

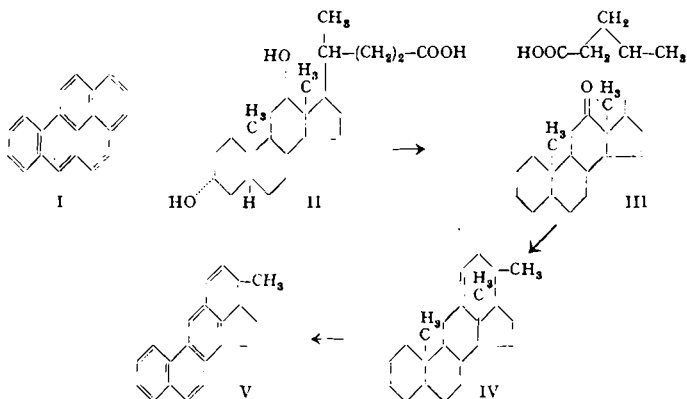
## Aromatisierungsreaktionen in der Gallensäure-Reihe und ihre möglichen Beziehungen zum Krebsproblem

Von Prof. Dr. H. H. INHOFFEN, Braunschweig, Organisch-Chemisches Institut der TH. Braunschweig

Können aus Steroiden im Verlauf eines anomalen Zell-Stoffwechsels Methyl-cholanthren bzw. Abkömmlinge desselben als Krebsursache entstehen? Es wird eine diesbezügliche, spezielle Reaktionsfolge unter Darlegung der möglichen Zwischenstufen entwickelt.

### Einleitung

Seit Cook, Hewett und Hieger<sup>1)</sup> entdeckten, daß die krebs-erzeugende Wirksamkeit des Steinkohlenteers im wesentlichen auf das hierin enthaltene 3,4-Benzpyren (I) zurückzuführen sei, sind zahllose höhermolekulare Benzolkohlenwasserstoffe im Tierversuch auf Carcinogenese geprüft worden. Unter den untersuchten Verbindungen befand sich auch das Methyl-cholanthren (V), das von Wieland und Dane<sup>2)</sup> schon vor längerer Zeit aus Desoxycholsäure (II) über 12-Keto-cholansäure (III) und Dehydro-norcholen (IV) dargestellt worden war.



Das Methyl-cholanthren hat sich in der Folgezeit im Tierversuch als eine der am stärksten krebs-erregenden Verbindungen erwiesen, die bisher bekannt geworden sind. Da es sich von einem Steroid, nämlich der Desoxy-cholsäure, chemisch ableitet, ist man zu der Vorstellung gekommen, daß auch in der Zelle im Verlauf eines anomalen Stoffwechsels Methyl-cholanthren entstehen und dies die Ursache einer Bildung maligner Geschwulste sein könne<sup>3)</sup>. Überzeugende experimentelle Beweise konnten jedoch nach dieser Richtung bislang nicht beigebracht werden.

### Problemstellung und theoretische Erwägungen

Seit längerer Zeit schon (1942) habe ich mich mit der Frage befaßt, auf welche Weise die in Frage stehende Hypothese geprüft werden könne. Da bislang alle Versuche gescheitert sind, das Problem von der physiologisch-chemischen Seite her zu fördern, z. B. durch Isolierung definierter krebs-erregender Stoffwechselprodukte aus Tumorgewebe resp. aus anderen physiologischen Materialien carcinomkranker Organismen, erschien es angebracht, das Problem von der rein chemischen Seite her anzufassen.

Hierfür schien es vor allem zweckmäßig, Zwischenreaktionen bzw. Zwischenprodukte bei chemischen Übergängen von Steroiden in cholanthren-ähnliche Verbindungen in möglichst großer Zahl aufzusuchen, um die dargestellten Verbindungen auf krebs-erregende Wirksamkeit zu prüfen. Je eher auf diesem

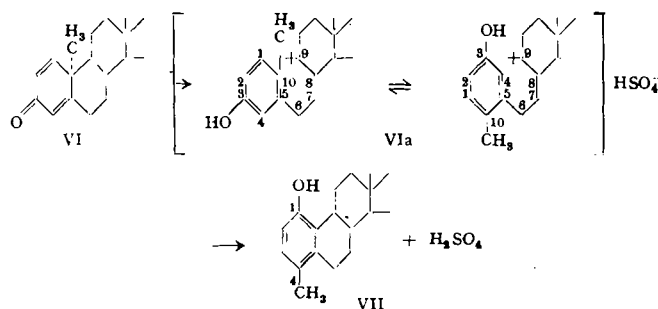
Wege vom Steroid zum Cholanthren-Derivat ein carcinogenes Produkt angetroffen würde, und je zweifelsfreier die hierbei zu bewerkstellenden Umwandlungen als zellmöglich anzusprechen wären, desto mehr würde die Hypothese an Gewicht gewinnen bzw. umgekehrt.

Inwieweit die bisherigen und künftigen Reaktionen als „zell-möglich“ angesprochen werden dürfen, soll zunächst dahingestellt bleiben.

Beim eventuellen Übergang eines Steroids in eine voll-aromatische Verbindung in der Zelle ist es vor allem schwierig, sich die Eliminierung der beiden quartären, sehr fest haftenden Methyl-Seitenketten vorzustellen, deren biochemische Angreifbarkeit nicht ohne weiteres gegeben erscheint<sup>4)</sup>.

In den letzten 15 Jahren wurden nun Steroid-Reaktionen bekannt, bei denen das anguläre Methyl am C<sub>10</sub> des Vierring-Systems sich relativ leicht und glatt von seinem Platz entfernen läßt, um damit eine Aromatisierung des Ringes A möglich zu machen.

Hier ist vornehmlich eine Reaktion interessant, die bei speziellen Steroid-Abkömmlingen angetroffen wird<sup>5)</sup>. Bei ihr werden im Ring A zweifach ungesättigte 3-Keto-steroid (VI) zu Phenolen der Struktur VII umgelagert. Die Reaktion tritt unter der Einwirkung von konz. Schwefelsäure und Essigsäure-anhydrid ein:



Der Mechanismus dieser Säure-Umlagerung konnte erst im letzten Jahr von Woodward und Singh<sup>6)</sup> in einer ausgezeichneten Untersuchung endgültig aufgeklärt werden. Woodward formuliert die Reaktion als Wagner-Meerwein-Umlagerung und läßt sie über die labile Zwischenstufe entweder eines Spirans oder des Kations VIa verlaufen. Von diesen beiden Möglichkeiten sei die letztere als bevorzugt wiedergegeben. Unter Sprengung der Bindung 9–10 und nach Drehung des Ringes A kommt es zur Ausbildung einer neuen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zwischen den C-Atomen 4 und 9. Das Hydroxyl gerät damit an den oberen Teil

<sup>1)</sup> J. chem. Soc. [London] 1933, 395; s. auch J. W. Cook, ebenda 1932, 456; Cook u. Kennaway, Amer. J. Cancer, 39, 381, 521 [1940].

<sup>2)</sup> Hoppe-Seyler Z. physiol. Chem. 219, 240 [1933]; s. auch J. W. Cook u. Haslewood, Chem. a. Ind. 1933, 758; J. Chem. Soc. [London] 1934, 428.

<sup>3)</sup> Kennaway u. Sampson, J. pathol. Bact. 31, 609 [1928]; s. auch J. W. Cook, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Pedler Lecture, J. Chem. Soc. [London] 1950, 2110.

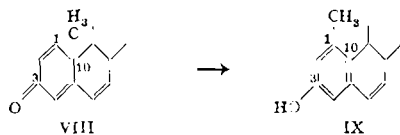
<sup>4)</sup> Vgl. jedoch H. H. Inhoffen, diese Ztschr. 59, 212 [1947].

<sup>5)</sup> Inhoffen u. Huang-Minlon, Naturwiss. 26, 756 [1938]; Inhoffen, Zühlsdorff u. Huang-Minlon, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 451 [1940]; Inhoffen, diese Ztschr. 53, 473 [1940]; Inhoffen u. Zühlsdorff, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 604, 1911 [1941]; Wilds u. Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. 68, 1712 [1946]; Inhoffen, diese Ztschr. 59, 207 [1947]; Djerassi u. Scholz, J. Amer. Chem. Soc. 70, 1911 [1948]; Inhoffen u. Stoeck, Liebigs Ann. Chem. 563, 127 [1949]; Inhoffen, Stoeck u. Lübeck, ebenda 563, 177 [1949].

<sup>6)</sup> J. Amer. Chem. Soc. 72, 494 [1950]; vgl. diese Ztschr. 62, 542 [1950].

des neuen Ringes A (neues C<sub>1</sub>), während das Methyl, ohne seinen Platz am ehemaligen C-Atom 10 verlassen zu haben, nunmehr am „neuen“ C-Atom 4 haftet. Dem *Meerweinschen* Sprachgebrauch zufolge wäre dies also eine Umlagerung im Kation.

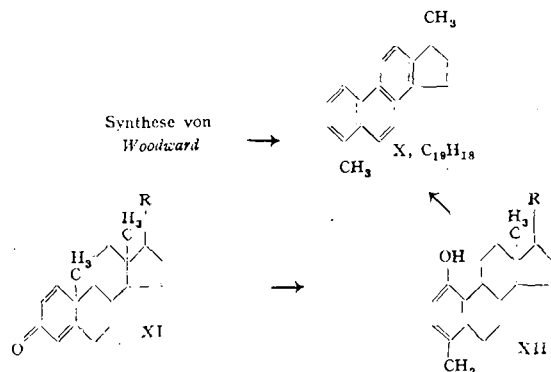
*Djerassi* und Mitarbeiter<sup>7)</sup> haben gezeigt, daß auch die „normale“ Form einer einfachen Methyl-Wanderung möglich ist. Sie fanden, daß im Ring B zusätzlich ungesättigte  $\Delta^{14}$ -Dienone (VIII) sich isomerisieren:



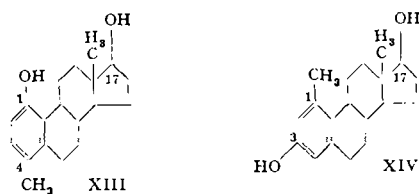
Hier verlagert sich also tatsächlich die Methyl-Gruppe von C<sub>10</sub> an das C-Atom 1, wie dies schon früher angenommen worden war<sup>8)</sup>.

Je nach der Struktur der Ausgangsstoffe (VI oder VIII) erhalten wir daher bei den geschilderten Aromatisierungsreaktionen entweder 1-Oxy-4-methyl-(VII) oder 1-Methyl-3-oxy-Derivate (IX) des Oestratriens-(1,3,5) (ohne Berücksichtigung der Seitenkette).

Die von *Woodward* als möglich angeführte Bildung einer 1-Methyl-4-oxy-Verbindung konnte durch synthetische Darstellung des 3',8-Dimethyl-1,2-cyclopenteno-phenanthrens C<sub>19</sub>H<sub>18</sub> (X) ausgeschlossen werden<sup>9)</sup>. Es erwies sich mit unserem aus  $\Delta^{1,4}$ -Cholestadienon-3 (XI) bzw. aus Sterinphenol (XII) erhaltenen Kohlenwasserstoff gleicher Zusammensetzung<sup>10)</sup> als identisch.



Führen wir die beiden Möglichkeiten der Aromatisierung des Ringes A in der Androstan-Reihe durch, so gelangen wir folgerichtig zu zwei Vertretern der Oestron-Gruppe, von denen das zuerst dargestellte 4-Methyl-oestradiol-1,17 (XIII) verständlicherweise oestrogen unwirksam ist, während das echte 1-Methyl-oestradiol-3,17 (XIV) von *Djerassi*<sup>7)</sup> sich im *Allen-Doisy*-Test als fast so wirksam erweist wie das Follikelhormon selbst.



Wenn hier eine kurze Zwischenbemerkung über den Zusammenhang zwischen physiologischer Wirksamkeit und chemischer Konstitution gemacht werden darf, so sei auf den räumlichen Abstand zwischen den beiden Hydroxyl-Gruppen im Oestradiol hingewiesen (Bild 1, oberes Modell). Sehen wir den hiermit festgelegten OH-Abstand als unerlässliche Voraussetzung für eine (noch nicht eindeutig bewiesene) Symplex-Bildung zwischen dem Follikelhormon und einem Protein an, so ist es ohne weiteres verständlich, daß bei verkürzter Entfernung der beiden Hydroxyle, wie sie in XIII vorliegt eine Anlagerung an die physiologische Matrice nicht mehr möglich ist und folglich ein Wirksamwerden dieses Oestron-Derivates nicht zustande kommen kann.

<sup>7)</sup> Ebenda 72, 4534, 4540 [1950].

<sup>8)</sup> H. H. Inhoffen u. G. Zühlsdorff, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 604 [1941].

<sup>9)</sup> Privatmitteilung von Woodward.

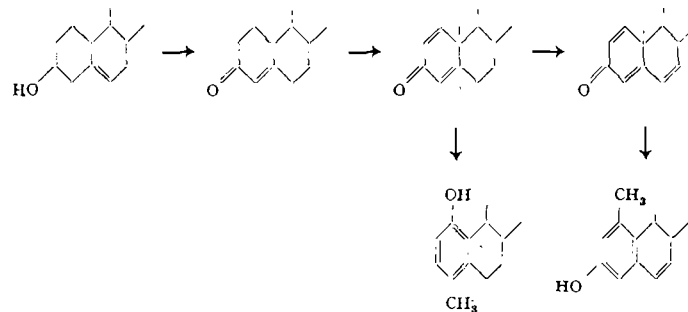
<sup>10)</sup> H. H. Inhoffen, G. Stoeck u. G. Kölling, Chem. Ber. 82, 263 [1949].

Das Stilboestrol erfüllt übrigens diese Anforderungen, die an die Struktur hinsichtlich des Sauerstoff-Abstandes gestellt werden, weitestgehend, wovon man sich leicht am Stuart-Modell überzeugen kann (Bild 1, unteres Modell<sup>11)</sup>).

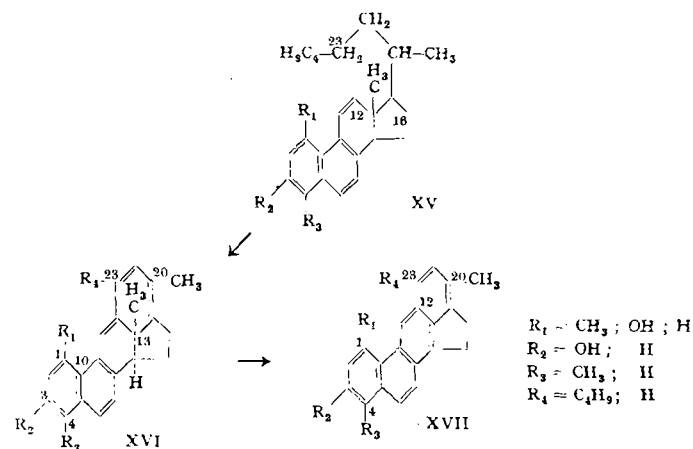
Auch die Dicke der Molekel im Bereich des C<sub>13</sub>-Methyls findet sich beim Stilboestrol-Dietrich als Folge der sterischen Hinderung durch die beiden Äthyl-Gruppen und der hiermit zusammenhängenden Verdrehung der Benzol-Kerne wieder.

Durch die beiden dargelegten Aromatisierungsreaktionen ist die Möglichkeit gegeben, daß 3-Keto-sterioide, die in den Ringen A bzw. A und B mehrfach ungesättigt sind, bei Zimmertemperatur unter „Verschiebung“ des angulären C<sub>10</sub>-Methyls an das C-Atom 1 oder 4 in Derivate des p- und m-Kresols übergehen.

Mit den bisherigen Ergebnissen ist zu diskutieren, ob eine sog. „einleitende Aromatisierung“ – als zellmöglich angenommen – den Beginn und die Voraussetzung zu weiterer Dehydrierung darstellen könnten. Sie wäre somit im einzelnen über nachstehende Anfangsstufen laufend zu formulieren<sup>12)</sup>:



Durch weiteren Wasserstoff-Entzug könnten schließlich im Falle des Cholesterins die nachfolgenden Reaktionen vor sich gehen, XV  $\rightarrow$  XVII:



<sup>11)</sup> Zu den Modellen: Mit den jetzigen Kalotten der Fa. *Leybold* ist der Aufbau eines trans-Hydrindans nicht möglich; im Modell ist daher Ring D ein 6-Ring, was jedoch für die hier behandelten Fragen keine entscheidende Bedeutung hat.

<sup>12)</sup> H. H. Inhoffen, G. Stoeck u. E. Lückke, Liebigs Ann. Chem. 663, 177 [1949].

Wesentlich ist vor allem der Ringschluß der aliphatischen Seitenkette zum C<sub>12</sub> im Verlauf der Dehydrierung. Führen wir diese Reaktionsfolge mit einer Gallensäure durch, so hätten wir am C-Atom 23 infolge der kürzeren Seitenkette an Stelle des Isobutyl-Restes ein Wasserstoffatom (R<sub>4</sub>). Daß die Seitenkette von Sterinen und Gallensäuren unter energischen Dehydrierungs-Bedingungen auch ohne Sauerstoff am C-Atom 12 zur Neubildung eines fünften Ringes Anlaß geben kann, geht schon aus älteren Resultaten hervor. Allerdings finden hier sämtliche Ringschlüsse zum C-Atom 16 statt.

Zu der vorletzten Phase XV → XVI sei bemerkt, daß die zweite der angulären Methyl-Gruppen, nämlich die an C<sub>13</sub>, formal zunächst erhalten bleibt; ihre Eliminierung erscheint nicht ohne weiteres gegeben. Um die entwickelte Arbeitshypothese zu prüfen, müssen daher auch derartige Stoffe dargestellt und auf ihre krebserregende Wirksamkeit untersucht werden. Führen wir die Dehydrierung weiter bis zum möglichen Endpunkt durch, d. h. also unter Abspaltung auch dieser letzten angulären Methyl-Gruppe, so gelangen wir schließlich zu echten Cholanthren-Derivaten (XVII).

Zwei Grundsubstanzen, an deren Darstellung uns im Augenblick am meisten gelegen ist und deren baldige Gewinnung uns möglich erscheint, nämlich das 1-Oxy-4-methyl-hexadecadehydro-10,23-bisnorchole (XVI) und das 1-Oxy-4,20'-dimethyl-cholanthren XVII sind in den Bildern 2 und 3 als Modell wiedergegeben.

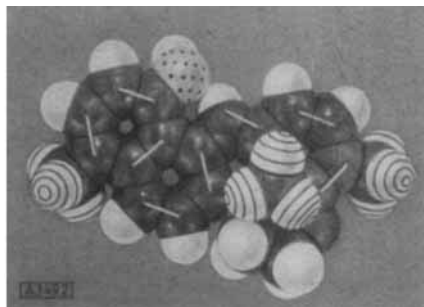


Bild 2, XVI

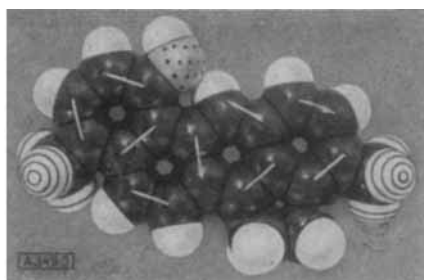


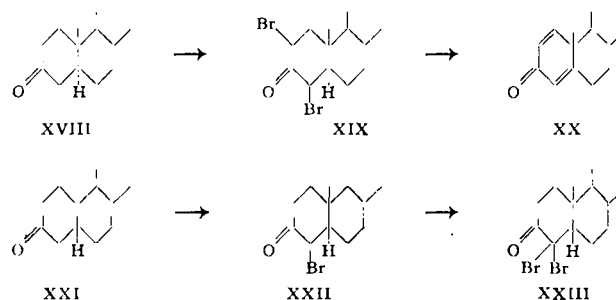
Bild 3, XVII

### Alter Weg zur Aromatisierung des Ringes A

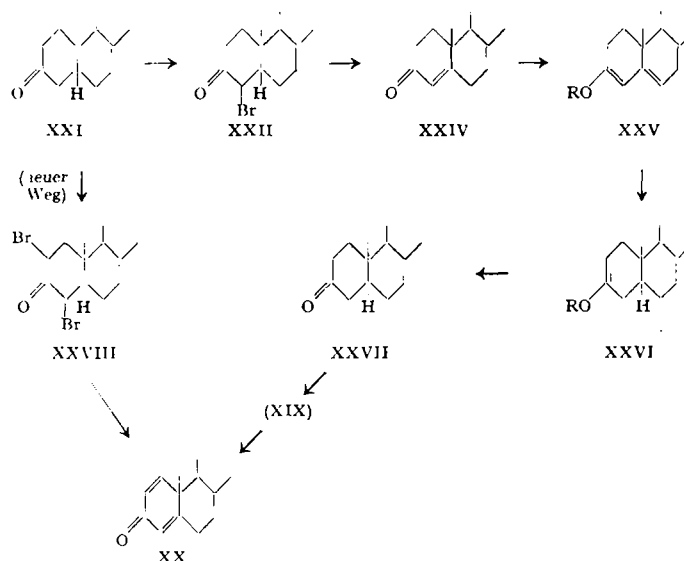
In der Cholesterin-Molekel ist der Ringschluß der Seitenkette zum C-Atom 12 noch ungelöst. Daher sind die im Folgenden geschilderten Reaktionen zunächst in die Gallensäure-Reihe übertragen, wo durch den C<sub>12</sub>-Sauerstoff die von Wieland durchgeführte unerläßliche Bildung des fünften Ringes ermöglicht wird.

Vorstufe für die Aromatisierung des Ringes A unter Verschiebung des Methyls sind, wie wir sahen, die im Ring A zweifach ungesättigten Steroid-3-ketone (XX). Diese wiederum werden aus den 2,4-Dibromiden (XIX) der gesättigten 3-Ketone (XVIII) durch 2-fache HBr-Abspaltung gewonnen. Damit die beiden Bromatome an die C-Atome 2 und 4 treten, war es nach unseren bisherigen Anschauungen erforderlich, daß die Ringe A und B des Sterin-Gerüsts in trans-Stellung miteinander verknüpft vorliegen, wie dies beim Cholestanon der Fall ist.

Im Falle der beim Koprostanon vorhandenen cis-Verknüpfung sollten nach der *Butenandschen* Regel beide Bromatome nacheinander am C-Atom 4 eintreten, entsprechend dem Übergang XXI → XXIII.



Da wir bei den Gallensäuren cis-Stellung der Ringe A und B vorfinden, sollten bei der Bromierung die nicht brauchbaren 4,4-Dibromketone entstehen, so daß sich zwangsläufig als erste Zielsetzung ergab, die sterische Konfiguration am C-Atom 5 der Gallensäuren zu ändern. Nach Überwindung einiger Schwierigkeiten gelangten wir zu einer grundsätzlichen Lösung, die durch das Formelschema XXI → XXVII<sup>13)</sup> dargestellt ist:



Cholan-3-ketone (XXI), z. B. Koprostanon und 3-Keto-cholansäure-ester, werden in 4-Stellung monobromiert (XXII) und durch HBr-Abspaltung zunächst in die Δ<sup>4,5</sup>-ungesättigten Ketone (XXIV) übergeführt. Die 2-fach ungesättigten Enoläther dieser Ketone mit der Konfiguration XXV lassen sich, wie wir schließlich nach zahlreichen Versuchen fanden, partiell zu den einfach ungesättigten trans-Enoläthern (XXVI) hydrieren. Spaltung der trans-Enoläther führt letzten Endes zu den trans-Ketonen (XXVII), die nun in bekannter Weise in 2,4-Stellung bromiert werden können.

Wenn auch dieses Verfahren als durchaus brauchbar angesehen werden darf, so war doch die Gesamtausbeute im Hinblick auf die noch anzuschließenden Reaktionen als ungenügend anzusprechen. Wir suchten daher nach einem neuen Reaktionsweg, der schließlich gefunden wurde.

### Die neue Methode zur Aromatisierung des Ringes A

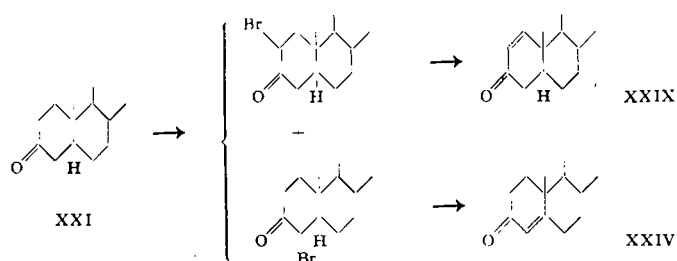
Zwei Beobachtungen brachten uns auf den richtigen Weg. Einmal war uns aufgefallen, daß das Monobromid des Koprostanons allem Anschein nach immer als Gemisch erhalten wurde, aus dem das von *Butenandt* und *Wolf*<sup>14)</sup> beschriebene 4-Bromid nur schwierig und nur mit sehr geringer Ausbeute abgetrennt werden konnte. Zum zweiten erinnerten wir uns an die Beobachtung von *Windaus* und *Mielke*<sup>15)</sup>, daß bei der Sulfurierung des Koprostanons auch eine 2-Sulfosäure entsteht. Wir untersuchten

<sup>13)</sup> H. H. Inhoffen, G. Stoeck, G. Kölling u. U. Stoeck, ebenda 568, 52 [1950]; H. H. Inhoffen, W. Becker u. G. Kölling, ebenda 568, 181 [1950].

<sup>14)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. 68, 2091 [1935].

<sup>15)</sup> Liebigs Ann. Chem. 536, 116 [1938].

daher nochmals die Bromierung des Koprostanons und fanden sehr bald, daß diese im Gegensatz zu alten Vorstellungen folgenden Verlauf nimmt<sup>16)</sup>:

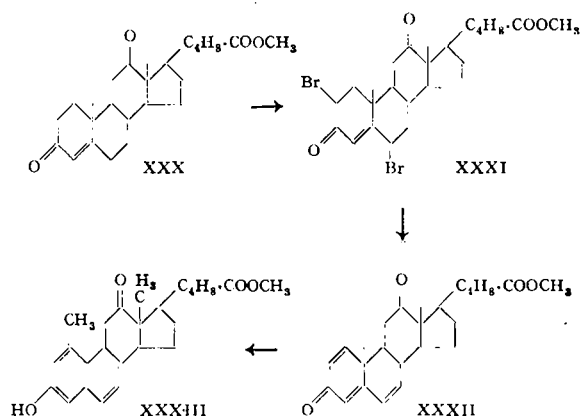


Bei der Monobromierung des Koprostanons (XXI) entsteht das schwer trennbare Gemisch von 2- und 4-Bromid, das durch HBr-Abspaltung in das chromatographisch leicht trennbare Gemisch von annähernd gleichen Teilen  $\Delta^1$ - und  $\Delta^4$ -Cholestenon (XXIX und XXIV) übergeführt wird.

Daß die Dibromierung des Koprostanons bei dieser Sachlage zu XXVIII führen würde, war jetzt nicht mehr überraschend. Denn die Bildung eines Gemisches aus 2,2- und 4,4-Dibromiden war als unwahrscheinlich anzusprechen.

In der Tat nimmt die Dibromierung den angegebenen Verlauf und die HBr-Abspaltung führt in glatter Reaktion zu den bekannten  $\Delta^{1,4}$ -Dienketonen, wie dies bereits in der Formelreihe XXI  $\rightarrow$  XXVIII  $\rightarrow$  XX schon eingezeichnet ist<sup>16)</sup>. Die ins Auge fallende Verkürzung des Reaktionsweges hat auch die angestrebte Steigerung der Ausbeute um mehr als eine Zehnerpotenz zur Folge: An Stelle von 7 Stufen mit insgesamt 2% kommen wir jetzt mit nur 2 Stufen mit über 20% Ausbeute aus.

Wollen wir die 1-Methyl-3-oxy-Verbindungen (XXXIII) gewinnen, so gehen wir von dem einfach ungesättigten Cholsäureketon der Struktur XXX aus, dessen bisher unbekanntes Dibromierungsprodukt (XXXI) nach *Djerassi* und Mitarbeitern<sup>7)</sup> als 2,6-Dibromid zu formulieren sein wird und spalten aus dem letzteren 2 Mol Bromwasserstoff ab unter Bildung des  $\Delta^{1,4,6}$ -Trien-3-ketons (XXXII), das nun seinerseits in „normaler“ Weise aromatisiert (XXXIII)<sup>7)</sup>.



### Jetziger Stand der Reaktionen

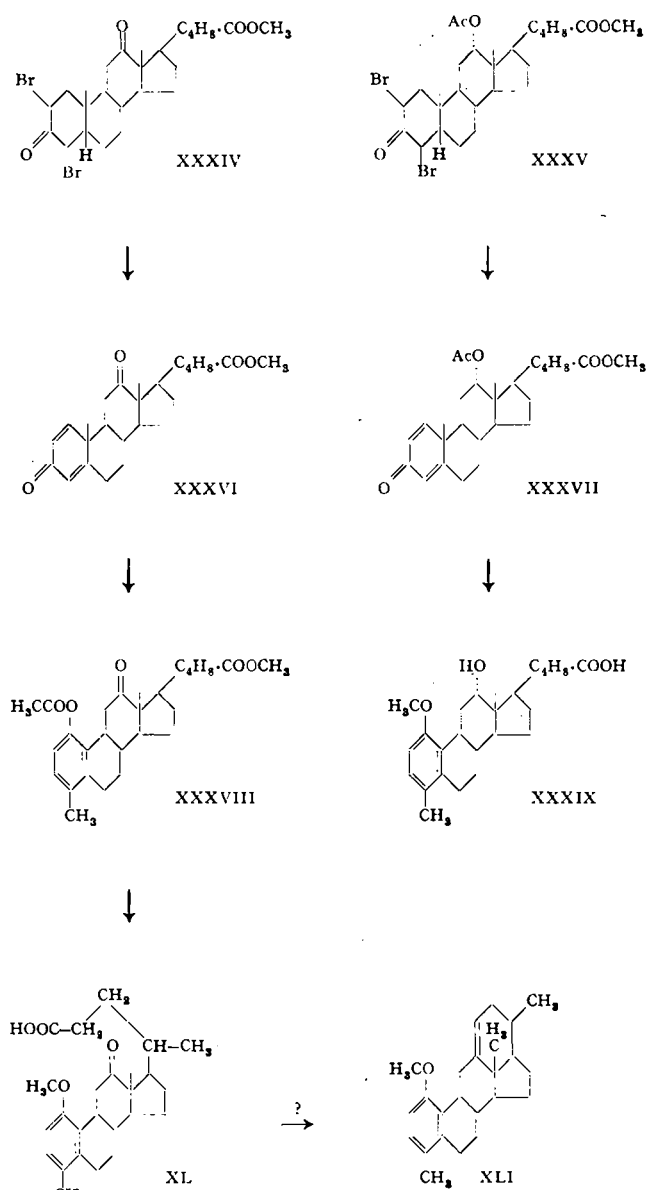
Durch Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf Desoxycholsäure bzw. deren Methylester konnten wir vor kurzem die nachstehenden Reaktionen durchführen<sup>17)</sup>.

3,12-Diketo-cholsäureester und 3-Keto-12( $\alpha$ )acetoxy-cholsäureester ließen sich glatt in die 2,4-Dibromide XXXIV und XXXV vom Fp 185,5–186° resp. 184–185° überführen, die durch Bromwasserstoff-Abspaltung die entspr. Dienketone XXXVI und XXXVII vom Fp 132,5–133° resp. 115–116° ergaben. Die Umlagerung unter den bekannten Bedingungen lieferte die im Ring A aromatischen Säuren, die sich als acetylierter Ester XXXVIII vom Fp 135,5–136° resp. als 1-methylierte Säure XXXIX vom Fp 187–188° charakterisieren ließen.

<sup>16)</sup> H. H. Inhoffen, G. Koch, I. Nebel u. G. Kölling, *Chemiker-Z.* 74, 309 [1950]; dieselben *Chem. Ber.* 84, 361 [1951].

<sup>17)</sup> Noch unveröffentlicht.

Die 1-methylierte aromatische Keto-cholsäure (XL) soll nunmehr dem dargelegten Ringschluß zu XLI zugeführt werden.



### Zusammenfassung

Die von *Cook* und *Kennaway* erörterte Möglichkeit, daß der krebserregende Kohlenwasserstoff Methyl-cholanthren auch in vivo im Verlauf eines anomalen Stoffwechsels aus Cholesterin entstehen und dies die letzte Ursache einer Carcinombildung sein könne, soll von der chemischen Seite her geprüft werden.

Es wird eine mögliche Reaktionsfolge des Übergangs vom Cholesterin bzw. der Cholsäure in bestimmte Abkömmlinge des Methyl-cholanthrens dargelegt, und die Darstellung möglichst aller Zwischenprodukte als Arbeitsziel angegeben.

Die „einleitende Aromatisierung“ des Ringes A wird über die im Ring A 2-fach ungesättigten Steroid-3-ketone verlaufend angenommen. Diese vermögen sich in bemerkenswerter Weise unter Verschiebung der  $C_{10}$ -Methylgruppe in Methyl-phenole umzulagern. Hiernach ist das Aromatischerwerden auch des Ringes B durch Wasserstoffentzug möglich. Weitere Dehydrierung und Bildung des fünften Ringes zwischen  $C_{12}$  und  $C_{23}$  soll zu einer „Cholanthren-Vorstufe“ führen, die möglicherweise schon selbst cancerogen wirksam sein könnte; hiermit würde die bisherige Annahme einer notwendigen Entfernung der letzten angulären Methylgruppe hinfällig werden. Als erste Glieder der Reihe werden zwei im Ring A aromatische Gallensäure-Derivate beschrieben.

Eingeg. am 2. April 1951

[A 349]