) gewaschen. Eine Lösung von Ergosteryl-*tert*-butyldimethylsilylether (77, 820 mg, 1.61 mmol) und 4-Dimethylaminobenzaldehyd (133 mg, 0.89 mmol) in THF (13 mL) wird zu dem in EtOAc (13 mL) suspendierten Katalysator gegeben. Die Hydrierung wird bei RT. und Atmosphärendruck über eine Dauer von 5 h ausgeführt. Das Reaktionsgemisch wird abdekantiert, über Celit filtriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum aufkonzentriert und das daraus resultierende Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (CH_2Cl_2). Das Produkt 76 wird als weißer kristalliner Feststoff (718 g, 1.40 mmol, 87 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 169 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -13.3^\circ$ ($c = 3 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2956 (C-H), 2929 (C-H), 2870 (C-H), 2855 (C-H), 1471 (Alkyl), 1459 (Alkyl), 1381 (C-H ^tBu), 1370 (C-H ^tBu), 1253 (C-O), 1105 (C-O), 1086 (C-O), 871 (C=C-H), 837 (C=C-H), 773 (C=C-H)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.25 - 5.10 (m, 3H, H-7, H-22, H-23), 3.58 - 3.50 (m, 1H, H-3), 2.05 - 1.95 (m, 2H, H-12d, H-20), 1.88 - 1.19 (m, 21H), 1.02 (d, $^3J_{H21-H20}$ = 6.7 Hz, 3H, H-21), 0.91 (d, $^3J_{H28-H24}$ = 6.8 Hz, 3H, H-28), 0.88 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.85 - 0.81 (m, 6H, H-26, H-27), 0.79 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18), 0.05 (s, 6H, (CH₃)₂Si).

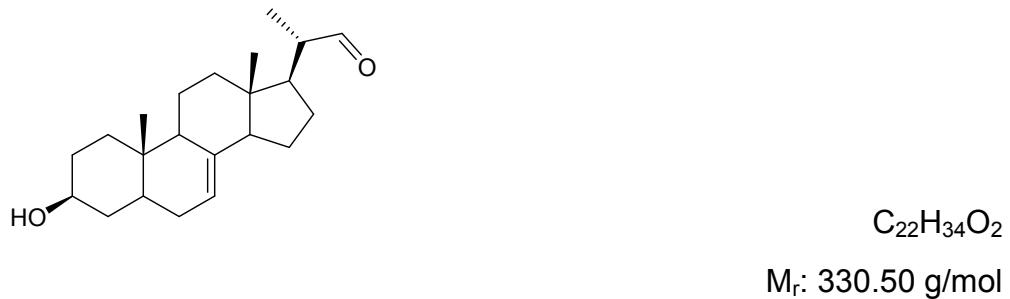
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 139.7 (C-8), 135.9 (C-22), 132.0 (C-23), 117.7 (C-7), 72.1 (C-3), 56.2 (C-17), 55.3 (C-14), 49.7 (C-9), 43.5 (C-13), 43.0 (C-24), 40.6 (C-20), 40.6 (C-5), 39.7 (C-12), 38.6 (C-4), 37.5 (C-1), 34.4 (C-10), 33.3 (C-25), 32.1 (C-2), 29.9 (C-6), 28.3 (C-16), 26.1 (C(CH₃)₃), 23.1 (C-15), 21.7 (C-11), 21.3 (C-21), 20.1 (C-27), 19.8 (C-26), 18.4 (C(CH₃)₃), 17.8 (C-28), 13.2 (C-19), 12.2 (C-18), -4.4 (CH₃Si), -4.4 (CH₃Si).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 455 (2, [M-^tBuOH+1]⁺), 381 (20, [M-TBDMSOH+1]⁺), 255 (20, [M-C₉H₁₈-TBDMSOH+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 412.4445 (100.0), 512.4389 (96.5), 512.4427 (100.0) (ber. für: C₃₄H₆₀OSi: 412.4414)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 79.69 (79.61), **H:** 12.19 (11.79)

6.2.48 (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ol (79)



(3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (**3**, 150 mg, 0.40 mmol) wird in einem Gemisch aus Chloroform und MeOH (1:1, 7 mL) gelöst. Es wird Kaliumcarbonat

(55 mg, 0.40 mmol) zugegeben und 1 h gerührt. Die Umsetzung (quantitativ) wird per DC (Hexan/EtOAc 4:1) überprüft und anschließend die Suspension über Celit filtriert. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

Schmelzpunkt: 144 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -12.5^\circ$ (c = 2x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 3404 (O-H), 2965 (C-H), 2933 (C-H), 2875 (C-H), 2853 (C-H), 1711 (C=O), 1471 (Alkyl), 1458 (Alkyl), 1381 (C-H), 1042 (C-O)

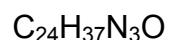
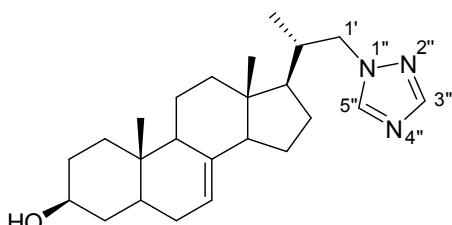
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 9.56 (d, ³J_{CHO-H20} = 3.3 Hz, 1H, CHO), 5.18 (m, 1H, H-7), 4.70 (m, 1H, H-3), 2.36 (m, 1H, H-20), 1.96-1.20 (m, 20H), 1.02 (d, ³J_{H21-H20} = 6.8 Hz, 3H, H-21) + 1.10 - 1.01 (m, 1H, H-1d), 0.83 (s, 3H, H-19), 0.56 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 204.8 (CHO), 138.7 (C-8), 118.1 (C-7), 71.3 (C-3), 54.4 (C-14), 51.1 (C-17), 49.8 (C-20), 49.3 (C-9), 43.9 (C-13), 40.2 (C-5), 39.2 (C-12), 38.3 (C-4), 36.8 (C-1), 34.2 (C-10), 29.5 (C-6), 27.5 (C-2), 26.8 (C-16), 23.3 (C-15), 21.4 (C-11), 13.6 (C-21), 13.3 (C-19), 12.5 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 331 (64, [M+1]⁺), 313 (100, [M-H₂O+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 330.2560 (100.0, ber. für: C₂₂H₃₄O₂: 330.2559)

6.2.49 (3S,20S)-20-(1,2,4-Triazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ol (80)



M_r : 383.57 g/mol

(3S,20S)-20-(1,2,4-Triazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**19**, 200 mg, 0.47 mmol) wird in einem Gemisch von Dichlormethan und MeOH (3:2, 4 mL) gelöst und Kaliumcarbonat (195 mg, 1.41 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei RT gerührt und im Anschluss über Celit filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum eingeengt, der Rückstand in einem Gemisch von Dichlormethan und MeOH (15:1) gelöst und ein weiteres Mal über Celit filtriert. Das Filtrat wird aufkonzentriert und das so erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1). Das Produkt **80** wird als weißer Feststoff (161 mg, 0.42 mmol, 89 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 241 °C (Zersetzung ab 233 °C)

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -1.4^\circ$ ($c = 5 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3312 (O-H), 3109 (Wasserstoffbrücken), 2937 (C-H), 2915 (C-H), 2852 (C-H), 2819 (C-H), 1509 (C=N), 1447 (Alkyl), 1379 (Alkyl) 1365 (Alkyl), 1276 (C-O), 1132 1057 (C-O), 683 (C-H Ar), 654 (C-H Ar)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 8.02 (s, 1H, CH_{ar}), 7.93 (s, 1H, CH_{ar}), 5.21 - 5.12 (m, 1H, H-7), 4.23 (dd, $^2J_{\text{H}1'd-\text{H}1'd'} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H}1'd-\text{H}20} = 3.6$ Hz, 1H, H-1'd), 3.79 (dd, $^2J_{\text{H}1'd'-\text{H}1'd} = 13.6$ Hz, $^3J_{\text{H}1'd-\text{H}20} = 9.4$ Hz, 1H, H-1'd'), 3.58 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2a} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4a} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2e} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4e} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 2.05 - 1.92 (m, 2H, H-12), 1.87 - 1.13 (m, 19H), 1.07 (dt, $^3J_{\text{H}1a-\text{H}2e} = 3.8$ Hz, $^3J_{\text{H}1a-\text{H}2a} = ^2J_{\text{H}1a-\text{H}1e} = 13.7$ Hz, 1H, H-1a), 0.83 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.77 (s, 3H, H-19), 0.57 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 151.9 (CH_{ar}), 143.7 (CH_{ar}), 139.0 (C-8), 118.2 (C-7), 71.1 (C-3), 55.5 (C-1'), 54.9 (C-14), 53.8 (C-17), 49.4 (C-9), 43.8 (C-13), 40.3 (C-5), 39.4 (C-12), 38.1 (C-4), 37.9 (C-20), 37.2 (C-1), 34.3 (C-10), 31.6 (C-2), 29.7 (C-6), 28.0 (C-16), 23.2 (C-15), 21.6 (C-11), 17.3 (C-21), 13.2 (C-19), 12.1 (C-18).

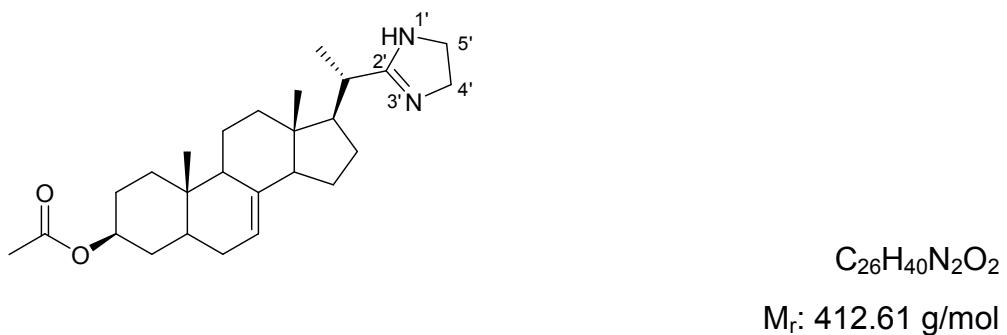
MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 384 (100, [M+1]⁺), 366 (41, [M-H₂O+1]⁺)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 383 (100, [M]⁺), 365 (76, [M-H₂O]⁺⁺), 350 (76, [M-H₂O-CH₃]⁺⁺), 314 (22, [M-C₂H₃N₃]⁺⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 383.2947 (100, ber. für C₂₄H₃₇N₃O: 383.2937)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 74.87 (75.15), **H:** 9.51 (9.72), **N:** 10.87 (10.95)

6.2.50 (3S,20S)-20-(1*H*-Imidazolin-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (82)



^tBuOH (332 mg, 4.48 mmol) und Aluminiumtrichlorid (1 mg, 0.01 mmol) werden in Dioxan (1.4 mL) gelöst und Cyanurchlorid (275 g, 1.49 mmol) langsam zugegeben, so dass die Temperatur unter 25 °C bleibt. Nach 1 h werden (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (**3**, 300 mg, 0.81 mmol) und Ethylen diamin (59 μ L, 53 mg, 0.89 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung 2 h bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wird gesättigte wässrige Natriumsulfit-Lösung (5 mL) zugegeben

und mit Chloroform (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Kaliumcarbonat-Lösung (10 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$ 100:5:0 \rightarrow 100:10:1) aufgereinigt. Das Produkt wird als gelblich-weißer Feststoff (41 mg, 0.10 mmol, 12 %) erhalten.

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 163 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -22.4^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 3420$ (N-H), 3380 (N-H), 2940 (C-H), 2918 (C-H), 2857 (C-H), 1740 (C=O), 1509 (C=N), 1448 (Alkyl), 1376 (Alkyl), 1278 (C-O), 1057 (C-O)

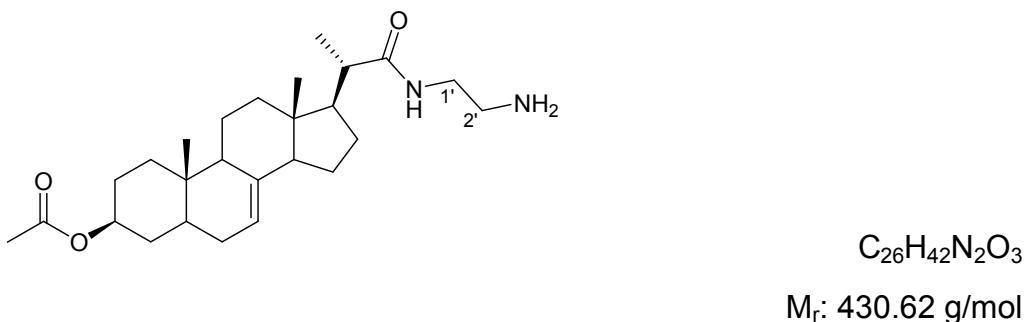
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.57 (s, 1H, NH), 5.19 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.66 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 11.2$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{e}} = 4.6$ Hz, 1H, H-3), 3.65 - 3.60 (m, 4H, H-4' und H-5'), 2.65 - 2.48 (m, 1H, H-20), 2.01 (s, 3H, CH_3CO), 1.99 - 1.93 (m, 1H, H-12d), 1.85 - 1.29 (m, 21H) 1.24 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 7.0$ Hz, 3H, H-21), 1.15 - 1.06 (m, 1H, H-1d), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.55 (s, 3H, H-18)

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 173.33 (C-2'), 170.8 (CH_3CO), 138.9 (C-8), 118.0 (C-7), 73.5 (C-3), 63.4 (C-20), 54.7 (C-14), 53.6 und 53.1 (C-4' und C-5'), 49.2 (C-9), 43.7 (C-13), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 37.2 (C-17), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.8 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.1 (C-16), 23.0 (C-15), 21.6 (CH_3CO), 21.5 (C-11), 18.4 (C-21), 13.1 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 413 (100, $[\text{M}+1]^+$), 353 (90, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 412.3097 (100, ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2$: 412.3090)

6.2.51 (3S,20S)-20-(2-Aminoethylaminocarbonyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (83)



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von (3S,20S)-3-Acetoxypregn-7-en-20-yl-methansäurechlorid (**11**, 210 mg, 0.52 mmol) in THF (5 mL) wird *N,N*-Ethylendiamin (138 µL, 124 mg, 2.06 mmol) zugegeben und 1 h gerührt. Nach Erwärmen auf RT wird weitere 2 h gerührt und Bortrifluorid-Diethylether-Komplex (98 µL, 110 mg, 0.77 mmol) in THF (0.5 mL) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 2 h zum Rückfluss erhitzt und 16 h bei RT gerührt bevor gesättigte wässrige Ammoniumchlorid-Lösung (10 mL) zugegeben wird. Das Gemisch wird mit verdünnter Salzsäure (0.2 M) auf pH 6 eingestellt und anschließend mit Dichlormethan (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 10:1:0.1). Das Produkt **83** wird als gelblich-weißer Feststoff (86 mg, 0.20 mmol, 38 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 178 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -24.0^\circ$ (c = 3x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3326 (NH_2), 2949 (C-H), 2873 (C-H), 2848 (C-H), 1731 (C=O Ester), 1637 (C=O Amid), 1551 (N-H Amid), 1446 (Alkyl), 1382 (Alkyl), 1365 (Alkyl), 1264 (C-O), 1242 (C-O), 1036 (C-O)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 6.47 (bs, 1H, NH₂), 5.16 - 5.11 (m, 1H, H-7), 4.74 - 4.62 (m, 1H, H-3), 3.41 - 3.28 (m, 2H, H-1''), 2.16 - 2.07 (m, 2H, H-2''),

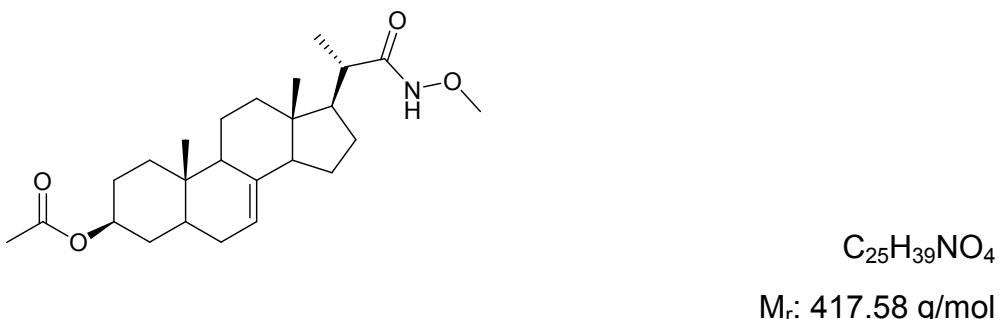
2.01 (s, 3H, CH₃CO), 1.94 (m, 1H, H-12d), 1.88 - 1.20 (m, 20H), 1.17 (d, ³J_{H21-H20} = 6.7 Hz, 3H, H-21), 1.13 - 1.06 (m, 1H, H-1d), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.53 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 178.2 (C-1'), 170.8 (CH₃CO), 139.0 (C-8), 117.9 (C-7), 73.5 (C-3), 54.7 (C-14), 52.9 (C-17), 49.3 (C-9), 45.1 (C-20), 43.4 (C-13), 40.36 (C-1''), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12 und C-2''), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.4 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 18.0 (C-21), 13.1 (C-19), 12.3 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 431 (100, [M+1]⁺), 371 (90, [M-CH₃COOH+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 430.3203 (100, ber. für C₂₆H₄₂N₂O₃: 430.3195)

6.2.52 (3S,20S)-20-(Methoxyaminocarbonyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (84)



(3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäure (**8**, 200 mg, 0.52 mmol), HOBT (83 mg, 0.62 mmol), DMAP (19 mg, 0.15 mmol) und Methoxyamin-Hydrochlorid (56 mg, 0.67 mmol) werden in THF (16 mL) gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt, DCC (127 mg, 0.62 mmol) zugegeben und weitere 90 min bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird langsam auf RT erwärmt und 16 h gerührt. Der entstehende Dicyclohexylharnstoff wird über Celit abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in kaltem EtOAc aufgenommen und erneut ausfallender Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Dieser Vorgang wird wiederholt bis kein Dicyclohexylharnstoff mehr ausfällt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch

aufgereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 40:1) und das Produkt als weißer Feststoff (102 mg, 0.24 mmol, 46 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 220 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 20.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2944 (C-H), 2930 (C-H), 2850 (C-H), 1729 (C=O Ester), 1626 (C=O Amid), 1575 (N-H Amid), 1436 (Alkyl), 1382, (Alkyl), 1311 (Alkyl), 1268 (C-O), 1243 (C-O), 1088 (C-O), 1044 (C-O), 640 (N-H)

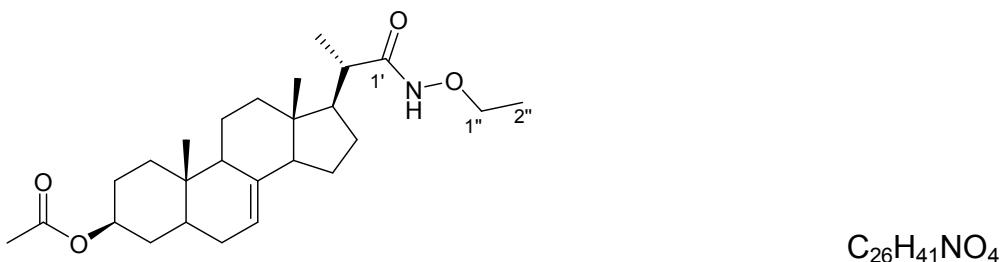
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$ (2:1), 25 °C): δ (ppm) = 5.12 - 5.05 (m, 1H, H-7), 4.59 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{a}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = ^3J_{\text{H}3-\text{H}4\text{e}} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 3.62 (s, 3H, OCH_3), 1.95 (s, 3H, CH_3CO) + 1.99-1.92 (m, 1H, H-20), 1.91 - 1.86 (m, 1H, H-12d), 1.84 - 1.13 (m, 19H), 1.10 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.8$ Hz, 3H, H-21), 1.03 (m, 1H, H-1d), 0.74 (s, 3H, H-19), 0.48 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$ (2:1), 25 °C): δ (ppm) = 175.0 (CONH), 172.0 (CH_3CO), 139.3 (C-8), 118.1 (C-7), 74.3 (C-3), 63.9 (OCH_3), 54.9 (C-14), 52.6 (C-17), 49.6 (C-9), 43.7 (C-13), 41.2 (C-20), 40.4 (C-5), 39.7 (C-12), 37.2 (C-1), 34.6 (C-10), 34.1 (C-4), 29.8 (C-6), 27.8 (C-16), 27.1 (C-2), 23.3 (C-15), 21.8 (CH_3CO), 21.5 (C-11), 17.4 (C-21), 13.2 (C-19), 12.2 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 418 (6, $[\text{M}+1]^+$); 389 (32, $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5+1]^+$), 371 (10, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{ONH}_2+1]^+$), 343 (38, $[\text{M}-\text{CONHOCH}_3+1]^+$), 329 (100, $[\text{M}-\text{CONHOCH}_3-\text{CH}_2+1]^+$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 417.2901 (0.2, ber. für: $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{NO}_4$: 417.2879)

6.2.53 (3S,20S)-20-(Ethoxyaminocarbonyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (85)



$M_r: 431.61$ g/mol

(3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäure (**8**, 200 mg, 0.52 mmol), HOBT (83 mg, 0.62 mmol), DMAP (19 mg, 0.15 mmol) und Ethoxyamin-Hydrochlorid (65 mg, 0.67 mmol) werden in THF (16 mL) gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt, DCC (127 mg, 0.62 mmol) zugegeben und weitere 90 min bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird langsam auf RT erwärmt und 16 h gerührt. Der entstehende Dicyclohexylharnstoff wird über Celit abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in kaltem EtOAc aufgenommen und erneut ausfallender Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Dieser Vorgang wird wiederholt bis kein Dicyclohexylharnstoff mehr ausfällt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt ($CH_2Cl_2/MeOH$ 40:1) und das Produkt als weißer Feststoff (98 mg, 0.23 mmol, 44 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 238 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 22.8^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2929 (C-H), 2850 (C-H), 1724 (C=O Ester), 1626 (C=O Amid), 1575 (N-H Amid), 1435 (Alkyl), 1378, (Alkyl), 1311 (Alkyl), 1270 (C-O), 1243 (C-O), 1088 (C-O), 1044 (C-O), 640 (N-H)

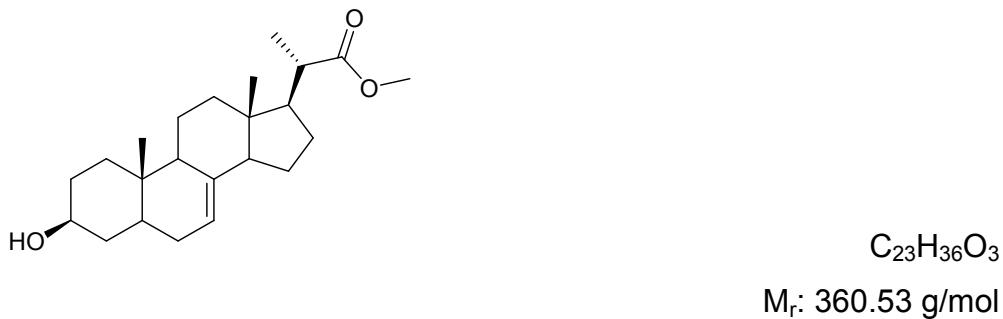
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3/MeOH-d_4$ (3:1), 25 °C): δ (ppm) = 5.12 - 5.05 (m, 1H, H-7), 4.60 (tt, $^3J_{H3-H2a} = ^3J_{H3-H4a} = 11.0$ Hz, $^3J_{H3-H2e} = ^3J_{H3-H4e} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 3.88 - 3.76 (m, 2H, H-1''), 1.95 (s, 3H, CH_3CO) + 1.98 - 1.91 (m, 1H, H-20), 1.89 - 1.84 (m, 1H, H-12d), 1.82 - 1.19 (m, 20H), 1.16 (t, $^3J_{H2''-H1''} = 7.1$ Hz, 3H, H-2''), 1.09 (d, $^3J_{H21-H20} = 6.8$ Hz, 3H, H-21), 1.06 - 0.98 (m, 1H, H-1d), 0.71 (s, 3H, H-19), 0.45 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄ (3:1), 25 °C): δ (ppm) = 174.5 (C-1'), 171.3 (CH₃CO), 138.9 (C-8), 117.7 (C-8), 73.7 (C-3), 71.8 (C-1''), 54.4 (C-14), 52.1 (C-17), 49.1 (C-9), 43.3 (C-13), 41.0 (C-20), 39.9 (C-5), 39.2 (C-12), 36.7 (C-1), 34.1 (C-10), 33.7 (C-4), 29.4 (C-6), 27.4 (C-16), 26.8 (C-2), 22.9 (C-15), 21.4 (CH₃CO), 21.3 (C-11), 17.3 (C-21), 13.3 (C-2''), 12.9 (C-19), 11.9 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 432 (80, [M+1]⁺), 402 (10, [M-C₂H₆+1]⁺), 388 (18, [M-C₂H₅ONH₂+1]⁺), 372 (100, [M-CH₃COOH+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 431.3007 (0.5, ber. für C₂₆H₄₁NO₄: 431.3036)

6.2.54 (3S, 20S)-3-Hydroxypregn-7-en-20-yl-methansäuremethylester (86)



Zu einer Lösung von (3S,20S)-20-(Hydroxycarbamoyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**21**, 150 mg, 0.37 mmol) in einem Gemisch aus MeOH und Dichlormethan (2.1, 0.6 mL) wird Wasser (0.07 mL) und Kaliumhydroxid (42 mg, 0.74 mmol) zugegeben. Das Gemisch wird 30 min bei RT gerührt und im Anschluss auf 0 °C gekühlt. Ethyliodid (70 μ L, 137 mg, 0.88 mmol) wird zugegeben, das Reaktionsgemisch langsam auf RT erwärmt und 16 h bei RT gerührt. Die Suspension wird über Celit filtriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/MeOH 40:1) aufgereinigt und das Produkt als weißer Feststoff (87 mg, 0.24 mmol, 65 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 180 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -11.5^\circ$ ($c = 2 \times 10^3$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 3552$ (O-H), 2962 (C-H), 2945 (C-H), 2928, (C-H), 2882 (C-H), 2846 (C-H), 1724 (C=O Ester), 1460 (Alkyl), 1440 (O-H), 1372 (Alkyl), 1329 (Alkyl), 1262 (C-O), 1194 (C-O), 1170 (C-H Alkohol), 1157 (C-H Alkohol), 1050 (C-O)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.19 - 5.13 (m, 1H, H-7), 3.64 (s, 3H, OCH_3), 3.62 - 3.55 (m, 1H, H-3), 2.41 (dq, $^3J_{\text{H}20-\text{H}17} = 10.1$ Hz, $^3J_{\text{H}20-\text{H}21} = 6.8$ Hz, 1H, H-20), 1.95 (dt, $^3J_{\text{H}12a-\text{H}11a} = 12.3$ Hz, $^3J_{\text{H}12a-\text{H}11e} = 2J_{\text{H}12a-\text{H}12e} = 3.3$ Hz, 1H, H-12a), 1.89 - 1.23 (m, 19H), 1.19 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.8$ Hz, 3H, H-21), 1.13 - 1.03 (m, 1H, H-1d), 0.79 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

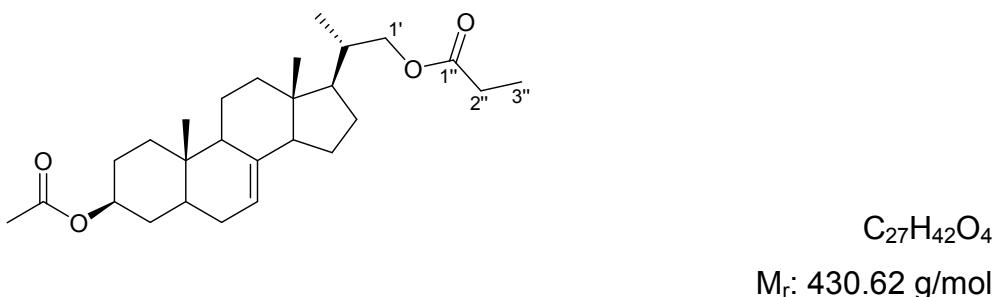
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 177.5 (CO), 139.1 (C-8), 118.1 (C-7), 71.1 (C-3), 54.7 (C-14), 53.0 (C-17), 51.5 (OCH_3), 49.5 (C-9), 43.5 (C-13), 42.9 (C-20), 40.3 (C-5), 39.4 (C-12), 38.1 (C-4), 37.2 (C-1), 34.3 (C-10), 31.6 (C-2), 29.7 (C-6), 27.0 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (C-11), 17.4 (C-21), 13.2 (C-19), 12.2 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 361 (70, $[\text{M}+1]^+$), 343 (100, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 360 (88, $[\text{M}]^{+\bullet}$), 345 (74, $[\text{M}-\text{CH}_3+1]^{+\bullet}$), 342 (10, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^{+\bullet}$), 327 (24, $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}]^{+\bullet}$), 301 (12, $[\text{M}-\text{COOCH}_3]^{+\bullet}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 360.2684 (100, ber. für: $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_3$: 360.2665)

6.2.55 Propionsäure-[(3S,20S)-3-acetoxy pregn-7-en-20-yl]-methylester (87)



Eine Lösung von (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 100 mg, 0.27 mmol) in Dichlormethan (0.6 mL) wird unter Schutzgasatmosphäre auf 0 °C gekühlt. Triethylamin (93 µL, 68 mg, 0.67 mmol) und Propansäurechlorid (46 µL, 49 mg, 0.54 mmol) werden langsam zugegeben. Es wird 1 h bei 0 °C gerührt bevor die Reaktionslösung langsam auf RT erwärmt wird. Die Reaktionslösung wird mit Chloroform (5 mL) verdünnt und mit verdünnter Salzsäure (2 M, 2 x 5 mL), gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 x 5 mL) und gesättigter wässriger Natrium-chlorid-Lösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Produkt wird nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/EtOAc 95:5) als weißer Feststoff (106 mg, 0.24 mmol, 89 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 123 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -0.9^\circ$ (c = 3.5x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2947 (C-H), 2850 (C-H), 2802 (C-H), 1735 (C=O), 1466 (Alkyl), 1383 (Alkyl), 1246 (C-O), 1172 (C-O), 1082 (C-O), 1032 (C-O), 964 (C=C-H), 800 (C=C-H)

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C): δ (ppm) = 5.22 - 5.14 (m, 1H, H-7), 4.66 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.3 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.6 Hz, 1H, H-3), 4.06 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 10.7 Hz, ³J_{H1'd-H20} = 3.4 Hz, 1H, H-1'd), 3.76 (dd, ²J_{H1'd'-H1'd} = 10.7 Hz, ³J_{H1'd'-H20} = 7.5 Hz, 1H, H-1'd'), 2.31 (q, ³J_{H2''-H3''} = 7.6 Hz, 2H, H-2''), 1.99 (s, 3H, CH₃CO) + 2.05 - 1.97 (m, 1H, H-12d), 1.88 - 1.23 (m, 20H), 1.11 (t, ³J_{H3''-H2''} = 7.6 Hz, 3H, H-3''), 1.02 (d, ³J_{H21-H20} = 6.6 Hz, 3H, H-21), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.56 (s, 3H, H-18).

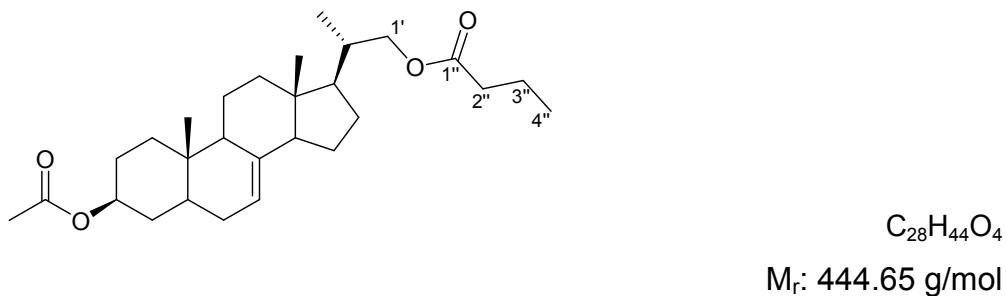
¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C): δ (ppm) = 174.9 (C-1''), 170.9 (CH₃CO), 139.8 (C-8), 118.1 (C-7), 73.8 (C-3), 69.6 (C-1'), 55.2 (C-14), 53.2 (C-17), 49.8 (C-9), 44.0 (C-13), 40.6 (C-5), 39.8 (C-12), 37.3 (C-1), 36.8 (C-20), 34.7 (C-10), 34.3 (C-4), 30.0 (C-6), 28.1 (C-2''), 28.0 (C-2), 27.9 (C-16), 23.6 (C-15), 22.0 (C-11), 21.7 (CH₃CO), 17.6 (C-21), 13.2 (C-19), 12.2 (C-18), 9.5 (C-3'').

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 431 (6, $[M+1]^+$), 371 (96, $[M-CH_3COOH+1]^+$), 357 (100, $[M-CH_3CH_2COOH+1]^+$), 297 (57, $[M-CH_3CH_2COOH-CH_3COOH+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 430 (64, $[M]^{+\bullet}$), 415 (12, $[M-CH_3]^{+\bullet}$), 370 (86, $[M-CH_3COOH]^{+\bullet}$), 355 (51, $[M-CH_3COOH-CH_3]^{+\bullet}$), 341 (40, $[M-CH_3CH_2COOH-CH_3]^{+\bullet}$), 313 (26, $[M-CH_3COOH-CH_3CH_2CO]^{+\bullet}$), 296 (14, $[M-CH_3CH_2COOH-CH_3COOH]^{+\bullet}$), 281 (56, $[M-CH_3CH_2COOH-CH_3COOH-CH_3]^{+\bullet}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 430.3057 (4.0, ber. für: $C_{27}H_{42}O_4$, 430.3083)

6.2.56 Butansäure-[(3S,20S)-3-acetoxy pregn-7-en-20-yl]-methylester (88)



Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +4.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2947 (C-H), 2899 (C-H), 2871 (C-H), 2849 (C-H), 1734 (C=O), 1469 (Alkyl), 1447 (Alkyl), 1382 (Alkyl), 1367 (Alkyl), 1248 (C-O), 1168 (C-O), 1032 (C-O), 991 (C=C-H), 897 (C=C-H)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.20 - 5.11 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{a}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H}3-\text{H}2\text{e}} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 4.25 - 4.04 (m, 1H, H-1'd), 3.88 - 3.73 (m, 1H, H-1'd'), 2.29 (t, $^3J_{\text{H}2''-\text{H}3''} = 7.4$ Hz, 2H, H-2''), 2.03 (s, 3H, CH_3CO) + 2.03 - 1.97 (m, 1H, H-12d), 1.88 - 1.07 (m, 25H), 1.01 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.55 (s, 3H, H-18).

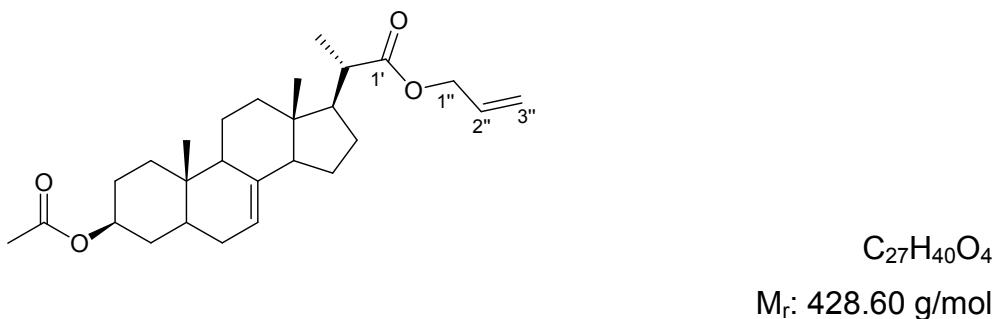
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 174.1 (C-1''), 170.9 (CH_3CO), 139.3 (C-8), 117.8 (C-7), 73.6 (C-3), 69.3 (C-1'), 54.8 (C-14), 52.8 (C-17), 49.3 (C-9), 43.6 (C-13), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 37.0 (C-1), 36.5 (C-20), 36.4 (C-2''), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.5 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (CH_3CO), 21.6 (C-11), 18.7 (C-3''), 17.5 (C-21), 13.9 (C-4''), 13.1 (C-19), 12.1 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 385 (78, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$), 357 (100, $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}+1]^+$), 297 (64, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}+1]^+$)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 444 (22, $[\text{M}]^{++}$), 384 (40, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}]^{++}$), 356 (16, $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}]^{++}$), 341 (24, $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}-\text{CH}_3]^{++}$), 313 (20, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{C}_3\text{H}_7\text{CO}]^{++}$), 296 (10, $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COOH}]^{++}$), 281 (44, $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3]^{++}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 444.3243 (62.3, ber. für: $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_4$, 444.3240)

6.2.57 (3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäureallylester (89)



Variante A:

Eine Lösung von Allylalkohol (105 μL , 90 mg, 1.55 mmol) in Dichlormethan (1.3 mL) wird auf 0 °C gekühlt. Es wird tropfenweise Triethylamin (269 μL , 195 mg, 1.93 mmol) und eine Lösung von (3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäurechlorid (**11**, 314 mg, 0.77 mmol) in Dichlormethan (0.5 mL) zugegeben. Die Reaktionslösung wird langsam auf RT erwärmt, 16 h gerührt und mit Chloroform (10 mL) verdünnt. Die Lösung wird mit verdünnter Salzsäure (2 M, 2 x 5 mL), gesättigter wässriger Natriumhydrogen-carbonat-Lösung (2 x 5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/EtOAc 95:5 → 80:20) und das Produkt als weißer Feststoff (40 mg, 0.09 mmol, 12 %) erhalten.

Variante B:

Zu einer Lösung von Allylalkohol (27 μL , 23 mg, 0.40 mmol) und (3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäure (**8**, 100 mg, 0.26 mmol) in Dichlormethan (1.3 mL) wird unter Schutzgas DMAP (10 mg, 0.080 mmol) gegeben. Nach 10 min Rühren wird portionsweise DCC (83 mg, 0.40 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei RT gerührt. Der entstehende Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und mit kaltem EtOAc gewaschen. Das Filtrat einschließlich des EtOAc zum Waschen wird zur Trockne eingedampft und der Rückstand erneut in kaltem EtOAc aufgenommen. Der hierbei erneut ausfallende Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert. Dieser Vorgang wird bis zur vollständigen Entfernung des Dicyclohexylharnstoffs wiederholt. Der nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum verbleibende Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt

(Hexan/EtOAc 95:5 → 80:20). Das Produkt fällt als weißer Feststoff (81 mg, 0.19 mmol, 47 %) an.

Schmelzpunkt: 138 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -5.0^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2941 (C-H), 1730 (C=O), 1654 (Alkyl), 1560 (Alkyl), 1458 (Alkyl), 1368 (Alkyl), 1245 (C-O), 1164 (C-O), 1035 (C-O)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.92 (tdd, ³J_{H2"-H3"(E)} = 17.2 Hz, ³J_{H2"-H3"(Z)} = 10.4 Hz, ³J_{H2"-H1"} = 5.6 Hz, 1H, H-2"), 5.35 - 5.29 (m, 1H, H-3"(E)), 5.25 - 5.21 (m, 1H, H-3"(Z)), 5.17 - 5.12 (m, 1H, H-7) 4.69 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.4 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.6 Hz, 1H, H-3), 4.58 - 4.53 (m, 2H, H-1"), 2.43 (dq, ³J_{H20-H17} = 10.0 Hz, ³J_{H20-H21} = 6.8 Hz, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH₃CO), 1.94 (dt, ³J_{H12a-H11a} = 12.0 Hz, ³J_{H12a-H11e} = ²J_{H12a-H12e} = 3.2 Hz, 1H, H-12a), 1.90 - 1.23 (m, 19H), 1.21 (d, ³J_{H21-H20} = 6.8 Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

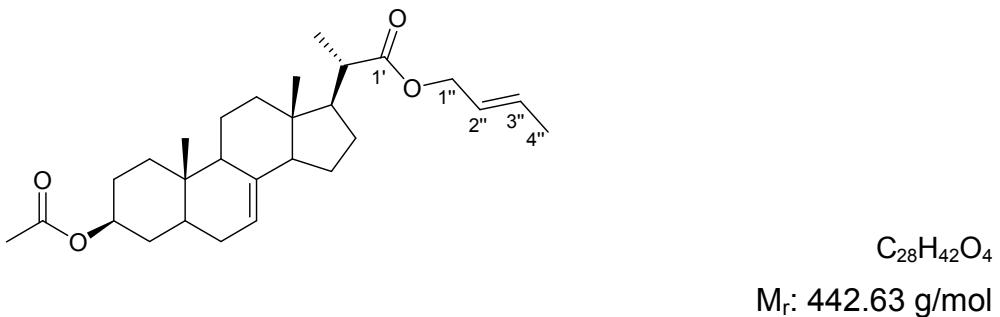
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 176.6 (C-1'), 170.9 (CO), 139.0 (C-8), 132.5 (C-2"), 118.4 (C-3"), 117.9 (C-7), 73.6 (C-3), 65.0 (C-1"), 54.6 (C-14), 52.9 (C-17), 49.3 (C-9), 43.5 (C-13), 43.1 (C-20), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.0 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 17.4 (C-21), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 429 (80, [M+1]⁺), 369 (100, [M-CH₃COOH]⁺), 343 (12, [M-C₄H₆O₂+1]⁺)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 428 (100, [M]⁺⁺), 413 (25, [M-CH₃]⁺⁺), 368 (80, [M-CH₃COOH]⁺⁺), 353 (48, [M-CH₃COOH-CH₃]⁺⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 428.2917 (100, ber. für: C₂₇H₄₀O₄, 428.2927)

6.2.58 (3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäurebut-2-enylester (90)



(3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäurechlorid (**11**, 157 mg, 0.39 mmol) wird in Dichlormethan (0.9 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Crotylalkohol (66 μ L, 56 mg, 0.77 mmol) und Triethylamin (135 μ L, 98 mg, 0.97 mmol) werden tropfenweise zugegeben. Die Reaktionslösung wird langsam auf RT erwärmt, 16 h gerührt und mit Chloroform (5 mL) verdünnt. Die Lösung wird mit verdünnter Salzsäure (2 M, 2 x 5 mL), gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 x 5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/EtOAc 9:1). Das Produkt fällt als weißer Feststoff (44 mg, 0.10 mmol, 26 %) an

Schmelzpunkt: 157 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -1.8^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 2948$ (C-H), 1732 (C=O), 1650 (Alkyl), 1562 (Alkyl), 1458 (Alkyl), 1370 (Alkyl), 1248 (C-O), 1160 (C-O), 1036 (C-O)

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 5.84 - 5.74 (m, 1H, H-2''), 5.62 - 5.54 (m, 1H, H-3''), 5.19 - 5.10 (m, 1H, H-7), 4.68 (tt, $^3J_{H3-H2a} = ^3J_{H3-H4a} = 11.3$ Hz, $^3J_{H3-H2e} = ^3J_{H3-H4e} = 4.7$ Hz 1H, H-3), 4.49 - 4.46 (m, 2H, H-1''), 2.40 (dq, $^3J_{H20-H17} = 10.2$ Hz, $^3J_{H20-H21} = 6.8$ Hz, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH_3CO), 1.94 (dt, $^2J_{H12e-H12a} = 12.2$ Hz, $^3J_{H12e-H11e} = ^3J_{H12e-H11a} = 3.2$ Hz, 1H, H-12e), 1.87 - 1.23 (m, 24H), 1.19 (d, $^3J_{H21-H20} = 6.9$ Hz, 3H, H-21), 1.16 - 1.09 (m, 1H, H-1d), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.53 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 176.8 (C-1'), 170.8 (CH₃CO), 139.0 (C-8), 131.4 (C-2''), 125.3 (C-3''), 117.9 (C-7), 73.5 (C-3), 65.0 (C-1''), 54.6 (C-14), 52.9 (C-17), 49.3 (C-9), 43.5 (C-13), 43.1 (C-20), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.0 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 18.0 (C-4''), 17.4 (C-21), 13.1 (C-19), 12.2 (C-18).

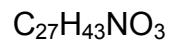
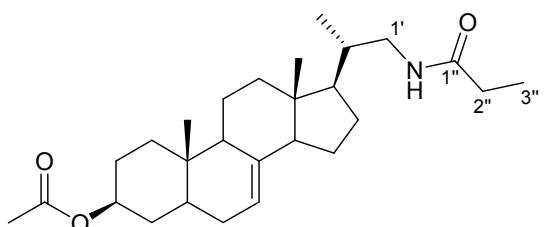
MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 443 (74, [M+1]⁺), 383 (100, [M-CH₃COOH]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 442.3063 (100, ber. für: C₂₇H₄₀O₄, 442.3083)

6.2.59 Synthese der sekundären Amide nach Tanabe¹⁰²

N-Methylimidazol (4 μ L, 4 mg, 0.05 mmol), Triethylamin (7 μ L, 5 mg, 0.05 mmol) und Kaliumcarbonat (111 mg, 0.80 mmol) werden zu einer Lösung von (3*S*,20*S*)-20-(Aminomethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**38**, 200 mg, 0.54 mmol) in Acetonitril (0.5 mL) gegeben. Bei 0 °C wird vorsichtig das entsprechende Carbonsäurechlorid (0.80 mmol, 1.5 eq.) zu der Lösung gegeben, langsam auf RT erwärmt und 16 h gerührt. Wasser (5 mL) wird zugegeben und das Gemisch mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 20:1).

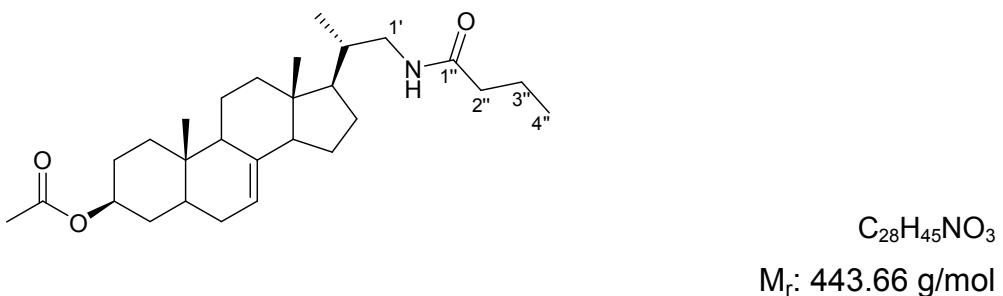
(3*S*,20*S*)-20-(Propionylamino-methyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**91**)



Carbonsäurechlorid: Propansäurechlorid**Ausbeute:** 133 mg (0.31 mmol, 57 %) weißer Feststoff**Schmelzpunkt:** 315 °C (Zersetzung ab 245 °C)**Spezifische Drehung:** $[\alpha]_D^{20} = -12.0^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)**IR (KBr):** $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2944 (C-H), 2870 (C-H), 2850 (C-H), 1730 (C=O Ester), 1647 (C=O Amid), 1474 (Alkyl), 1445 (Alkyl), 1379 (Alkyl), 1364 (Alkyl), 1244 (C-O), 1030 (C-O), 974 (C=C-H), 897 (C=C-H)

Doppelter Satz der NMR-Signale aufgrund von Rotameren:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.21 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.76 - 4.61 (m, 1H, H-3), 3.42 - 3.23 + 3.15 - 3.08 + 2.92 - 2.83 (3m, 2H, H-1'), 2.35 (q, ³J_{H2''-H3''} = 7.4 Hz, 1H, H-2''), 2.03 (s, 3H, CH₃CO) + 2.07 - 1.97 (m, 1H, H-12d), 1.97 - 1.05 (m, 25H), 0.91 + 0.84 (2d, ³J_{H21-H20} = 6.5 Hz, 3H, H-21), 0.81 + 0.80 (2s, 3H, H-19), 0.56 + 0.55 (2s, 3H, H-18).**¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 174.6 (C-1''), 170.9 + 170.9 (CH₃CO), 139.3 + 139.0 (C-8), 118.0 + 117.7 (C-7), 73.6 + 73.5 (C-3), 54.8 + 54.8 (C-17), 54.7 (C-14), 49.3 (C-9), 44.0 + 43.9 (C-13), 40.1 (C-5), 39.5 + 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 36.0 (C-20), 36.9 + 34.8 (C-1'), 34.3 + 34.3 (C-10), 33.9 + 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.9 + 27.9 (C-16), 27.6 (C-2), 27.0 + 23.3 (C-2''), 23.2 + 23.2 (C-15), 21.6 (C-11), 21.5 (CH₃CO), 17.0 + 16.9 (C-21), 13.1 (C-19), 12.1 + 12.1 (C-18), 10.0 + 10.0 (C-3'').**MS (EI):** ^{m/z} (rel. Int. in %) = 430 (12, [M+H]⁺)**HR-MS (EI):** ^{m/z} (rel. Int. in %) = 429.3242 (1.2, ber. für: C₂₇H₄₃NO₃: 429.3243)

(3S,20S)-20-(Butanoylamino-methyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (92)

Carbonsäurechlorid: Butansäurechlorid

Ausbeute: 140 mg (0.32 mmol, 59 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 215 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -1.2^\circ$ ($c = 2.5 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 2945$ (C-H), 2870 (C-H), 2849 (C-H), 1730 (C=O Ester), 1644 (C=O Amid), 1473 (Alkyl), 1445 (Alkyl), 1378 (Alkyl), 1363 (Alkyl), 1243 (C-O), 1030 (C-O), 974 (C=C-H), 897 (C=C-H)

Doppelter Satz der NMR-Signale aufgrund von Rotameren:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.22 - 5.08 (m, 1H, H-7), 4.77 - 4.60 (m, 1H, H-3), 3.46 - 3.24 + 3.16 - 3.03 + 2.96 - 2.80 (3m, 2H, H-1'), 2.38 - 2.23 (m, 1H, H-2''), 2.07 - 1.97 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CO} + \text{H-12d}$), 1.93 - 1.04 (m, 24H), 0.95 (t, $^3J_{\text{H}4''-\text{H}3''} = 7.4$ Hz, 3H, H-4''), 0.90 + 0.84 (2d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.81 + 0.80 (2s, 3H, H-19), 0.55 + 0.54 (2s, 3H, H-18).

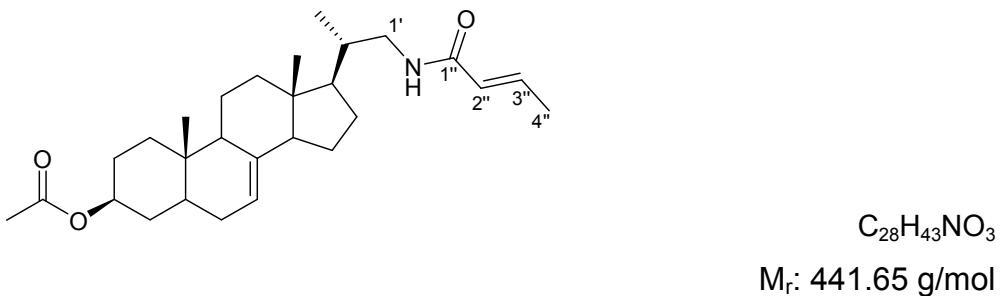
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 173.9 (C-1''), 170.9 + 170.9 (CH_3CO), 139.3 + 139.0 (C-8), 118.0 + 117.7 (C-7), 73.6 + 73.5 (C-3), 54.8 + 54.8 (C-17), 54.7 (C-14), 49.3 (C-9), 44.0 + 43.9 (C-13), 40.1 (C-5), 39.4 + 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 36.0 (C-20), 35.7 + 34.8 (C-1'), 34.3 + 34.3 (C-10), 33.9 + 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 28.0 + 27.9 (C-16), 27.6 + 27.6 (C-2), 23.3 + 23.2 (C-2''), 23.2 + 23.2 (C-15), 21.6 + 21.5

(C-11), 21.5 (CH₃CO), 19.2 (C-3''), 16.9 + 16.8 (C-21), 14.2 (C-4''), 13.1 (C-19), 12.1 + 12.1 (C-18).

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 444 (12, [M+H]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 443.3397 (0.8, ber. für: C₂₈H₄₅NO₃, 443.3399)

(3S,20S)-20-((E)-But-2-enoylamino-methyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (93)



Carbonsäurechlorid: (E)-2-Butenoylchlorid

Ausbeute: 106 mg (0.24 mmol, 45 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 243 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -2.0^\circ$ (c = 2x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2948 (C-H), 2878 (C-H), 2843 (C-H), 1736 (C=O Ester), 1661 (C=O Amid), 1613 (N-H Amid), 1473 (Alkyl), 1444 (Alkyl), 1376 (Alkyl), 1245 (C-O), 1031 (C-O), 965 (C=C-H)

Doppelter Satz der NMR-Signale aufgrund von Rotameren:

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 6.92 - 6.82 (m, 1H, H-3''), 6.30 - 6.23 (m, 1H H-2''), 5.22 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.75 - 4.63 (m, 1H, H-3), 3.47 - 3.39 + 3.38 - 3.30 + 3.24 - 3.15 + 2.96 - 2.86 (4m, 2H, H-1'), 2.05 - 2.00 (m, 4H, CH₃CO + H-12d),

1.98 - 1.90 (m, 1H, H-20) 1.90 - 1.07 (m, 23H), 0.90 + 0.87 (2d, $^3J_{H21-H20} = 6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.81 + 0.80 (2s, 3H, H-19), 0.55 (s, 3H, H-18).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 170.9 + 170.9 (CH_3CO), 167.3 (C-1''), 141.1 (C-3''), 139.4 + 139.1 (C-8), 122.6 (C-2''), 118.0 + 117.7 (C-7), 73.6 + 73.5 (C-3), 54.8 + 54.8 (C-17), 54.7 (C-14), 49.3 (C-9), 43.9 + 43.9 (C-13), 40.2 (C-5), 39.5 (C-12), 36.9 (C-1), 35.24 (C-1'), 34.3 (C-10), 33.9 + 33.9 (C-4), 29.6 + 29.6 (C-6), 28.0 + 27.8 (C-16), 27.6 (C-2), 23.3 + 23.2 (C-15), 21.6 (C-11), 21.5 (CH_3CO), 18.4 (C-4''), 17.2 + 17.0 (C-21), 13.1 (C-19), 12.1 + 12.1 (C-18)

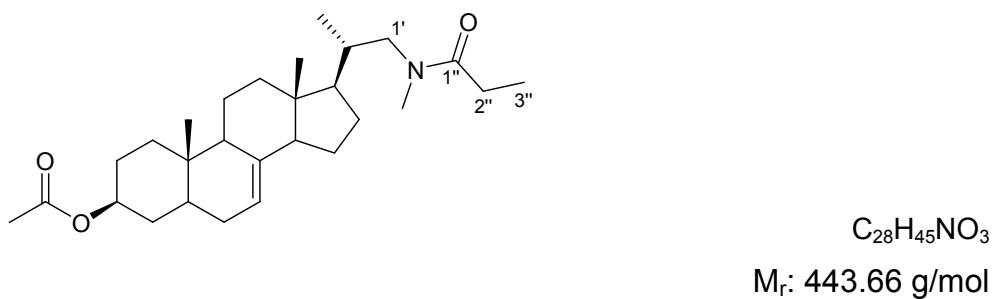
MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 442 (14, $[\text{M}+\text{H}]^{+*}$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 441.3238 (12, ber. für: $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{NO}_3$, 441.3243)

6.2.60 Synthese der tertiären Amide nach Tanabe¹⁰²

Zu einer Lösung von (3S,20S)-20-(Methylamino-methyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (**39**, 200 mg, 0.52 mmol) in CH_3CN (0.5 mL) wird *N*-Methylimidazol (4 μL , 4 mg, 0.05 mmol), Triethylamin (7 μL , 5 mg, 0.05 mmol) und Kaliumcarbonat (107 mg, 0.77 mmol) zugegeben. Die Suspension wird im Eisbad gekühlt und das entsprechende Carbonsäurechlorid (0.77 mmol, 1.5 eq.) langsam zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf RT erwärmt und 16 h gerührt. Wasser (5 mL) wird zugegeben und das Gemisch mit Dichlormethan (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (15 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen (15 mL) und im Anschluss über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1).

(3*S*,20*S*)-20-[(*N*-Methyl-*N*-propionylamino)-methyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (94)



Carbonsäurechlorid: Propansäurechlorid

Ausbeute: 140 mg (0.32 mmol, 62 %) gelblich-weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 163 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -25.0^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2964 (C-H), 2939 (C-H), 2880 (C-H), 2848 (C-H), 1724 (C=O Ester), 1653 und 1646 (C=O Amid), 1459 (Alkyl), 1380 (Alkyl), 1367 (Alkyl), 1279 (C-O), 1238 (C-O), 1030 (C-O), 896 (C=C-H)

Doppelter Satz der NMR-Signale aufgrund von Rotameren:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.22 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.74 - 4.63 (m, 1H, H-3), 3.37 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 13.6 Hz, ³J_{H1'd-H20} = 11.2 Hz) + 3.00 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 13.6 Hz, ³J_{H1'd-H20} = 11.2 Hz) (1H, H-1'd), 3.22 (dd, ²J_{H1'd'-H1'd} = 13.6 Hz, ³J_{H1'd'-H20} = 3.6 Hz) + 3.09 (dd, ²J_{H1'd'-H1'd} = 13.6 Hz, ³J_{H1'd'-H20} = 3.6 Hz) (1H, H-1'd'), 2.95 (s) + 2.88 (s) (3H, NCH₃), 2.35 (q, ³J_{H2''-H3''} = 7.6 Hz) + 2.33 (q, ³J_{H2''-H3''} = 7.6 Hz) (2H, H-2''), 2.05 (s, 3H, CH₃CO) + 2.07 - 1.97 (m, 1H, H-12d), 1.95 - 1.07 (m, 23H), 0.91 (d, ³J_{H21-H20} = 6.4 Hz) + 0.87 (d, ³J_{H21-H20} = 6.4 Hz) (3H, H-21), 0.81 (s) + 0.80 (s) (3H, H-19), 0.59 (s) + 0.55 (s) (3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 174.4 + 174.2 (C-1"), 170.9 + 170.0 (CH₃CO), 139.4 + 139.0 (C-8), 118.0 + 117.7 (C-7), 73.6 + 73.5 (C-3), 55.3 + 53.4

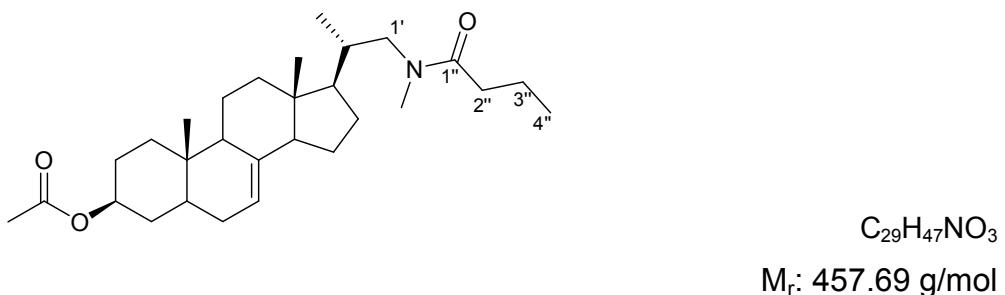
(C-1') 54.8 + 54.8 (C-17), 54.7 (C-14), 49.3 (C-9), 43.9 + 43.9 (C-13), 40.1 (C-5), 39.5 + 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 36.2 + 33.9 (NCH₃), 34.3 (C-10), 34.0 (C-4), 29.6 (C-6), 27.9 + 27.8 (C-16), 27.6 (C-2), 27.0 + 26.6 (C-2''), 23.3 + 23.2 (C-15), 21.6 (C-11), 21.5 (CH₃CO), 16.9 + 16.6 (C-21), 13.1 (C-19), 12.1 + 12.1 (C-18), 9.8 + 9.5 (C-3'').

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 444 (100, [M+1]⁺), 384 (80, [M-CH₃COOH+1]⁺)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 443 (55, [M]⁺⁺), 414 (12, [M-C₂H₅]⁺⁺), 383 (16, [M-CH₃COOH]⁺⁺), 313 (36, [M-CH₃NHCOC₂H₅-C₂H₃O]⁺⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 443.3407 (55.3, ber. für C₂₈H₄₅NO₃: 443.3399)

(3S,20S)-20-[(N-Methyl-N-butylamino)-methyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (95)



Carbonsäurechlorid: Butansäurechlorid

Ausbeute: 210 mg (0.46 mmol, 88 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 166 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -9.0^\circ$ (c = 3x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2945 (C-H), 2873 (C-H), 2852 (C-H), 1728 (C=O Ester), 1646 und 1630 (C=O Amid), 1466 (Alkyl), 1383 (Alkyl), 1365 (Alkyl), 1266 (C-O), 1241 (C-O), 1037 (C-O), 898 (C=C-H)

Doppelter Satz der NMR-Signale aufgrund von Rotameren:

¹H NMR (400 MHz, C₂D₂Cl₄, 120 °C): δ (ppm) = 5.29 - 5.21 (m, 1H, H-7), 4.79 - 4.68 (m, 1H, H-3), 3.42 - 3.12 (bs, 2H, H-1'), 2.96 (s, 3H, NCH₃), 2.32 (t, ³J_{H2"-H3"} = 7.4 Hz, 2H, H-2"), 2.13 - 2.07 (m, 1H, H-12d), 2.05 (s, 3H, CH₃CO), 1.94 - 1.27 (m, 21H) 1.24 - 1.16 (m, 1H, H-1d), 1.02 (t, ³J_{H4"-H3"} = 7.4 Hz, 3H, H-4"), 0.97 (d, ³J_{H21-H20} = 6.4 Hz, 3H, H-21), 0.89 (s, 3H, H-19), 0.65 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, C₂D₂Cl₄, 120 °C): δ (ppm) = 173.1 (C-1"), 170.4 (CH₃CO), 139.4 (C-8), 117.9 (C-7), 73.7 (C-3), 55.5 (C-17 und C-1'), 55.1 (C-14), 49.9 (C-9), 44.1 (C-13), 40.6 (C-5), 39.9 (C-12), 37.3 (C-1), 36.1 (NCH₃), 35.7 (C-2"), 34.6 (C-10), 34.2 (C-4), 29.9 (C-6), 27.9 (C-16), 27.7 (C-2), 23.3 (C-15), 21.8 (C-11), 21.4 (CH₃CO), 18.9 (C-3"), 17.1 (C-21), 14.1 (C-4"), 12.9 (C-19), 12.1 (C-18).

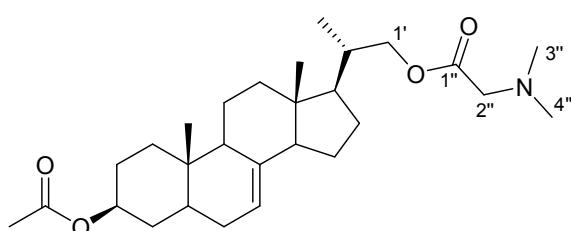
MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 458 (100, [M+1]⁺), 398 (82, [M-CH₃COOH+1]⁺)

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 457 (72, [M]⁺⁺), 397 (20, [M-CH₃COOH]⁺⁺), 356 (18, [M-CH₃NHCOC₃H₇]⁺⁺), 313 (45, [M-CH₃NHCOC₃H₇-C₂H₃O]⁺⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 457.3561 (100.0, ber. für C₂₉H₄₇NO₃: 457.3556)

Elementaranalyse (gem.(ber.), %): **C:** 75.83 (76.10), **H:** 10.41 (10.35), **N:** 2.92 (3.06)

6.2.61 (3S,20S)-20-[(Dimethylamino)-acetoxymethyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (96)



M_r: 459.66 g/mol

Eine Lösung von (3S,20S)-20-Hydroxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (**6**, 90 mg, 0.24 mmol), *N,N*-Dimethylglycin (27 mg, 0.26 mmol) und DMAP (9 mg, 0.07 mmol) in Dichlormethan (5 mL) wird unter Schutzgasatmosphäre auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung von DCC (54 mg, 0.26 mmol) in Dichlormethan (1 mL) wird sehr langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch langsam auf RT erwärmt. Es wird 16 h bei RT gerührt. Der entstehende Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert und mit kaltem EtOAc gewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und der Rückstand in kaltem EtOAc wieder aufgenommen. Der dabei erneut ausfallende Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, und der gesamte Vorgang wiederholt bis kein Dicyclohexylharnstoff mehr ausfällt. Das so erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/MeOH 20:1) aufgereinigt und das Produkt als weißer Feststoff (78 mg, 0.17 mmol, 71 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 105 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +2.0^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2947 (C-H), 2898 (C-H), 2871 (C-H), 2850 (C-H), 1743 (C=O), 1728 (C=O), 1469 (Alkyl), 1457 (Alkyl), 1382 (Alkyl), 1245 (C-O), 1178 (C-O), 1141 (C-O), 1032 (C-O), 972 (C=C-H)

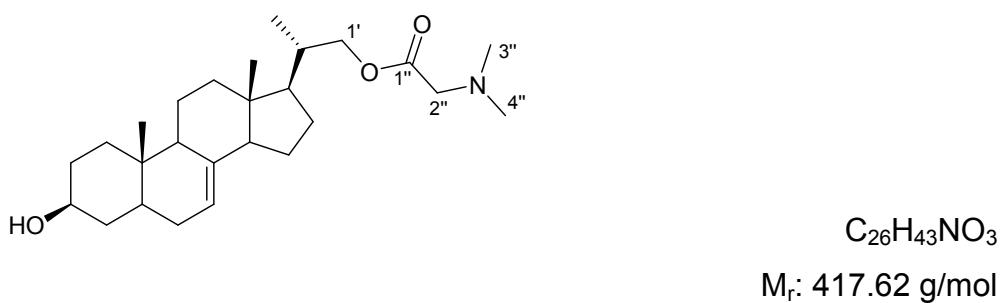
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.20 - 5.08 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, ³J_{H3-H2a} = ³J_{H3-H4a} = 11.3 Hz, ³J_{H3-H2e} = ³J_{H3-H4e} = 4.6 Hz 1H, H-3 1H), 4.13 (dd, ²J_{H1'd-H1'd'} = 10.7 Hz, ³J_{H1'd-H20} = 3.4 Hz 1H, H-1'd), 3.85 (dd, ²J_{H1'd'-H1'd} = 10.7 Hz, ³J_{H1'd'-H20} = 7.7 Hz, 1H, H1'd'), 3.17 (s, 2H, H-2''), 2.35 (s, 6H, 2 x NCH₃), 2.02 (s, 3H, CH₃CO) + 2.03 - 1.96 (m, 1H, H-12d), 1.89 - 1.20 (m, 19H), 1.16 - 1.06 (m, 1H, H-1d), 1.01 (d, ³J_{H21-H20} = 6.6 Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 171.1 (C-1''), 170.8 (CH₃CO), 139.2 (C-8), 117.8 (C-7), 73.6 (C-3), 69.6 (C-1'), 60.6 (C-2''), 54.8 (C-14), 52.8 (C-17), 49.4 (C-9), 45.5 (NCH₃), 43.7 (C-13), 40.2 (C-5), 39.5 (C-12), 37.0 (C-1), 36.4 (C-20), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.5 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.6 (C-11), 17.5 (C-21), 13.1 (C-19), 12.0 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 460 (100, $[M+1]^+$), 400 (94, $[M-CH_3COOH+1]^+$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 459.3346 (100.0, ber. für $C_{28}H_{45}NO_4$: 459.3349)

6.2.62 (3S,20S)-20-[(Dimethylamino)-acetoxyethyl]-pregn-7-en-3-ol (97)



(3S,20S)-20-[(Dimethylamino)-acetoxyethyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (**96**, 100 mg, 0.22 mmol) wird in einem Gemisch von Dichlormethan und MeOH (3:2, 2 mL) gelöst und Kaliumcarbonat (91 mg, 0.66 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei RT gerührt und im Anschluss über Celit filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum eingeengt, der Rückstand in einem Gemisch von Dichlormethan und MeOH (15:1) gelöst und ein weiteres Mal über Celit filtriert. Das Filtrat wird aufkonzentriert und das so erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt ($CH_2Cl_2/MeOH$ 20:1). Das Produkt wird als weißer Feststoff (58 mg, 0.14 mmol, 64 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 112 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -1.2^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3340 (O-H), 2947 (C-H), 2898 (C-H), 2871 (C-H), 2850 (C-H), 1743 (C=O), 1465 (Alkyl), 1456 (Alkyl), 1248 (C-O), 1148 (C-O), 1038 (C-O), 968 (C=C-H)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 5.20 - 5.08 (m, 1H, H-7), 3.59 (tt, $^3J_{H3-H2a} = 11.0$ Hz, $^3J_{H3-H2e} = 3J_{H3-H4e} = 4.4$ Hz 1H, H-3 1H), 4.18 - 4.07 (m, 1H,

H-1'd), 3.84 (dd, $^2J_{H1'd'-H1'd} = 10.6$ Hz, $^3J_{H1'd'-H20} = 7.6$ Hz, 1H, H1'd'), 3.18 (s, 2H, H-2''), 2.35 (s, 6H, 2 x NCH₃), 2.03 - 1.94 (m, 1H, H-12d), 1.89 - 1.16 (m, 20H), 1.03 (d, $^3J_{H21-H20} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.54 (s, 3H, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 171.0 (C-1''), 139.3 (C-8), 117.9 (C-7), 71.3 (C-3), 69.7 (C-1'), 60.6 (C-2''), 55.3 (C-17), 55.0 (C-14), 49.4 (C-9), 45.5 (NCH₃), 43.7 (C-13), 40.4 (C-5), 39.5 (C-12), 38.0 (C-4), 37.3 (C-1), 36.9 (C-20), 34.3 (C-10), 31.6 (C-2), 29.8 (C-6), 27.9 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (C-11), 18.3 (C-21), 13.2 (C-19), 12.0 (C-18).

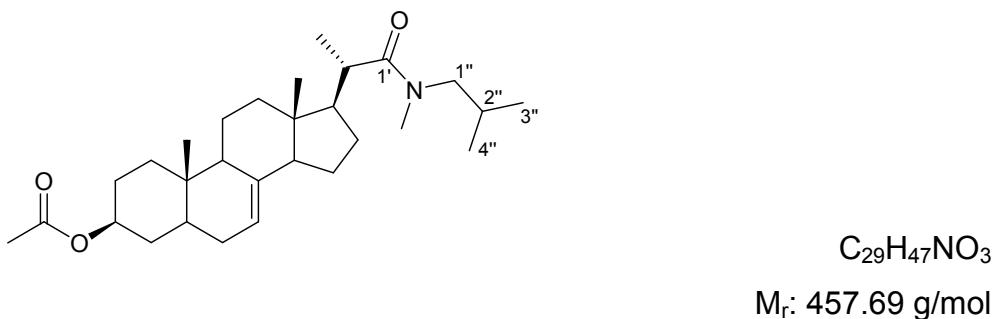
MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 418 (80, [M+1]⁺), 400 (100, [M-H₂O+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 417.3249 (100.0, ber. für C₂₆H₄₃NO₃: 417.3243)

6.2.63 (3S,20S)-20-[N-Methyl-N-(2-methylpropyl)-aminocarbonyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (98) und (3S,20S)-20-(N,N-Dimethylaminocarbonyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (99)

Zu einer Lösung von (3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl-methansäurechlorid (**11**, 105 mg, 0.26 mmol) in Dichlormethan (1.7 mL) wird unter Schutzgas N-Methyl-N'-butylamin (123 µL, 90 mg, 1.03 mmol) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 16 h bei RT gerührt, mit Dichlormethan (5 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger Natriumcarbonat-Lösung (2 x 5 mL) und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (2 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 4:1 → 1:1) aufgereinigt und die Produkte **98** und **99** werden als weiße kristalline Feststoffe erhalten (Elutionsreihenfolge: **98**, **99**).

(3S,20S)-20-[N-Methyl-N-(2-methylpropyl)-aminocarbonyl]-pregn-7-en-3-ylacetat (98)



Ausbeute: 50 mg (0.11 mmol, 42 %)

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 183 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 29.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-3}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} (\text{cm}^{-1}) = 2971$ (C-H), 2949 (C-H), 2930 (C-H), 2871 (C-H), 2851 (C-H), 2805 (C-H), 1725 (C=O Ester), 1642 (C=O Amid), 1480 (Alkyl), 1460 (Alkyl), 1406 (Alkyl), 1387 (Alkyl), 1366 (Alkyl), 1238 (C-O), 1137 (C-O), 1031 (C-O), 969 (C=C-H), 894 (C=C-H)

Doppelter Satz der NMR-Signale aufgrund von Rotameren:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.19 - 5.08 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, $^3J_{\text{H}3\text{-H}2\text{a}} = ^3J_{\text{H}3\text{-H}4\text{a}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H}3\text{-H}2\text{e}} = ^3J_{\text{H}3\text{-H}4\text{e}} = 4.6$ Hz, 1H, H-3), 3.37 (dd, $^3J_{\text{H}1''\text{d}-\text{H}2''} = 13.3$ Hz, $^2J_{\text{H}1''\text{d}-\text{H}1''\text{d}'} = 7.7$ Hz) + 3.19 (dd, $^3J_{\text{H}1''\text{d}'-\text{H}2''} = 14.3$ Hz, $^2J_{\text{H}1''\text{d}'-\text{H}1''\text{d}} = 7.7$ Hz) + 3.10 - 2.99 (m) + 2.91 (s) (5 H, H-1'' + NCH_3), 2.70 (dq, $^3J_{\text{H}20-\text{H}17} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{H}20-\text{H}21} = 6.6$ Hz, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH_3CO), 1.98 - 1.23 (m, 20H), 1.14 (d, $^3J_{\text{H}21-\text{H}20} = 6.6$ Hz, 3H, H-21), 1.10 - 1.02 (m, 1H, H-1d), 0.93 + 0.92 und 0.88 - 0.86 (2 x 2d, $^3J_{\text{H}3''/\text{H}4''-\text{H}2''} = 6.7$ Hz, 2 x 3H) (H3'' + H-4''), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.58 + 0.57 (2s, 3H, H-18).

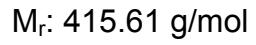
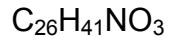
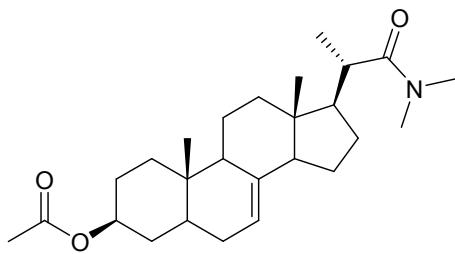
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 177.1 + 176.8 (C-1'), 170.8 (CH_3CO), 139.3 + 139.3 (C-8), 117.7 + 117.7 (C-7), 73.6 (C-3), 57.8 + 55.3 (C-1''), 54.6 + 54.5

(C-14), 53.4 + 52.9 (C-17), 49.4 + 49.3 (C-9), 43.3 + 43.2 (C-13), 40.1 (C-5), 39.5 (C-12), 38.8 + 38.8 (C-20), 37.9 + 36.5 (NCH₃), 36.9 (C-1), 34.8 + 28.3 (C-2''), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.8 + 27.6 (C-2), 27.1 + 27.0 (C-16), 23.2 + 23.0 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.6 + 21.5 (C-11), 20.3 + 20.3 + 20.2 (C-3'' + C-4''), 18.0 + 17.4 (C-21), 13.1 (C-19), 12.5 + 12.5 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 458 (100, [M+1]⁺), 398 (92, [M-CH₃COOH+1]⁺)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 457.3549 (100.0, ber. für C₂₉H₄₇NO₃: 457.3556)

(3S,20S)-20-(N,N-Dimethylaminocarbonyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (99)



Ausbeute: 42 mg (0.10 mmol, 38 %)

Schmelzpunkt: 240 °C (Zersetzung ab 180 °C)

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 18.0^\circ$ (c = 1x10⁻³, CH₂Cl₂)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2968 (C-H), 2950 (C-H), 2869 (C-H), 1732 (C=O Ester), 1648 (C=O Amid), 1480 (Alkyl), 1458 (Alkyl), 1389 (Alkyl), 1370 (Alkyl), 1242 (C-O), 1032 (C-O), 898 (C=C-H)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.20 - 5.08 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, $^3J_{\text{H}3\text{-H}2\text{a}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H}3\text{-H}2\text{e}} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 3.06 (s, 3H, NCH₃), 2.94

(s, 3H, NCH₃), 2.78 - 2.66 (m, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH₃CO), 1.98 - 1.93 (m, 1H, H-12d), 1.92 - 1.29 (m, 20H), 1.13 (d, ³J_{H21-H20} = 6.7 Hz, 3H, H-21) + 1.18 - 1.11 (m, 1H, H-1d), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.57 (s, 3H, H-18).

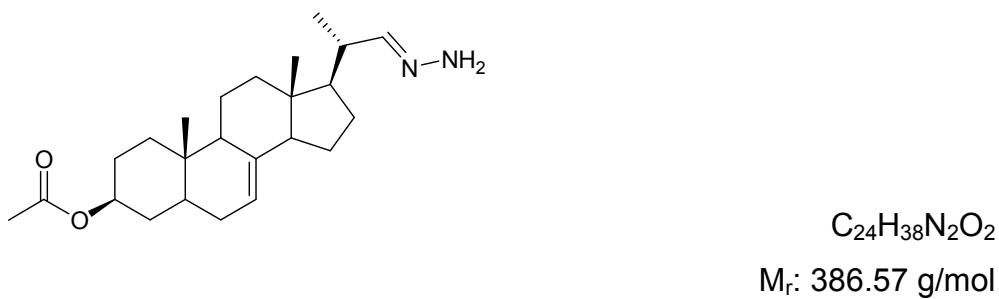
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 176.9 (CON(CH₃)₂), 170.8 (CH₃CO), 139.3 (C-8), 117.7 (C-7), 73.6 (C-3), 54.6 (C-14), 53.1 (C-17), 49.3 (C-9), 43.3 (C-13), 40.1 (C-5), 39.4 (C-12), 38.3 (C-20), 37.7 (NCH₃), 36.9 (C-1), 36.7 (NCH₃), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.6 (C-6), 27.6 (C-2), 27.4 (C-16), 23.1 (C-15), 21.6 (CH₃CO), 21.5 (C-11), 17.4 (C-21), 13.1 (C-19), 12.5 (C-18).

MS (Cl): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 416 (24, [M+1]⁺), 356 (100, [M-CH₃COOH+1]⁺)

MS (EI): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 415 (100, [M]⁺⁺), 400 (18, [M-CH₃]⁺⁺), 355 (40, [M-CH₃COOH]⁺⁺)

HR-MS (EI): ^{m/z} (rel. Int. in %) = 415.3052 (100, ber. für C₂₇H₄₁NO₃: 415.3087)

6.2.64 (3S,20S)-20-(1-Hydrazono-methyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (100)



(3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (**3**, 100 mg, 0.27 mmol) wird in Hydrazin-Lösung (1 M in THF, 5 mL, 5.00 mmol) gelöst und 2 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wird weitere 16 h bei RT gerührt, anschließend mit Wasser (10 mL) versetzt. und mit verdünnter Salzsäure (2 M) neutralisiert. Das zweiphasige Gemisch wird mit Dichlormethan (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen und

über MgSO_4 getrocknet. Das nach Eindampfen des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Hexan/EtOAc 9:1) aufgereinigt, und das Produkt (als weißer Feststoff (97 mg, 0.25 mmol, 93 %) erhalten.

Schmelzpunkt: 200 °C

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -2.0^\circ$ ($c = 1 \times 10^{-2}$, CH_2Cl_2)

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2949 (C-H), 2903 (C-H), 2869 (C-H), 2844 (C-H), 1729 (C=O), 1664 (N-H), 1470 (Alkyl), 1444 (Alkyl), 1380 (Alkyl), 1244 (C-O), 1063 (C-O), 1031 (C-H), 972 (C=C-H),

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 5.21 - 5.09 (m, 1H, H-7), 4.69 (tt, $^3J_{\text{H}3\text{-H}2\text{a}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H}3\text{-H}2\text{e}} = 4.5$ Hz, 1H, H-3), 4.13 (d, $^3J_{\text{H}1'\text{-H}2\text{d}} = 2.3$ Hz, 1H, H-1'), 2.02 (s, 3H, CH_3CO) + 2.05 - 1.94 (m, 1H, H-12d), 1.91 - 1.23 (m, 21H), 1.18 - 1.07 (m, 1H, H-1d), 0.96 (d, $^3J_{\text{H}21\text{-H}2\text{d}} = 6.7$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.53 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 170.8 (CH_3CO), 139.5 (C-8), 117.6 (C-7), 109.3 (C-1'), 73.6 (C-3), 54.6 (C-14), 51.9 (C-17), 49.4 (C-9), 43.7 (C-13), 40.1 (C-5), 40.1 (C-20), 39.4 (C-12), 36.9 (C-1), 34.3 (C-10), 33.9 (C-4), 29.7 (C-6), 27.6 (C-2), 27.5 (C-16), 23.2 (C-15), 21.6 (CH_3CO), 21.6 (C-11), 13.1 (C-19), 12.0 (C-21), 11.9 (C-18).

MS (Cl): m/z (rel. Int. in %) = 387 (68, $[\text{M}+1]^+$), 359 (100, $[\text{M}-\text{N}_2\text{H}_4+1]^+$), 356 (60, $[\text{M}-\text{N}_2\text{H}_4+1]^+$), 327 (72, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+1]^+$), 295 (36, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{N}_2\text{H}_4+1]^+$)

HR-MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 386.2931 (0.7, ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_2$: 386.2933)

6.3 Testmethoden der biologischen Prüfung

6.3.1 Agar-Diffusionstest

Von den zu testenden Substanzen sowie den Referenzsubstanzen Clotrimazol und Tetracyclin-Hydrochlorid werden, abhängig von der Löslichkeit, 1%-ige (m/V) Lösungen in Dichlormethan oder DMSO hergestellt. Je 5 µL dieser Stammlösungen der Testsubstanzen bzw. 2.5 µL der Lösungen der Referenzsubstanzen werden auf Rundfilter (Firma Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) aufgetragen. Das verwendete Lösungsmittel wird anschließend über Nacht verdampft. Bei Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für schwerlösliche Testsubstanzen, werden zusätzlich Rundfilter mit 5 µl DMSO zur Darstellung eines Blindwertes analog präpariert. Mit diesem Blindwert kann bestätigt werden, dass eventuelle DMSO-Rückstände durch unvollständiges Abdampfen keine Auswirkungen auf das Wachstum der verwendeten Bakterien und Pilze haben.

Die Pilze und Bakterien wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) bezogen und zunächst nach der mitgelieferten Vorschrift in einer Flüssigkultur gezüchtet. Die sterilen Arbeiten werden unter der Laminar-Tariflos-Arbeitsbank vom Typ Heraeus (Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Für *Candida glabrata*, *Hyphopichia burtonii*, *Yarrowia lipolytica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas antimicrobia*, *Streptococcus entericus* und *Staphylococcus equorum* dient ein AC-Agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) als Nährmedium: AC-Agar (35.2 g) und Agar (2.0 g) zur Verfestigung werden in Wasser (1.0 L) suspendiert und anschließend autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen werden je 15 mL des noch warmen, flüssigen Agars in Petrischalen gegeben und ca. 30 Minuten stehen gelassen. Für *Aspergillus niger* wird ein Kartoffel-Agar verwendet: Kartoffel-Dextrose-Agar (39.0 g) und Agar (1.0 g) zur Verfestigung werden in Wasser (1.0 L) suspendiert und autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen werden je 15 mL des noch warmen und flüssigen Agars in Petrischalen gegeben und ca. 30 Minuten stehen gelassen.

Unter sterilen Arbeitsbedingungen wird nun der entsprechende Keim mit einer Metallöse auf das jeweilige Nährmedium aufgetragen und die Agarplatte mit je vier

Substanzplättchen belegt. Als Kontrolle werden zudem die genannten Referenzsubstanzen und die nur mit dem Lösungsmittel präparierten Plättchen aufgetragen. Danach erfolgt die Inkubation in einem Trockenschrank bei einer Bruttemperatur von 32.1 °C für Bakterien und 28.0 °C für Pilze. Nach 36 h erfolgt die Auswertung der Testergebnisse durch manuelles Ausmessen der Durchmesser der Hemmhöfe.

6.3.2 MTT-Test

Der MTT-Test erfolgt an Zellen der humanen Leukämie-Zelllinie HL 60 (DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig, Deutschland), die zunächst nach der mitgelieferten Vorschrift in einer Flüssigkultur gezüchtet werden. Von den zu untersuchenden Substanzen wird jeweils eine 10 µM-Stammlösung in Ethanol, Methanol, DMSO oder Aceton hergestellt. Daraus wird durch 1:1-Verdünnungen eine Verdünnungsreihe (10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1.25 µM und 0.625 µM) erstellt. Als Blindprobe dient eine Mischung aus Nährmedium (99 µL) und DMSO (1 µL). Kontrollzellen werden mit reinem Nährmedium, ohne verwendetes Lösungsmittel und Substanz, versetzt. Als Positivkontrolle wird eine Triton® X-100 Lösung mit einer Endkonzentration von 1 µg/mL verwendet. Von jeder Verdünnung wird 1 µL in ein mit 99 µL einer HL 60-Zellsuspension (ca. 9×10^5 Zellen/mL) versehenes Well pipettiert. Nach Inkubation der Testplatte (24 h, 37 °C, 5% CO₂, 90% Luftfeuchtigkeit) wird jedes Well mit einer MTT-Lösung (10 µL, 5 mg/mL in PBS) versetzt und weitere 2 h bei den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird DMSO (190 µL) zugesetzt und nach 60 min, unter gelegentlichem Schütteln, wird die Platte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570$ nm (Referenzwellenlänge $\lambda = 630$ nm) photometrisch in einem ELISA Reader (SLT Spectra, Crailsheim; Deutschland) vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse werden statistisch ausgewertet.

6.3.3 Ergosterolbiosynthese-Assay

Diese Testungen wurden von Christoph Müller durchgeführt.

6.3.3.1 Inkubation mit Testsubstanzen

Im Ergosterolbiosynthese-Assay wird an den Pilzen *Candida glabrata*, *Yarrowia lipolytica* und *Saccharomyces cerevisiae* getestet. Die Testsubstanzen werden in Ethanol (alternativ: ein Ethanol/Wasser-Gemisch oder DMSO) zu 0.8 mg/mL gelöst, um Stammlösungen der jeweiligen Verbindungen zu erhalten. Die Stammlösung entspricht nach einer Zugabe von 10 µL zu den verschiedenen Pilzsuspensionen einer Testkonzentration von 8 µg/mL. Die Stammlösungen der einzelnen Testsubstanzen werden mit dem entsprechenden Lösungsmittel schrittweise je 1:1 verdünnt, so dass nach einer Zugabe von 10 µL zu den verschiedenen Pilzsuspensionen Testkonzentrationen von 8.0 µg/mL, 4.0 µg/mL, 2.0 µg/mL, 1.0 µg/mL, 0.50 µg/mL und 0.25 µg/mL erreicht werden. Die verschiedenen Pilz-Stammkulturen werden in der Sterilbank mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt und photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen einen 0.5-molaren McFarland Standard vermessen. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL der Stammkultur wird über einen Dreisatz der gemessenen Absorptionen berechnet, unter der Annahme, dass der McFarland Standard 5×10^6 KBE/mL entspricht (Formel 1):

$$\text{KBE/mL}_{\text{Stamm}} = \frac{5 \times 10^6 \times A_{\text{ZLsg}} \times 10}{A_{\text{McFarland}}}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung der KBE/mL der Stammkultur; KBE/mL_{Stamm}: Koloniebildende Einheiten pro mL Stammkultur, A_{ZLsg}: Absorption der Pilzzelllösung, A_{McFarland}: Absorption des 0.5-molaren McFarland Standards

Mit der so berechneten Anzahl an KBE pro mL der Stammkultur wird das Inokulum berechnet, das benötigte Volumen einer 1:100 Verdünnung eben dieser Stammkultur, welches 100.000 KBE entspricht (Formel 2):

$$V = \frac{100000 \times 1000 \times 100}{\text{KBE/mL}_{\text{Stamm}}} [\mu\text{L}]$$

Formel 2: Berechnung des 100.000 KBE entsprechenden Volumens; V: Volumen einer 1:100 Verdünnung der Stammkultur in μL entsprechend 100.000 KBE, KBE/mL_{Stamm}: Koloniebildende Einheiten pro mL Stammkultur

Die nachfolgenden Arbeitsschritte werden in einer Sterilbank durchgeführt. Die Stammkultur wird mit Medium 1:100 (10 μL ad 10 mL) verdünnt. In jedes Well einer 24 Well-Testplatte wird das Inokulum pipettiert (Endkonzentration: 50.000 KBE/mL) und mit Medium auf 1990 μL aufgefüllt. 10 μL der jeweiligen Testsubstanzlösung werden hinzupipettiert und die Platte vorsichtig 30 s geschwenkt. Die Testplatte wird inkubiert (48 ± 2 h, 28 °C, Luftzufuhr Stufe 6) und anschließend die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Anschließend kann die Aufarbeitung von Inkubationsansätzen ausgesuchter Konzentrationen zur Ermittlung der Enzyminhibition im Cholesterin- bzw. Ergosterolbiosynthese-Assay nach den jeweiligen Vorschriften (Kapitel 6.3.3.3 und 6.3.4.3) durchgeführt werden.

6.3.3.2 Bestimmung der MHK

Die MHK ist als die Konzentration einer Substanz definiert, bei der optisch kein Pilzwachstum mehr erkennbar ist. Die Bestimmung der MHK erfolgt visuell nach einer Inkubationszeit von 48 ± 2 h.

6.3.3.3 Aufschluss der Zellen und Extraktion der Sterole

Für die weitere Aufarbeitung werden die Wells ausgewählt, deren Inhibitor-Konzentrationen einem Viertel bzw. einem Achtel der MHK entsprechen (alternativ: entsprechend der Hälfte der MHK). Eventuell muss für diese Auswahl in einem engeren Konzentrationsbereich getestet werden oder insgesamt 72 h inkubiert werden.

Der Inhalt der Wells wird möglichst vollständig in ein 2 mL Plastiktube überführt und 5 min zentrifugiert ($15.000 \times g$). Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und

verworfen. Das Well wird mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, 1000 µL) gewaschen und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Wiederum wird der Überstand abgenommen und verworfen. Zu dem daraus resultierenden Pellet wird Natronlauge (1 M, 1 mL) gegeben, das Plastiktube mit Stickstoff versehen und verschlossen. Nach Behandlung im Ultraschallbad (5 min) wird die Probe auf 70 °C erwärmt. Nach einer Stunde wird TBME (650 µL) und eine Lösung des internen Standards (I.S., 100 µL, Cholestan 50 µg/mL) zugegeben, 1 min kräftig geschüttelt und anschließend 3 min zentrifugiert (10.000 × g). Der Überstand wird abgenommen und in ein 2 mL-Plastiktube überführt, das eine Verreibung von Na₂SO₄ und PSA (7:1, 40 mg) enthält. Die Extraktion wird mit TBME (750 µL) wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit der Verreibung geschüttelt und anschließend 3 min zentrifugiert (10.000 × g). 1.0 mL des Überstandes wird in ein Braunglasvial überführt und bei ca. 50 °C unter einem Stickstoffstrom zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in TBME (950 µL) aufgenommen und Trimethylsilylimidazol (50 µL) zu dieser Lösung gegeben. Die Silylierung ist nach 30 min bei RT abgeschlossen. Je nach erhaltener Biomasse (empirischer Wert) werden 0.5 - 2.0 µL dieser Lösung in das spezifizierte GC/MS-System injiziert.

6.3.3.4 Identifizierung des inhibierten Enzyms⁷⁴

Zur Identifizierung des oder der inhibierten Enzyme wird das durch Vermessung im GC/MS-System erhaltene Chromatogramm auf charakteristische Markersterole hin analysiert. Diese können anhand ihrer relativen Retentionszeit, der spezifischen Qualifier-Ionen und Abgleich mit einer im AK Bracher aufgebauten MS-Datenbank identifiziert werden. Durch den Nachweis eines oder mehrerer charakteristischer Markersterole können somit inhibierte Enzyme der Ergosterolbiosynthese abgeleitet werden.

6.3.4 Cholesterolbiosynthese-Assay¹⁶⁴

Diese Testungen wurden von Christoph Müller durchgeführt.

6.3.4.1 Herstellung der Substanzlösungen

Für ein qualitatives Screening wird jede Substanz in Konzentrationen von 1 μ M und 50 μ M getestet. Die Solleinwaage der Substanzen für die benötigte ethanolische Lösung (1 mL) wird dabei so berechnet, dass sich eine Endkonzentration von 50 μ M ergibt, wenn 10 μ L dieser Lösung in 990 μ L Medium pipettiert werden. Anschließend wird diese Lösung 1:50 verdünnt, so dass sich eine Endkonzentration von 1 μ M ergibt, wenn 10 μ M dieser Lösung in 990 μ L Medium pipettiert werden.

6.3.4.2 Inkubation

Zur Testung der Substanzen werden ca. 1 Million Zellen der humanen Leukämiezelllinie HL 60 in eine 24 Well-Testplatte überführt und mit lipid- und cholesterolfreiem RPMI 1640 Medium (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland), das 10 % fetales Rinderserum (FBS) enthält, auf ein Volumen von 990 μ L aufgefüllt. Anschließend werden die entsprechenden Substanzlösungen (je 10 μ L) und für die Negativkontrolle Ethanol (10 μ L) zupipettiert. Die Testplatte wird 30 s geschwenkt und dann im Brutschrank inkubiert (24 h, 37 °C, 5% CO₂, 90% Luftfeuchtigkeit).

6.3.4.3 Aufschluss der Zellen und Extraktion der Sterole

Zur Sterolextraktion wird der Inhalt der Wells der Testplatte jeweils in ein 2 mL-Plastiktube überführt. Jedes Well wird mit PBS (750 μ L) nachgewaschen. Durch Zentrifugieren (540 x g, 5 min) werden die Zellen vom Überstand abgetrennt und erneut mit PBS (1 mL) gewaschen. Es wird unter Schutzgas Natronlauge (1 M, 1 mL) zugesetzt bevor die Proben kurz geschüttelt und anschließend in ein 5 mL-Glasvial überführt werden. Die Proben werden eine Stunde bei 70 °C im Trockenschrank erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird eine Lösung des internen Standards (50 μ L, 10 μ g Cholestan in 1 mL TBME) und TBME (700 μ L) zugesetzt.

Es wird 1 min kräftig geschüttelt und anschließend zentrifugiert (9200 x g, 5 min). Nach Abnehmen der organischen Phase wird dieser Vorgang wiederholt. Die vereinten organischen Phasen werden in ein 2 ml-Plastikvial überführt, das eine Mischung aus Natriumsulfat und PSA enthält (7:1, 40 mg). Das Vial wird 30 s geschüttelt und anschließend zentrifugiert (9200 x g, 5 min). 1.0 mL des Überstandes wird in ein Braunglasvial überführt und bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird mit TBME (950 μ L) und 2,2,2-Trifluor-N-methyl-N-(trimethylsilyl)-acetamid (MSTFA, 50 μ L), das 10 % TSIM enthält, versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung kann zur GC/MS-Analyse des Sterolmusters verwendet werden

6.3.4.4 Identifizierung des inhibierten Enzyms

Zur Identifizierung des oder der inhibierten Enzyme wird das durch Vermessung im GC/MS-System erhaltene Chromatogramm auf charakteristische Markersterole hin analysiert. Diese können anhand ihrer relativen Retentionszeit und der spezifischen Qualifier-Ionen identifiziert werden. Durch den Nachweis eines oder mehrerer charakteristischer Markersterole können somit inhibierte Enzyme der Cholesterolbiosynthese abgeleitet werden. Die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgt durch den Vergleich der *Area under Curve* (AUCs, Integralflächen) für das jeweilige Sterol.

6.3.5 Aktivitätsbestimmung bezogen auf die Gesamtcholesterolbiosynthese

Prinzipiell kann auf zwei verschiedene Arten die Aktivität von Cholesterolbiosynthese-Inhibitoren auf die Gesamtcholesterolbiosynthese bestimmt werden. Zum einen kann für orientierende Versuche die Aktivität (%-Inhibition) einer Substanz im Triplikat bei einer fixen Konzentration (meist 1 μ M) gemessen werden, zum anderen kann der IC₅₀-Wert durch die Auswertung einer im Idealfall sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurve ermittelt werden. Ausgehend von der höchsten getesteten Konzentration werden in 1:1 Verdünnungsschritten sechs Substanzlösungen hergestellt. Alle Konzentrationen werden im Triplikat getestet, um eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu erhalten, aus der der auf die Neusynthese des

Cholesterols bezogene IC_{50} -Wert ermittelt werden kann. Bei diesen quantitativen Bestimmungen kann auf eine Positivkontrolle verzichtet werden, wenn zuvor qualitativ bestimmt wurde, welche Zwischenstufen der Sterolbiosynthese akkumulieren und so das inhibierte Enzym bestimmt wurde.

Die Herstellung der Substanzlösungen erfolgt wie in Abschnitt 6.3.4.1 beschrieben. Die Vorschrift zur Inkubation der Testsubstanzen aus Abschnitt 6.3.4.2 wird wie folgt abgewandelt: In einem 15 mL-Falcon Tube wird eine Lösung von Natrium-2- ^{13}C -Acetat (6.25 mg/mL) in bidestilliertem Wasser hergestellt. Diese Lösung wird unter sterilen Bedingungen in ein 15 mL-Falcon Tube filtriert (sterile 2- ^{13}C -Acetat-Lösung). Es werden 1 Million HL 60-Zellen ausplattiert und anschließend mit lipid- und cholesterolfreiem Medium auf ein Gesamtvolumen von 980 μL aufgefüllt. Vor der Inkubation unter den in 6.3.4.2 beschriebenen Bedingungen wird sterile 2- ^{13}C -Acetat-Lösung (10 μL) und die Lösung der Testsubstanz (10 μL) zupipettiert. Die GC/MS-Analytik sowie die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgt wie in Kapitel 6.3.4.4 beschrieben.

Das neu gebildete Cholesterol kann anhand der durch den Einbau von ^{13}C -markiertem Acetat resultierenden höheren Masse von dem bereits in der Zelle vorhandenen Matrixcholesterol unterschieden werden. Der C-27-Körper Cholesterol wird vollständig aus Acetateinheiten aufgebaut, so dass theoretisch maximal 13 2- ^{13}C -Acetat-Kohlenstoffatome in das Zielmolekül eingebaut werden könnten. Es können allerdings keine Cholesterol-Isotope mit höheren Massen als $[\text{M}+11]^+$ (469 m/z) detektiert werden. Für eine unbehandelte Kontrollprobe wird eine Inhibition von 0 % als Fixpunkt gesetzt und in Relation zu diesem wird für verschiedene getestete Substanzkonzentrationen die prozentuale Inhibition berechnet (Formel 3)

$$\% - \text{Inhibition} = \left[1 - \left(\frac{A_s \times A_{I.S.C.} \times PC_C}{A_C \times A_{I.S.S.} \times PC_S} \right) \right] \times 100$$

Formel 3: Formel zur Berechnung der prozentualen Inhibition; A_s : Fläche Probe, $A_{I.S.C.}$: I.S. Kontrolle, PC_C : Proteingehalt Kontrolle, A_C : Fläche Kontrolle, $A_{I.S.S.}$: Fläche I.S. Probe, PC_S : Proteingehalt Probe

Der zur Berechnung der prozentualen Inhibition benötigte Proteingehalt wird nach der Methode von Bradford bestimmt (Kapitel 6.3.6).

6.3.6 Proteinbestimmung nach *Bradford*

Bei jeder Proteinbestimmung nach *Bradford* ist eine Kalibriergerade mit Hilfe von bovinem Serumalbumin (BSA) zu erstellen. Jede Probe einer 24 Well-Testplatte (Zellkultur) wird der Proteinbestimmung im Triplikat unterzogen.

6.3.6.1 Erstellen der Kalibriergeraden

Aus einer BSA-Lösung (2 mg/mL) werden mit bidestilliertem Wasser zwei Stammlösungen hergestellt (S1:100 µg/mL, S2: 200 µg/mL). Die Standardlösungen werden in einem 500 µL-Plastiktube aus diesen Stammlösungen hergestellt. Die Tubes werden mit Hilfe eines Vortexers gemischt und es werden Triplikate von jeweils 50 µL in eine 96 Well-Testplatte pipettiert. Als Blindprobe wird bidestilliertes Wasser verwendet.

6.3.6.2 Vermessung der Probenlösung

Der nach Zelllyse erhaltene alkalische Zellextrakt wird auf Raumtemperatur abgekühlt und es werden je Probe drei 25 µL-Aliquots aus dem jeweiligen 2 mL-Plastiktube entnommen und ausplattiert (96 Well-Testplatte). Zu jedem Aliquot Testlösung wird zur Neutralisation verdünnte Salzsäure (1 M, 25 µL) gegeben. In jedes Well wird anschließend Farbreagenz (*Bradford*-Reagenz/Aqua bidest. 2:5.5, 200 µL) zugegeben. Nach 5 min erfolgt die UV-metrische Bestimmung am ELISA Reader durch Vermessung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm. Aus der Kalibriergerade kann die Proteinkonzentration in µg/mL errechnet werden mit Hilfe der Software des ELISA Readers (Methode: Bradford Assay).

7 ANHANG

7.1 Abkürzungverzeichnis

AAsn	<i>N</i> -Carbamoylmethyl-hydrazinomethansäure (<i>aza-asparagine</i> ¹¹⁹)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosyldiphophat
Ala	Alanin
Asn	Asparagin
ATP	Adenosyltriphophat
ber.	berechnet
⁷ BuLi	⁷ Butyllithium
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
Cbz	Benzoyloxycarbonyl-Schutzgruppe
CDCl ₃	Deuterochloroform
CI	Chemische Ionisation
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoësäure
Cys	Cystein
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	Dicyclohexylharnstoff (<i>Dicyclohexylurea</i>)
dd	Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DIAD	Di- <i>iso</i> -Propylazodicarboxylat
DMAP	4-Dimethylaminopyridin

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
DTT	Dithiothreitol
δ	chemische Verschiebung [ppm]
EI	Elektronenstoss-Ionisation
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Enz	Enzym
eq.	Äquivalente
Et	Ethyl
et al.	et alia (und andere)
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fd _{ox}	Ferredoxin (oxidiert)
Fd _{red}	Ferredoxin (reduziert)
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
gef.	gefunden
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
HEI	<i>High Energy Intermediate</i>
His	Histidin
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
Hz	Hertz (Sekunde ⁻¹)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IR	Infrarot-Spektroskopie

I.S.	Interner Standard
<i>J</i>	Kopplungkonstante [Hz]
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KOH	Kaliumhydroxid
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
Leu	Leucin
m	Multiplett
M	molar [mol/L]
Me	Methyl
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIC	Maleimidocaproyl
min	Minute
mL	Milliliter
M_r	relative Molekülmasse [g/mol]
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
m/z	Masse pro Ladungseinheit
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	mikromolar
NAD^+	Nicotinadenindinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinadenindinucleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinadenindinucleotidphosphat
NEt ₃	Triethylamin
nM	nanomolar
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl [cm^{-1}]
OSC	2,3-Oxidosqualencylase
p. a.	pro analysi
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
Ph	Phenyl

ppm	parts per million
Pro	Prolin
q	Quartett
RT	Raumtemperatur
rel. Int.	Relative Intensität
s	Singulett
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	^t Butyl-dimethylsilyl-Gruppe
<i>tert.</i>	tertiär
TH	totaler Hemmhof
THF	Tetrahydrofuran
TMEDA	Tetramethylethylendiamin
TMS	Tetramethylsilan
tt	Triplett vom Triplett
vgl.	vergleiche
WH	Wachstumshemmung
z. B.	zum Beispiel

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Verzweigung der Triterpenbiosynthesen durch die Cyclasen und Nummerierung von Sterolen nach IUPAC am Beispiel von Lanosterol	3
Abbildung 2	Übersicht der Sterolbiosynthese ausgehend von Lanosterol/Cycloartenol (vereinfacht)	5
Abbildung 3	Biosynthese der aktivierte Isopreneinheiten im Mevalonatweg	6
Abbildung 4	Biosynthese der aktivierte Isopreneinheiten im Methylerythritol-phosphatweg	7

Abbildung 5	Biosynthese von Squalen ausgehend von IPP und DMAPP	8
Abbildung 6	HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Auswahl), (<i>R</i>)-Mevalonat und (<i>R</i>)-Mevalonolacton	10
Abbildung 7	Fosmidomycin und Reduktion von DXP zu MEP	11
Abbildung 8	Biosynthese von Squalen zu 2,3-Oxidosqualen	11
Abbildung 9	OSC-katalysierte Reaktion von 2,3-Oxidosqualen zu Lanosterol: a : Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und Protonierung des Epoxids, b : Ringschluss Ring A, c : Ringschluss Ring B, d : Ringschluss Ring C, e : Ringerweiterung Ring C, f : Bildung Ring D, g Hydrid- und Methylgruppen-verschiebungen, Eliminierung des 9 β -Protons	12
Abbildung 10	Positionen der <i>High Energy Intermediates</i> , die im Verlauf der Zykлизierung von 2,3-Oxidosqualen zu Lanosterol durchlaufen werden	14
Abbildung 11	Prototypen lipidsenkender OSC-Inhibitoren	15
Abbildung 12	Cholesterolbiosynthese und alternativer Oxysterolbiosyntheseweg (vereinfacht) ausgehend von 2,3-Oxidosqualen	17
Abbildung 13	Inhibitoren der Squalenepoxidase (Auswahl)	18
Abbildung 14	Ergosterolbiosynthese ab Lanosterol (Überblick)	20
Abbildung 15	Postulierte Mechanismen der Reaktionen der Δ^{14} -Reduktase und der $\Delta^{8,7}$ -Isomerase	21
Abbildung 16	Duale Inhibitoren der Δ^{14} -Reduktase und der $\Delta^{8,7}$ -Isomerase (Auswahl)	22
Abbildung 17	Mechanismus der 14 α -Demethylierung (allgemein)	23
Abbildung 18	Inhibitoren der C-14-Demethylase (Auswahl)	24

Abbildung 19	Postsqualenabschnitt der Cholesterolsynthese (Überblick)	25
Abbildung 20	Inhibitoren des Postsqualenabschnitts der Cholesterolsynthese (Auswahl)	27
Abbildung 21	Mechanismus der irreversiblen Inhibition der Ornithin-Decarboxylase durch Eflornithin	30
Abbildung 22	Mechanismus der nicht-kovalenten, irreversiblen Inhibition	31
Abbildung 23	OSC-Inhibitoren (Auswahl; SL : <i>Lange</i> ⁶⁹ , MK : <i>Keller</i> ⁷⁰)	34
Abbildung 24	Synthese der α -Aminoketone bei <i>Lange</i> ⁶⁹ mit auftretenden Epimerisierungen, methylierter Grundkörper bei <i>König</i> ⁷² (MK-12), alternativer Grundkörper (3S,20S)-Pregn-7-en-3-ol	35
Abbildung 25	Humane OSC, Ro 48-8071 und Lanosterol ³⁹ ; a : Cokristall der humanen OSC mit Ro 48-8071, Darstellung als Ribbon-Diagramm mit membrangebundener Region, b : Cokristall der humanen OSC mit Lanosterol aus zwei verschiedenen Blickwinkeln, aktives Zentrum mit Hervorhebung von Cys233, Cys456 und Cys533	36
Abbildung 26	Potentiell irreversible Inhibitoren der OSC basierend auf Grundmanns Keton und (3S)-Pregn-7-en-3-ol (CM : <i>Mayer</i> ⁷⁵)	37
Abbildung 27	Prinzipien zur kovalenten Inhibition der OSC, Auswahl	38
Abbildung 28	Reaktivität von 5-Hydroxymethyl-1-propyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbaldehyd gegenüber Amin- und Thilderivaten ^{77, 78}	39
Abbildung 29	Mögliche Verknüpfungen eines Sterolgrundkörpers mit Hydroxymethylpyrrol-Bausteinen (Auswahl)	40
Abbildung 30	Seitenkettenamide (<i>Giera</i>) als Inhibitoren der Δ^{24} -Reduktase und der C-5-Desaturase ⁷⁴	40

Abbildung 31	Synthese von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-ylacetat (3) aus Ergosterol	42
Abbildung 32	Geplante Umsetzungen von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-ylacetat (3), Auswahl	43
Abbildung 33	Geplante Synthese der Disulfidderivate	44
Abbildung 34	Geplante Synthese einfacher Michael-Systeme	44
Abbildung 35	Geplante Synthese der Hydroxymethylpyrrolderivate	45
Abbildung 36	Geplante Synthese der Imidazol- und Triazolderivate	46
Abbildung 37	Geplante Synthese der Hydroxamsäurederivate	46
Abbildung 38	Synthese von (3S,20S)-20-Formylpregn-7-en-3-ylacetat (3)	47
Abbildung 39	Thiol-Disulfid-Austausch als Reaktionsprinzip zur Inhibition von Enzymen	49
Abbildung 40	Synthese der unsymmetrischen Disulfide 22 - 26	50
Abbildung 41	Synthese des unsymmetrischen Disulfids 32	51
Abbildung 42	Mechanismus der nativen chemischen Ligation ^{3,95}	52
Abbildung 43	Synthese von (3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-ylmethansäure (8)	52
Abbildung 44	Synthese von (3S,20S)-20-(Butylsulfanylcarbonylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (33) nach <i>Steglich</i>	53
Abbildung 45	Synthese von (3S,20S)-20-(Butylsulfanylcarbonylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (33) nach <i>Schotten-Baumann</i> (<i>Einhorn</i> -Variante) und der Thioester 33 - 35 nach <i>Tanabe</i> et al.	54
Abbildung 46	Nukleophile Öffnung eines Epoxids als Reaktionsprinzip zur Inhibition von Enzymen	55
Abbildung 47	<i>Corey-Chaykovsky</i> -Epoxidierung, Mechanismus und Anwendung	56

Abbildung 48	Synthese von (3S,20S)-20-Prop-1'-enylpregn-7-en-3-ylacetat (36)	57
Abbildung 49	<i>Prilezhaev</i> -Epoxidierung, Mechanismus und Anwendung	57
Abbildung 50	<i>Pinner</i> -Reaktion als Reaktionsprinzip zur Inhibition von Enzymen	58
Abbildung 51	Synthese von (3S,20S)-20-Cyanopregn-7-en-3-ylacetat (4) und Reaktions-mechanismus ⁸¹	59
Abbildung 52	Synthese von (3S,20S)-20-Cyanomethylpregn-7-en-3-ylacetat (38)	60
Abbildung 53	Ligation von Flourophoren an Proteine, MIC-Strategie (Beispiel) ¹¹⁶	61
Abbildung 54	Synthese der α,β -ungesättigten Ester 39 , 40 und 41	62
Abbildung 55	Entstehung von (3S,20S)-20-Formyloxymethylpregn-7-en-3-ylacetat (42)	63
Abbildung 56	Thioalkylierung eines Inhibitors aus der Gruppe der Aza-peptidyl- <i>Michael</i> -Akzeptoren (Beispiel) ^{117 63}	64
Abbildung 57	Fumarsäurederivate und Protonierung eines Amids	65
Abbildung 58	Synthese der Fumarsäurederivate 44 und 45	66
Abbildung 59	Synthese von (<i>E</i>)-(3S,20S)-20-(<i>N,N</i> -Dimethylamino-1,4-dioxobut-2-enylcarboxymethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (43)	67
Abbildung 60	Synthese von (<i>E</i>)-((3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl)-but-2-en-1-on (12) und Mechanismus der Reaktionsfolge	68
Abbildung 61	Versuch zur Synthese von ((3S,20S)-3-Acetoxy pregn-7-en-20-yl)-prop-2-en-1-on 13 nach <i>Grignard</i> 67	68
Abbildung 62	Synthese von (3S,20S)-20-(1-Oxoprop-2-en-1-yl)-pregn-7-en-3-ol (54)	69

Abbildung 63	Mögliche Verknüpfungen eines Sterolgrundkörpers mit Hydroxymethylpyrrol-Bausteinen (Auswahl)	70
Abbildung 64	Synthese von 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrol 16 ¹²⁶ und Versuch zur <i>N</i> -Alkylierung	71
Abbildung 65	Umsetzung von (3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-20-Brommethyl-pregn-7-en-3-ylacetat (7) mit Pyrrol-2-carbaldehyd	72
Abbildung 66	Darstellung von 61 und Versuche zur weiteren Umsetzung	73
Abbildung 67	Synthese von (3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-20-[1-(2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-pyrrolyl)-methyl]-pregn-7-en-3-ol (14)	73
Abbildung 68	Versuch zur Synthese eines Hydroxymethylpyrrols vom Typ B (vgl. Abbildung 64)	74
Abbildung 69	Synthese der 5-Alkyl-2-hydroxymethylheteroaromaten	75
Abbildung 70	Synthese alternativer Hydroxymethylheteroaromaten	78
Abbildung 71	Synthese von 5-(Dimethylhydrazonomethyl)-2-hydroxymethyl-pyrrol (76) und Mesomerie-Stabilisierung der Carbokationen	79
Abbildung 72	Synthese von Ergosteryl- <i>tert</i> -butyldimethylsilylether (77)	80
Abbildung 73	Synthese von (3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-20-Formylpregn-7-en-3-yl- <i>tert</i> -butyldimethylsilylether (51)	81
Abbildung 74	Synthese von (3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-20-Formylpregn-7-en-3-ol (79) und (3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-20-Formylpregn-7-en-3-yl- <i>tert</i> -butyldimethylsilylether (51)	82
Abbildung 75	Synthese von (3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-20-(1,2,4-Triazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ol (80)	84
Abbildung 76	Synthese von (3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-20-(Imidazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (20) und (3 <i>S</i> ,20 <i>S</i>)-20-(Imidazol-1-ylmethyl)-pregn-7-en-3-ol (81)	84

Abbildung 77	Versuche zur Synthese von (3S,20S)-20- (Imidazol-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (18) und postulierter Reaktionsmechanismus ¹²⁴	85
Abbildung 78	Synthese von (3S,20S)-20-(Imidazolin-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (82) und (3S,20S)-20-(2-Aminoethylcarbamoyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (83)	86
Abbildung 79	Darstellung von Imidazoliniumsalzen	87
Abbildung 80	Synthese von (3S,20S)-20-(Imidazol-2-yl)-pregn-7-en-3-ylacetat (18)	88
Abbildung 81	Synthese von (3S,20S)-20-(Hydroxycarbamoyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (21) und den O-alkylierten Derivaten 84 und 85	89
Abbildung 82	Strukturen der geplanten potentiellen Δ^{24} -Reduktase-Inhibitoren	91
Abbildung 83	Synthese der Ester 87 und 88	92
Abbildung 84	Synthese der Ester 89 und 90	93
Abbildung 85	Synthese der sekundären Amide des Verbindungstyps C	93
Abbildung 86	Synthese der tertiären Amide des Verbindungstyps C	94
Abbildung 87	Postulierter Reaktionsmechanismus der Δ^{24} -Reduktase ²⁴	94
Abbildung 88	Synthese der Glycinester 96 und 97	95
Abbildung 89	Synthese des Seitenkettenamids 98 und Entstehung von (3S,20S)-20-Diemethylcarbamoylmethylpregn-7-en-3-ylacetat (99)	96
Abbildung 90	Synthese von (3S,20S)-20-(1-Hydrazonomethyl)-pregn-7-en-3-ylacetat (100)	97
Abbildung 91	Strukturformeln der Referenzsubstanzen Tetracyclin-Hydrochlorid und Clotrimazol	100

Abbildung 92	Im Agar-Diffusionstest antimikrobiell aktive Verbindungen 81, 82 und 83	103
Abbildung 93	Reduktion von MTT zu einem blauen Formazan	104
Abbildung 94	Ausschnitt des GC/MS-Chromatogramms (selected ions: 357, 217, 203, 378, 363, 337, 456, 441, 351) nach Inkubation mit 81 (8 μ g) und Ausschnitt aus der Ergosterolbiosynthese	110
Abbildung 95	Ausschnitt des GC/MS-Chromatogramms (selected ions: 69, 80, 95, 458, 368, 329, 378, 363, 337) nach Inkubation mit 34 (8 μ g) und Ausschnitt aus der Ergosterolbiosynthese	114
Abbildung 96	Strukturformeln von Trifluoperazin und W-7	114
Abbildung 97	Ausschnitt des GC/MS-Chromatogramms (selected ions: 357, 217, 203, 458, 368, 329, 456, 253, 129) nach Inkubation mit 42 (1 μ M) und Ausschnitt aus der Cholesterolbiosynthese	116
Abbildung 98	Testergebnisse der Aktivitätsbestimmung ausgewählter Inhibitoren	120
Abbildung 99	Reaktivität von Thiolgruppen (Auswahl)	123
Abbildung 100	Synthese der unsymmetrischen Disulfide 22 - 26	124
Abbildung 101	Synthese des unsymmetrischen Disulfids 32	125
Abbildung 102	Synthese der Thioester 33 - 35	124
Abbildung 103	Synthese der Epoxide 5 und 37b	126
Abbildung 104	Synthese der Nitrile 4 und 38	126
Abbildung 105	Synthese α,β -ungesättigten Ester 39 - 41	127
Abbildung 106	Synthese der Fumarsäurederivate 44 und 45	127
Abbildung 107	Synthese des Fumarsäurederivats 43	128
Abbildung 108	Synthese der α,β -ungesättigten Ketone 12 und 54	128

Abbildung 109	Synthese der TBDMS-geschützten Sterolderivate 77, 78 und 51	129
Abbildung 110	Synthese des <i>N</i> -alkylierten Hydroxymethylpyrrols 14	130
Abbildung 111	Versuche zur Synthese des Pyrrolderivats 15	130
Abbildung 112	Synthese alternativer strukturverwandter 5-gliedriger Heteroaromaten	131
Abbildung 113	Synthese der <i>N</i> -alkylierten Imidazole 20 und 81 sowie der 1-alkylierten 1,2,4-Triazole 19 und 80	131
Abbildung 114	Synthese des 2-alkylierten Imidazols 18 und des Amids 83	132
Abbildung 115	Synthese der Hydroxamate 21, 84 und 85	132
Abbildung 116	Synthese der Ester 86, 87 und 95	133
Abbildung 117	Synthese der Amide 98 und 99 sowie der Ester 89 und 90	133
Abbildung 118	Synthese der Amide 91 - 95	134
Abbildung 119	Selektive Inhibitoren der humanen Δ^{24} -Reduktase (Auswahl)	136
Abbildung 120	Übliche Nummerierung von Sterolen nach IUPAC am Beispiel von Ergosterol und Pregnan	140

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Therapeutisch eingesetzte kovalent bindende und irreversible Inhibitoren ^{64,65}	29
Tabelle 2	Reaktionsbedingungen zur Synthese des Nitrils 4 aus dem Aldehyd 3	59
Tabelle 3	Verwendete Modellkeime im Agar-Diffusionstest	99
Tabelle 4	Testergebnisse des Agar-Diffusionstests	102
Tabelle 5	Testergebnisse des MTT-Tests	106

Tabelle 6	Testergebnisse des Ergosterolbiosynthese-Assays	109
Tabelle 7	Testergebnisse des Cholesterolbiosynthese-Assays	115

7.4 Formelverzeichnis

Formel 1	Formel zur Berechnung der KBE/mL der Stammkultur; KBE/mL _{Stamm} : Koloniebildende Einheiten pro mL Stammkultur, A _{ZLsg} : Absorption der Pilzzelllösung, A _{McFarland} : Absorption des 0.5-molaren McFarland Standards	254
Formel 2	Berechnung des 100.000 KBE entsprechenden Volumens; V: Volumen einer 1:100 Verdünnung der Stammkultur in µL entsprechend 100.000 KBE, KBE/mL _{Stamm} : Koloniebildende Einheiten pro mL Stammkultur	255
Formel 3	Formel zur Berechnung der prozentualen Inhibition; As: Fläche Probe, A _{I.S.C} : I.S. Kontrolle, PC _C : Proteingehalt Kontrolle, A _C : Fläche Kontrolle, A _{I.S.S} : Fläche I.S. Probe, PC _S : Proteingehalt Probe	259

7.5 Literaturverzeichnis

¹ J.K. Volkman, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, *60*, 495.

² R.J. Rodriguez, C. Low, C.D.K. Bottema, L. Parks, *Biochim. Biophys. Acta, Lipid Lipid Met.*, **1985**, *837*, 336.

³ W. Koeller (Editor), *Target Sites of Fungicide Action*, **1992**, CRC Press, Boca Raton.

⁴ H. Dixon, C.D. Ginger, J. Williamson, *Comp. Biochem. Phys. B*, **1972**, *41*, 1.

⁵ M. Marino, P. Galluzzo, P. Ascenzi, *Curr. Genomics*, **2006**, *7*, 497.

⁶ J. Hu, Z. Zhang, W.-J. Shen, S. Azhar, *Nutr. Metab.*, **2010**, *7*, 47.

⁷ G.J. Bishop, T. Yokota, *Plant Cell Physiol.*, **2001**, *42*, 114.

⁸ A. Bajguz, A. Tretyn, *Phytochemistry*, **2003**, *62*, 1027.

⁹ T.-W. Kim, J.-Y. Hwang, Y.-S. Kim, S.-H. Joo, S.C. Chang, J.S. Lee, S. Takatsuto, S.-K. Kim, *Plant Cell*, **2005**, *17*, 2397.

¹⁰ P. Benveniste, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2004**, *55* 429

¹¹ R.M. Riehl, D.O. Toft, *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 15324.

¹² R.J. Rodriguez, C. Low, C.D.K. Bottema, L.W. Parks, *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, *837*, 336.

¹³ M. Žakelj-Mavrič, T. Kastelic-Suhadolc, A. Plemenitaš, T.L. Rižner, I. Belič, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1995**, *112B*, 637.

¹⁴ H.R. Waterham, R.J.A. Wanders, *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1529*, 340

¹⁵ G.E. Herman, *Hum. Mol. Genet.*, **2003**, *12*, R75.

¹⁶ G. Löffler, P.E. Petrides, P.C. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*, **2007**, *8*. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

¹⁷ D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*, **2002**, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

¹⁸ R. Klingensteiner, S. Löber, P. Kujala, S. Godsave, S.R. Leliveld, P. Gmeiner, P.J. Peters, C. Roth, *J. Neurochem.*, **2006**, *98*, 748.

¹⁹ T.A. Spencer, *Acc. Chem. Res.*, **1994**, *27*, 83.

²⁰ C.T. Walsh, M.A. Fischbach, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 5700.

²¹ C.I. Lui, G.Y. Lui, Y. Song, F. Yin, M.E. Hensler, W.Y. Jeng, V. Nizet, A.H.J. Wang, E. Oldfield, *Science*, **2008**, *319*, 1391.

²² J.C. Hinshaw, D.Y. Suh, P. Garnier, F.S. Bruckner, R.T. Eastman, S.P.T. Matsuda, B.M. Joubert, I. Coppens, K.A. Joiner, S. Merali, T.E. Nash, G.D. Prestwich, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 4240.

²³ G.D. Brown, *Nat. Prod. Rep.*, **1998**, *15*, 653.

²⁴ E.I. Mercer, *Prog. Lipid Res.*, **1993**, 32, 357.

²⁵ M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, 16, 565.

²⁶ J.L. Goldstein, M.S. Brown, *Annu. Rev. Biochem.*, **1977**, 46, 897.

²⁷ E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, **2001**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

²⁸ H. Jomaa, J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Türbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H.K. Lichtenthaler, D. Soldati, E. Beck, *Science*, **1999**, 285, 1573.

²⁹ N.S. Ryder, M.-C. Dupont, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 794, 466.

³⁰ S. Ryder, M.-C. Dupont, *Biochem. J.*, **1985**, 230, 765.

³¹ A. Lenhard, D. Reinert, J.D. Aebi, H. Dehmlow, O.H. Mohrand, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 2083.

³² T. Gasch, M. Stahl, *J. Comput. Chem.*, **2003**, 24, 741.

³³ S. Boss, T. Schulz-Gasch, S. Taramino, *Biochem. Soc. Trans.*, **2005**, 33, 1202.

³⁴ K.U. Wendt, G.E. Schulz, *Angew. Chem.*, **2000**, 39, 2930.

³⁵ I. Abe, M. Rohmer, *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 2189.

³⁶ E.J. Corey, S.C. Virgil, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 11819.

³⁷ E.J. Corey, S.C. Virgil, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 8171.

³⁸ B. Robustell, I. Abe, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 957.

³⁹ R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D'Arcy, *Nature*, **2004**, 432, 118.

⁴⁰ E.J. Corey, H. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 1277.

⁴¹ E.J. Corey, H. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 1289.

⁴² R. Grandour, *Bioorg. Chem.*, **1981**, 10, 169.

⁴³ C. Jensen, W.L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 10846.

⁴⁴ D. Gao, Y.-K. Pan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4045.

⁴⁵ J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, **2001**, Oxford University Press Inc., New York.

⁴⁶ K.U. Wendt, A. Lenhard, G.E. Schulz, *J. Mol. Biol.*, **1999**, *286*, 175.

⁴⁷ G.R. Brown, D.M. Hollinshead, E.S.E. Stokes, D. Waterson, D.S. Clarke, A.J. Foubister, S.C. Glossop, F. McTaggart, D.J. Mirrlees, G.J. Smith, R. Wood, *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 4964.

⁴⁸ M. Taton, P. Benveniste, A. Rahier, *Pure & Appl. Chem.*, **1987**, *59*, 287

⁴⁹ H. Dehmlow, J.D. Aebi, S. Jolidon, Y.-H. Ji, E.M. von der Mark, J. Himber, O.H. Morand, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 3354.

⁵⁰ M.W. Huff, D.E. Telford, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2005**, *26*, 335.

⁵¹ M. Horie, Y. Tsuchiya, M. Hayashi, M. Iida, Y. Iwasawa, Y. Nagata, Y. Sawasaki, H. Fukuzumi, K. Kitani, T. Kamei, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 18075.

⁵² N.S. Ryder, *Biochem. Soc. Trans.*, **1990**, *18*, 45.

⁵³ M. Nowosielski, M. Hoffmann, L.S. Wyrwicz, P. Stepiak, D.M. Plewczynski, M. Lazniewski, K. Ginalski, L. Rychlewsky, *J. Chem. Inf. Model.*, **2011**, *51*, 455.

⁵⁴ C. Marcireau, M. Guilloton, F. Karst, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, *34*, 989.

⁵⁵ P. M. Burton, D.C. Swinne, R. Heller, B. Dunlap, M. Chiou, E. Malonzo, J. Haller, K.A.M. Walker, G. Mendizabal, L. Tokes, *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, *50*, 529.

⁵⁶ C. Fernandez, M. Martin, D. Gomez-Coronado, M.A. Lasuncion, *J. Lipid Res.*, **2005**, *46*, 920.

⁵⁷ F.F. Moebius, R.J. Reiter, K. Bermoser, H. Glossmann, S.Y. Cho, Y.K. Paik, *Mol. Pharm.*, **1998**, *54*, 591.

⁵⁸ J.H. Kim, T.N. Jhong, Y.K. Paik, J.S. Park, E.D. Kim, Y.S. Lee, S.U. Kim, *US-Patent US 6,239,139 B1*, **2001**.

⁵⁹ B. Lindenthal, T. Bertsch, K. Fassbender, M. Stroick, S. Kühl, D. Lütjohann, K. von Bergmann, *Metabolism*, **2002**, *51*, 4920.

⁶⁰ L. Ernster, G. Dallner, *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, *1271*, 195.

⁶¹ S. Bellosta, R. Paoletti, A. Corsini, *Circulations*, **2004**, *109*, III50.

⁶² R.J. Cenedella, J.R. Kuszak, K.J. Al-Ghoul, S. Qin, P.S. Sexton, *J. Lipid Res.*, **2003**, *44*, 198.

⁶³ R.G. Schlenger, W.E. Haefeli, H. Jick, C. Meier, *Arch. Intern. Med.*, **2001**, *161*, 2021.

⁶⁴ M.H. Potashman, M.E. Duggan, *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 1231.

⁶⁵ B.W. Metcalf, P. Bey, C. Danzin, M.J. Jung, P. Casara, J.P. Vevert, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 2551.

⁶⁶ S.R. Stone, J.F. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, *869*, 275.

⁶⁷ F.M. Pick, M.A. McGartoll, R.C. Bray, *Eur. J. Biochem.*, **1971**, *18*, 65.

⁶⁸ J. E. Reardon, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 19039.

⁶⁹ S. Lange, *Dissertation*, **2006**, Ludwig-Maximilians-Universität München.

⁷⁰ M. Keller, *Dissertation*, **2010**, Ludwig-Maximilians-Universität München.

⁷¹ C. Hantelmann, *Dissertation*, **2005**, Ludwig-Maximilians-Universität München.

⁷² M. König, *Dissertation*, **2011**, Ludwig-Maximilians-Universität München.

⁷³ D. Renard, *Dissertation*, **2006**, Ludwig-Maximilians-Universität München.

⁷⁴ M. Giera, *Dissertation*, **2007**, Ludwig-Maximilians-Universität München.

⁷⁵ C.D. Mayer, *Dissertation*, **2009**, Ludwig-Maximilians-Universität München.

⁷⁶ S. Hemmers, *Master Thesis*, **2007**, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

⁷⁷ E. Klein, F. Ledl, W. Bergmüller, T. Severin, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, **1992**, *194*, 556.

⁷⁸ J. Nissl, M. Pischetsrieder, E. Klein, T. Severin, *Carbohydr. Res.*, **1995**, *270*, C1.

⁷⁹ D.C. Lamb, S. Maspahy, D.E. Kelly, N.J. Manning, A. Geber, J.E. Bennett, S.L. Kelly, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, *43*, 1725.

⁸⁰ D.C. Drummond, C.O. Noble, D.B. Kirpotin, Z. Guo, G.K. Scott, C.C. Benz, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2005**, *45*, 495.

⁸¹ M.J. Janusz, E.B. Hooktin, K.K Brown, L.C. Hsieh, S.A. Heitmeyer, Y.O. Taiwo, M.G. Natchus, S. Pikul, N.G. Almstead, B. De, S.X. Peng, T.R. Baker, V. Patel, *Inflamm. Res.*, **2006**, *55*, 60.

⁸² M. Giera, D. Renard, F. Plößl, F. Bracher, *Steroids*, **2008**, *73*, 299.

⁸³ D. Renard, J. Perruchon, M. Giera, J. Müller, F. Bracher, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 8123.

⁸⁴ K. Asano, S. Matsubara, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 1757.

⁸⁵ Z. Rezaei, S. Khabnadideh, K. Pakshir, Z. Hossaini, F. Amiri, E. Assadpour, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 3064.

⁸⁶ M. Zhong, I. Nowak, J.F. Cannon, M.J. Robins, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 4216.

⁸⁷ P. Sancibrao, D. Karila, C. Kouklovsky, G. Vincent, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 4333.

⁸⁸ A.S. Singha, B.N. Misra, *Indian J. Chem. B*, **1985**, *24B*, 1065.

⁸⁹ G. Wolf, *J. Nutr.*, **2004**, *134*, 1299.

⁹⁰ W. Tadros, A.L. Boulos, *Helv. Chim. Acta*, **1975**, *85*, 668.

⁹¹ H.J.E. Loewenthal, *Tetrahedron*, **1959**, *6*, 269.

⁹² R. Mozingo, *Org. Synth.*, **1941**, *21*, 15.

⁹³ K. Sakai, K. Tsuda, *Chem. Pharm. Bull.*, **1963**, *11*, 529.

⁹⁴ D.H.R. Barton, P.J. Davies, U.M. Kempe, J.F. McGarrity, D.A. Widdowson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1972**, 1231.

⁹⁵ J.P. Moureau, D.J. Aberhart, E. Caspi, *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 2018.

⁹⁶ H.F. Gilbert, *Adv. Enzymol.*, **1990**, *63*, 69.

⁹⁷ H.F. Gilbert, *Method. Enzymol.*, **1995**, *251*, 8.

⁹⁸ E. Brzezinska, A.L. Ternay Jr., *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 8239.

⁹⁹ D. Macmillan, J. Blanc, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 7668.

¹⁰⁰ T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H.U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.*, **1953**, *583*, 129.

¹⁰¹ P.E. Dawson, T.W. Muir, I. Clark-Lewis, S.B.H. Kent, *Science*, **1994**, *266*, 776.

¹⁰² B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1978**, 17, 522.

¹⁰³ K. Schwetlick et al., *Organikum*, 18., berichtigte Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften, **1976**, Berlin.

¹⁰⁴ P. Witte, *Dissertation*, **2008**, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

¹⁰⁵ H. Nakatsuji, M. Marimoto, T. Misaki, Y. Tanabe, *Tetrahedron*, **2007**, 63, 12071.

¹⁰⁶ K. Wakasugi, A. Iida, T. Misaki, Y. Nishii, Y. Tanabe, *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, 345, 1209.

¹⁰⁷ H. Itazaki, K. Nagashima, K. Sugita, H. Yoshida, Y. Kawamura, Y. Yasuda, K. Matsumoto, K. Ishii, N. Uotani, H. Nakai, A. Terui, S. Yoshimatsu, Y. Ikenishi, Y. Nakagawa, *J. Antibiot.*, **1990**, 43, 1524.

¹⁰⁸ M. Hanada, K. Sugawara, K. Kaneta, S. Toda, Y. Nishiyama, K. Tomita, H. Yamamoto, M. Konishi, T. Oki, *J. Antibiotics*, **1992**, 45, 1746.

¹⁰⁹ M.C. McCowen, M.E. Callender, J.F. Lawlis Jr., *Science*, **1951**, 113, 202

¹¹⁰ A.S. Veleiro, J.C. Oberti, G. Burton, *Stud. Nat. Prod. Chem.*, **2005**, 32, 1019.

¹¹¹ B.J. Albert, K. Koide, *ChemBioChem*, **2007**, 8, 1912.

¹¹² V. Grazú, O. Abian, C. Mateo, F. Batista-Viera, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 1495.

¹¹³ J. Streith, C. Fizet, H. Fritz, *Helv. Chim. Acta*, **1976**, 59, 2786.

¹¹⁴ G.H. Olah, T. Keumi, *Synthesis*, **1979**, 112.

¹¹⁵ G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, **1996**, San Diego.

¹¹⁶ C.P.R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.*, **2008**, 120, 10182.

¹¹⁷ M. Völkert, K. Uwai, A. Tebbe, B. Popkirova, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 12749.

¹¹⁸ T.N. Cayzer, M.N. Paddon-Row, D. Moran, A.D. Payne, M.S. Sherburn, P. Turner, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 5561.

¹¹⁹ M.G. Götz, K.E. James, E. Hansell, J. Dvořák, A. Seshaadri, D. Sojka, P. Kopáček, J.H. McKerrow, C.R. Caffrey, J.C. Powers, *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 2816.

¹²⁰ R.J. Gillespie, T. Birchall, *Can. J. Chem.*, **1963**, 41, 148.

¹²¹ A. Bagno, B. Bujnicki, S. Bertrand, C. Comuzzi, F. Dorigo, P. Janvier, G. Scorrano, *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 523.

¹²² S. Kim, C.H. Oh, J.S. Ko, K.H. Ahn, Y.J. Kim, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 1927.

¹²³ J.D. Albright, *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 1977.

¹²⁴ J.D. Albright, L. Goldman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 2416.

¹²⁵ Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, **2009**, Wiley-Interscience.

¹²⁶ L.A. Paquette, A.M. Doherty, C.M. Rayner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 109, 3910.

¹²⁷ K. Olsson, P.-A. Pernemalm, *Acta Chem. Scand. B*, **1979**, 33, 125.

¹²⁸ R. Miller, K. Olsson, *Acta Chem. Scand. B*, **1985**, 39, 717.

¹²⁹ S. Rocchiccioli, G. Guazzelli, R. Lazzaroni, R. Settambolo, *J. Heterocyclic Chem.*, **2007**, 44, 479.

¹³⁰ B.K. Nabbs, A.D. Abell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 505.

¹³¹ F. Denat, H. Gaspard-lloughmane, J. Dubac, *J. Organomet. Chem.*, **1992**, 423, 173.

¹³² B.C. Ranu, R. Chakraborty, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 7663.

¹³³ D.L. Comins, M.O. Killpack, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 104.

¹³⁴ F. Denat, H. Gaspard-lloughmane, J. Dubac, *Synthesis*, **1992**, 954.

¹³⁵ H. Mukaiyama, T. Nishimura, S. Kobayashi, T. Ozawa, N. Kamada, Y. Komatsu, S. Kikuchi, H. Oonota, H. Kusama, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 868.

¹³⁶ B. Jousseaume, H. Kwon, J.-B. Verlhac, F. Denat, J. Dubac, *Synlett*, **1993**, 117.

¹³⁷ E.J. Corey, M. Chaykovsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1640.

¹³⁸ E.J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 6190.

¹³⁹ P.J. Kocienski, *Protecting Groups: Thieme foundations of organic chemistry series*, **1994**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

¹⁴⁰ E.J. Corey, G.B. Jones, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 1028.

¹⁴¹ N. Matsumori, K. Tahara, H. Yamamoto, A. Morooka, M. Doi, T. Oishi, M. Murata, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 11855.

¹⁴² T. Ikawa, K. Hattori, H. Sajiki, K. Hirota, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 6901.

¹⁴³ F.R. Wuest, M. Berndt, *J. Labelled Compd. Rad.*, **2006**, *49*, 91.

¹⁴⁴ M.C. Pirrung, N.J.G. Webste, *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 3603.

¹⁴⁵ Z. Rezaei, S. Khabnadideh, K. Pakshir, Z. Hossaini, F. Amiri, E. Assadpour, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 3064.

¹⁴⁶ K. Asano, S. Matsubara, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 1757.

¹⁴⁷ B. Radziszewski, *Ber. dtsch. chem. Gesell.*, **1882**, *15*, 1493.

¹⁴⁸ J. Zhang, Y. Zhang, W.F.K. Schnatter, J.W. Herndon, *Organometallics*, **2006**, *25*, 1279.

¹⁴⁹ M. Ishihara, H. Togo, *Synlett*, **2006**, 227.

¹⁵⁰ S. Sharma, S. Gangal, A. Rauf, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 1751.

¹⁵¹ H. Fujioka, K. Murai, Y. Ohba, A. Hiramatsu, Y. Kita, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 2197.

¹⁵² P. Gogoi, D. Konwar, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 79.

¹⁵³ M. Ishihara, H. Togo, *Synthesis*, **2007**, 1939.

¹⁵⁴ S. Clemens, R. Teissier, *Institut National de la Propriété Industrielle FR 2 625 497 - A1*, **1987**.

¹⁵⁵ M. Abdollahi-Alibeik, I. Mohammadpoor-Baltork, M.A. Zolfigol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 6079.

¹⁵⁶ P. Sancibrao, D. Karila, C. Kouklovsky, G. Vincent, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 4333.

¹⁵⁷ A.S. Singha, B.N. Misra, *Indian J. Chem. B*, **1985**, *24*, 1065.

¹⁵⁸ D.R. FitzPatrick, J.W. Keeling, M.J. Evans, A.E. Kan, J.E. Bell, M.E.M. Porteous, K. Mills, R.M. Winter, P.T. Clayton, *Am. J. Med. Genet.*, **1998**, *75*, 145.

¹⁵⁹ R. Lämsä, S. Helisalmi, M. Hiltunen, S.-K. Herukka, T. Tapiola, T. Pirtilä, S. Vepsäläinen, H. Soininen, *Am. J. Med. Genet. B*, **2007**, *144B*, 906.

¹⁶⁰ M.-C. Battista, M.O. Guimond, C. Roberge, A.A. Doueik, L. Fazli, M. Gelave, R. Sabbagh, N. Gallo-Payet, *Prostate*, **2010**, 70, 921.

¹⁶¹ T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55.

¹⁶² M.V. Berridge, A.S. Tan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1993**, 303, 474.

¹⁶³ J. Müller, *Dissertation*, **2002**, Ludwig-Maximilians-Universität München.

¹⁶⁴ M. Giera, F. Plößl, F. Bracher, *Steroids*, **2007**, 72, 633.

¹⁶⁵ I. Filipovic, E. Buddecke, *Lipids*, **1987**, 22, 261.

¹⁶⁶ W. Lee, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, 339, 95.

¹⁶⁷ B. Lindenthal, T.A. Aldaghlas, A. Holleran, T. Sudhop, H.K. Berthold, K. von Bergmann, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2002**, 282, 1222.

¹⁶⁸ S.J. Compton, C.G. Jones, *Anal. Biochem.* **1985**, 151, 369.

¹⁶⁹ H.G.O. Becker, W. Berger, G. Domsche, *Organikum*, **1996**, 20. Ausgabe, Wiley-VCH, Weinheim.

¹⁷⁰ H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 7512.

¹⁷¹ D. MacLean, W.S. Strachan, F.S. Spring, *Chem. Ind. - London*, 1953, 1259.

¹⁷² I.A. Korshunov, Y.V. Vodzinskii, N.S. Vyazankin, I.A. Kalinin, *Zh. Obshch. Khim.*, **1959**, 29, 1364.

¹⁷³ J.H. Tsai, A.S. Waldman, J.S. Nowick, *Bioorg. MEd. Chem.*, **1999**, 7, 29.

¹⁷⁴ I.A. Korshunov, Y.V. Vodzinskii, N.S. Vyazankin, I.A. Kalinin, *Zh. Obshch. Khim.*, **1959**, 29, 1364.

¹⁷⁵ S.F. Martin, G.J. Pacofsky, R.P. Gist, W.C. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 7634.; J Cabares, L. Mavoungou-Gomes, *Bull. Soc. Chim. France*, **1986**, 401.; D.J. Ager, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 5441.; T. Masamune, M. Ono, H. Matsue, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1975**, 48, 491.

¹⁷⁶ Z. Zhang, L. Zhang, X. Guan, Z. Shen, X. Chen, G. Xing, X. Fan, Q. Zhou, *Liq. Cryst.*, **2010**, 37, 69.; C. Zheng, S. Pu, J. Xu, M. Luo, D. Huang, L. Shena, *Tetrahedron*, **2007**, 63, 5437.

¹⁷⁷ B. Martín-Matute, C. Nevado, D.J. Cárdenas, A.M. Echavarren, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 5757.; L.M. Pevzner, V.M. Ignat'ev, I.M. Golubkov, *Zh. Org. Khim.*, **1989**, *25*, 843.

¹⁷⁸ M. D'Auria, F. Volpe, *Gazz. Chim. Ital.*, **1993**, *123*, 527.

¹⁷⁹ G. Wang, L.T. Phan, Y.S. Or, Y.-L. Qiu, D. Niu, Y. Peng, M. Busuyek, Y. Wang, S. Nakajima, *PCT Int. Appl.*, WO 2006119313, **2006**.

¹⁸⁰ K.W. Hering, J.D. Artz, W.H. Pearson, M.A. Marletta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 618.

¹⁸¹ S.-M. Yang, J.-M. Fang, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 394.

¹⁸² H.R. Piao, Z.S. Quan, K. Nakayama, A. Tanaka, *Chinese Chem. Lett.*, **1999**, *10*, 11.

¹⁸³ M. Janda, F. Dvorak, *Collect. Czech. Chem. Comm.*, **1962**, *27*, 372.

¹⁸⁴ W. Baltes, L. Mevissen, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1988**, *187*, 209.