

## HANS LETTRÉ und LEO KNOF

Über Azasterine, II<sup>1)</sup>

## 6-Aza-cholesterin und Derivate

Aus dem Institut für Experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 4. Juli 1960)

*Herrn Prof. Dr. R. Kuhn zum 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet*

Der Abbau nach CURTIUS führt das Azid der 5.6-Seco-3 $\beta$ -acetoxy-5-oxo-cholestan-6-säure (Ic) über ein C<sub>26</sub>-Amin durch Ringschluß und Abspaltung von Essigsäure in  $\Delta^{3,5}$ -6-Aza-cholestadien, C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>N, über. Das aus Ic erhaltene Isocyanat kann bei gleichzeitiger Hydrolyse und katalytischer Hydrierung in 3 $\beta$ -Acetoxy-6-aza-cholestan übergeführt werden, aus dem durch Dehydrierung und Verseifung 6-Aza-cholesterin erhalten wird.

Vom Cholesterin, C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O, lassen sich der Summenformel nach 27 Azacholesterine, C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>NO, (unter Ausschluß sonstiger möglicher Isomeren) erwarten<sup>2)</sup>. Der Ersatz der quartären C-Atome 5, 10 und 13 durch N führt jedoch zu quartären Ammoniumverbindungen, so daß die Zahl sich auf 24 verringert. Besonderheiten werden bei dem Austausch der C-Atome 2, 3 oder 4 zu erwarten sein, da diese Isomeren cyclische Aldehyd-aminderivate (2 oder 4) bzw. ein Hydroxylaminderivat (3) darstellen. Es bleiben demnach 21 verschiedene Azacholesterine, von denen man Stabilität und Ähnlichkeit in chemischer Hinsicht voraussehen kann. Von ihnen enthalten fünf eine primäre (18, 19, 21, 26, 27), neun eine sekundäre (1, 7, 11, 12, 15, 16, 22, 23, 24) und sieben eine tertiäre (6, 8, 9, 14, 17, 20, 25) Aminogruppe (vgl. Strukturformel des Cholesterins). Von diesen zahlreichen möglichen Isomeren erschien uns nach den bisherigen Erfahrungen mit cytotoxischen Sterinderivaten<sup>3)</sup> das 6-Aza-cholesterin einer Untersuchung besonders wert.

Ausgehend von der 3 $\beta$ -Acetoxy-5.6-seco-5-oxo-cholestan-6-säure (Ia)<sup>4)</sup>, haben wir über ihr Säurechlorid (Ib) das Säureazid Ic dargestellt. Dieses spaltet beim Erwärmen in Essigsäure N<sub>2</sub> ab; über das — zunächst nicht isolierte — Isocyanat IIa sollte das Amin III entstehen, das jedoch bisher nicht in Substanz gefaßt wurde. Als Endprodukt der Reaktion wurde eine krist. Verbindung C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>N (IV) erhalten, die sich von dem Amin III durch ein Minus von Wasser und Essigsäure unterscheidet. Neben dem erwünschten Ringschluß zwischen der primären Aminogruppe an C-7 und der Car-

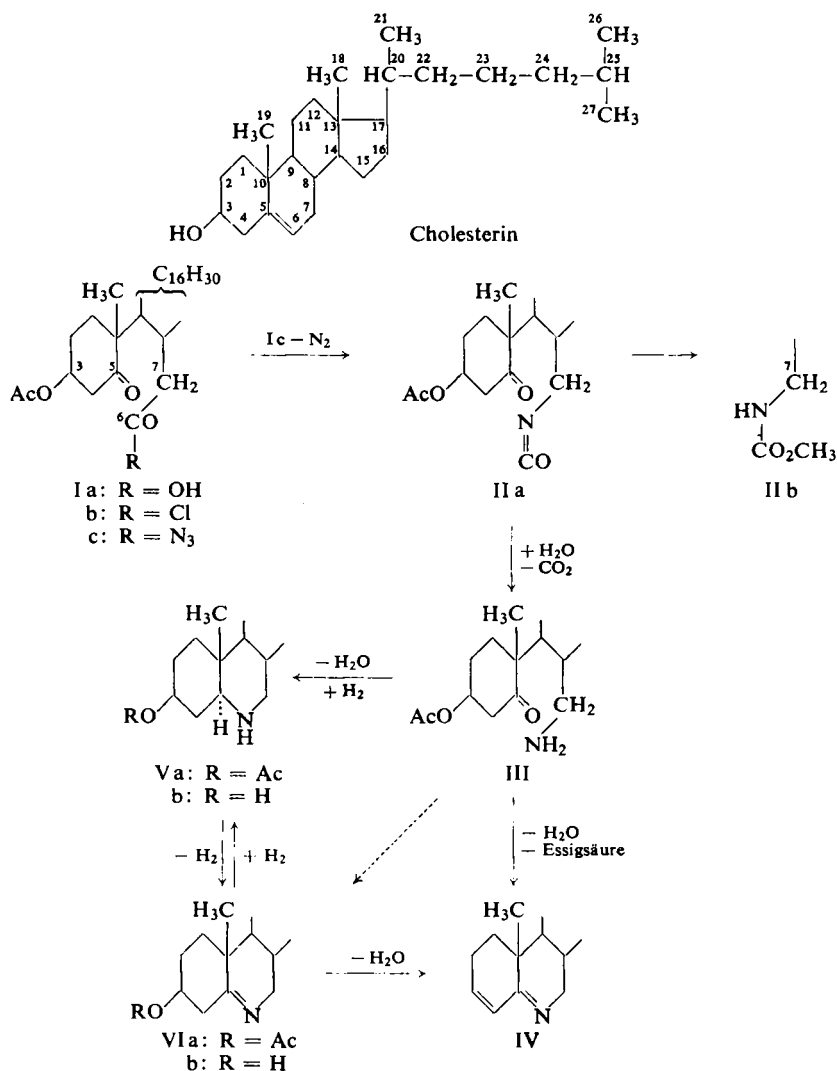
<sup>1)</sup> H. LETTRÉ, D. HOTZ und CH. SCHOLTISSEK, Liebigs Ann. Chem. **621**, 79 [1959]. Diese Arbeit wird nachträglich als I. Mitteilung über Azasterine bezeichnet.

<sup>2)</sup> Über Azaderivate von Steroiden vgl. C. C. BOLT, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **57**, 905 [1938]; C. W. SHOPPEE und J. C. P. SLY, J. chem. Soc. [London] **1958**, 3458; R. H. MAZUR, J. Amer. chem. Soc. **81**, 1454 [1959]; M. USKOKOVIC und M. GUR, Helv. chim. Acta **42**, 2258 [1959]. Von Lettré und Mitarbb. wurde das 25-Aza-cholesterin beschrieben<sup>1)</sup>.

<sup>3)</sup> H. LETTRÉ, Progress in Experimental Tumor Research **1**, 329, Verlag Karger, Basel-New York 1960.

<sup>4)</sup> F. ŠORM, Collect. czechoslov. chem. Commun. **12**, 436 [1947]; C. A. **43**, 3018 [1949].

bonylgruppe an C-5 hat gleichzeitig eine unerwünschte Abspaltung von Essigsäure stattgefunden, wodurch eine zweite Doppelbindung in das 6-Aza-sterin eingeführt wird. Die beiden Doppelbindungen sind nach der Ultraviolettabsorption konjugiert, so daß die Verbindung als das  $\Delta^{3,5}$ -6-Aza-cholestadien angesehen werden kann.



Verbindung IV ist als freie Base in Wasser unlöslich, läßt sich aber mit Mineralsäuren und organischen Säuren leicht in wäßrige Lösung bringen. Die sauren wie auch die nahezu neutralisierten Lösungen bilden einen sehr stabilen Schaum; die Salze von IV haben also den Charakter von Invertseifen<sup>5)</sup>. Mit dieser schon im Sommer 1958

<sup>5)</sup> Vgl. R. KUHN und H. J. BIELIG, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 1080 [1940].

hergestellten Verbindung konnten wir eine starke cytotoxische Wirkung feststellen, und zwar sowohl an Zellen in der Gewebekultur<sup>6)</sup> als auch an Tumorzellen in einem Organismus<sup>7)</sup>.

Diese Eigenschaften von IV ließen die Darstellung des 6-Aza-cholesterins von besonderem Interesse erscheinen. Unsere Bemühungen jedoch, die unerwünschte Abspaltung der Essigsäure durch Variation der Versuchsbedingungen zu vermeiden, blieben ohne Erfolg. Wir haben weiterhin das Zwischenprodukt IIa, das Isocyanat, isoliert, das durch Erwärmen des Säureazids Ic in indifferentem Medium (Dimethylformamid) erhalten werden konnte. Zur Charakterisierung wurde aus ihm das Urethan IIb hergestellt. Auch bei Verwendung des Isocyanats als Ausgangsmaterial führte die Hydrolyse unter den verschiedensten Bedingungen stets zu IV.

Nach vielen negativ verlaufenen Versuchen fanden wir, daß man vom Isocyanat durch katalytische Hydrierung zum  $\beta$ -Acetoxy-6-aza-cholestan (Va) kommt. Hierbei wird nur 1 Mol. H<sub>2</sub> verbraucht. Der Reaktionsmechanismus ist noch nicht geklärt; es ist offen, ob IIa direkt (unter Abspaltung der C<sub>1</sub>-Gruppe vom N) in Va übergeht, ob aus III intermediär VIa entsteht, das weiter zu Va hydriert wird, oder ob das Primärprodukt des Ringschlusses in III, das 5-Hydroxyderivat des 6-Aza-sterins, hydrierend in VIa übergeführt wird. Jedenfalls muß die Stabilisierung durch die Hydrierung schneller vor sich gehen als die Abspaltung der Essigsäure.

Um zum 6-Aza-cholesterin zu kommen, ist die Dehydrierung von V notwendig. Ein übersichtlicher Weg hierfür ist die Einwirkung von unterchloriger Säure, die zu dem N-Chlorderivat von Va führt, aus dem mit alkoholischer Lauge Chlorwasserstoff abgespalten wird. Hierbei tritt gleichzeitig Hydrolyse zum freien Alkohol VIb ein. Die Annahme, daß die Doppelbindung in VIb von C-5 zum Stickstoff geht, stützt sich auf die Art der Entstehung der Verbindung und weiter auf den Befund, daß durch Abspaltung von Wasser (durch Erhitzen auf 180° und bei dem Versuch der Dehydrierung mit Aluminiumisopropylat in Benzol/Aceton) aus 6-Aza-cholesterin das Dien IV entsteht.

In der Tabelle sind die Werte der spezifischen Drehung bei verschiedenen Wellenlängen von Cholesterin und 6-Aza-Derivaten zusammengestellt. Der Absolutwert der negativen Drehung ist für 6-Aza-cholesterin größer als der für Cholesterin.

Wie das Dien IV bilden 6-Aza-cholestanol und 6-Aza-cholesterin in Form ihrer Salze stark schäumende Lösungen; sie zeigen weiterhin eine starke cytotoxische Wirkung an Zellen in der Gewebekultur und an Tiertumoren. Die schon beim 25-Aza-cholesterin<sup>1)</sup> gefundene Toxizität ist im 6-Aza-cholesterin noch gesteigert. Schon Dosen von 0.2–0.3 mg 6-Aza-cholesterin (das sind etwa 5 Promille des im Körper vorhandenen Cholesterins) töten, intraperitoneal gegeben, Mäuse von 20 g, nachdem die Tiere im Laufe einiger Tage starke Gewichtsabnahme zeigen. Die durchgeführte chemische Variation läßt also aus dem lebensnotwendigen, physiologischen Inhaltsstoff ein starkes Gift entstehen.

Die an sich schon große Zahl der natürlichen und synthetischen Sterinderivate kann durch die Azaderivate noch sehr wesentlich vergrößert werden. 6-Aza-cholesterin

<sup>6)</sup> H. LETTRÉ und O. FLANDRE, *Rev. franc. d'études clin. biol.* **4**, 335 [1959].

<sup>7)</sup> W. CAFLISCH, *Medizin. Dissertat.*, Univ. Heidelberg 1959; H. LETTRÉ, *Antibiotica et Chemotherapia* **8**, 166 [1960].

Spezifische Drehung von Cholesterin und 6-Aza-Derivaten bei verschiedenen Wellenlängen, gemessen in 4-proz. Lösung in Chloroform (Photoelektr. Polarimeter Zeiss \*)

Substanz	Wellenlängen in m $\mu$				
	578	546	436	405	364
Cholesterin	-41.4	-47.1	-81.8	-99.0	-133.0
6-Aza-cholesterin	-72.8	-83.8	-157.0	-197.0	-291.0
3 $\beta$ -Hydroxy-6-aza-cholestan	+18.4	+20.9	+35.4	+42.1	+53.3
3 $\beta$ -Acetoxy-6-aza-cholestan	+14.8	+16.5	+28.3	+33.9	+43.5
6-Aza-cholestadien-(3.5)	-106.5	-122.6	-216.0	-261.0	
Isocyanat IIa	+102.0	+118.0	+220.0	+283.0	+440.0

\*) Für die Genehmigung der Benutzung des Apparates danken wir dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg.

ist als Ausgangsmaterial für die Herstellung von aus der Chemie des Cholesterins bekannten Derivaten geeignet. Die hier am Beispiel des Cholesterins beschriebene Reaktionsfolge haben wir auch auf andere Sterinderivate von physiologischem Interesse übertragen.

*Zusatz b. d. Korr.:* TH. L. JACOBS und R. B. BROWNFIELD<sup>8)</sup> beschreiben die Darstellung von 6-Aza-cholestan und 6-Aza- $\Delta^5$ -cholesten auf anderem Wege. Wir hatten diese Derivate schon durch Hydrierung von IV erhalten.

Der STIFTUNG FÜR KREBS- UND SCHARLACH-FORSCHUNG an der Universität Heidelberg, der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT sowie dem FONDS DER CHEMIE danken wir für die Unterstützung unserer Arbeiten.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*3 $\beta$ -Acetoxy-5,6-seco-5-oxo-cholestan-6-säurechlorid (Ib):* Die Lösung von 10 g der Säure Ia<sup>4)</sup> in 100 ccm absol. Äther und 10 ccm Dimethylformamid wird unter Rühren mit 5 ccm Thionylchlorid versetzt. Nach 1 Stde. wird die Mischung zu 400 ccm Eiswasser gegeben. Die äther. Schicht wird abgetrennt, getrocknet und abgedampft. Der krist. Rückstand wird mit Petroläther verrieben und abgesaugt. Die Verbindung läßt sich aus Aceton bei Zusatz von Wasser umkristallisieren. Schmp. 111–112°. Ausb. 82% d. Th.

C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>ClO<sub>4</sub> (501.7) Ber. C 70.37 H 9.57 Cl 7.16 Gef. C 70.43 H 9.57 Cl 7.05

*$\Delta^{3,5}$ -6-Aza-cholestadien (IV):* Die Lösung von 40 g Ib in 800 ccm Aceton wird unter Rühren mit 12 g Natriumazid in 120 ccm Wasser versetzt. Nach 10 Min. fügt man weitere 50 ccm Wasser zu, wodurch eine klare Lösung entsteht. Man gießt nach weiteren 10 Min. in 1.5 l Wasser und schüttelt mit Äther aus. Der Rückstand der getrockneten äther. Lösung enthält das amorphe *Säureazid Ic*. Man löst dieses in 150 ccm Eisessig und fügt 20 ccm Wasser hinzu. Die Lösung wird auf dem Dampfbad erwärmt, wobei nach etwa 10 Min. die Stickstoffentwicklung beendet ist. Die abgekühlte Lösung wird mit Natronlauge alkalisch gemacht und ausgeäthert. Aus der äther. Schicht wird IV mit einem Liter 0.5 n HCl ausgeschüttelt. Wird diese saure Lösung alkalisch gemacht und der gelöste Äther verdunstet, so liegt IV in filtrierbarer Form vor. Nach dem Umkristallisieren aus Aceton schmilzt die Verbindung bei 103 bis 104°. Maximum der UV-Absorption bei 225 m $\mu$ . Ausb. 96% d. Th.

C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>N (369.6) Ber. C 84.55 H 11.73 N 3.79 Gef. C 84.76 H 11.87 N 3.84

<sup>8)</sup> J. Amer. chem. Soc. **82**, 4033 [1960].

*3 $\beta$ -Acetoxy-5.6-seco-5-oxo-6-nor-cholestan-7-isocyanat (IIa)*: Das nach obiger Vorschrift aus 80 g *Ib* hergestellte *Azid Ic* wird in 140 ccm Dimethylformamid auf dem Wasserbade gelöst. Bei weiterem Erwärmen setzt Stickstoffentwicklung ein, die nach etwa 5 Min. beendet ist. Nach Zusatz von 10 ccm Wasser und Abkühlen im Eisschrank kristallisiert das Reaktionsprodukt aus. Schmp. 88–88.5° (aus Dimethylformamid), Ausb. 85% d. Th.

$C_{29}H_{47}NO_4$  (473.7) Ber. C 73.57 H 10.00 N 2.96 Gef. C 73.19 H 10.00 N 2.93

*3 $\beta$ -Acetoxy-5.6-seco-5-oxo-6-nor-cholestan-7-carbaminsäure-methylester (IIb)*: 0.5 g *IIa* werden in 30 ccm *Methanol* 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht und der Rückstand der eingedampften Lösung aus Petroläther umkristallisiert. Farblose Kristalle vom Schmp. 164–165°. Ausb. 82% d. Th.

$C_{30}H_{51}NO_5$  (505.7) Ber. C 71.28 H 10.09 N 2.77  $OCH_3$  6.14  $COCH_3$  8.51  
Gef. C 71.69 H 10.16 N 3.18  $OCH_3$  6.17  $COCH_3$  8.36

*3 $\beta$ -Acetoxy-6-aza-cholestan (Va)*: 2.5 g *IIa* nehmen mit 0.5 g Platinkatalysator in 40 ccm Eisessig während 2 Tagen 1 Mol.  $H_2$  auf. Die filtrierte Lösung wird eingedampft und der Rückstand in Wasser gelöst. Durch Zugabe von Natriumcarbonatlösung wird *Va* in Form einer knetbaren Masse ausgefällt, die mit Wasser gewaschen wird. Farblose Nadeln vom Schmp. 117–118.5° (aus Acetonitril). Ausb. 86% d. Th.

$C_{28}H_{49}NO_2$  (431.7) Ber. C 77.94 H 11.44 N 3.24 Gef. C 78.23 H 11.29 N 3.14

*3 $\beta$ -Hydroxy-6-aza-cholestan (Vb)*: 5 g *Va*, werden in 200 ccm 2.5-proz. methanol. Kalilauge 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Aus der im Eisschrank abgekühlten Lösung scheidet sich das Reaktionsprodukt kristallin aus. Ausb. 91% d. Th. Aus *Methanol* umkristallisiert, schmilzt die Verbindung bei 131–132°. Eine zweite Modifikation vom Schmp. 147–148° wird bei der Kristallisation aus Petroläther erhalten. Das Infrarotspektrum beider Formen ist identisch.

$C_{26}H_{47}NO$  (389.6) Ber. C 80.18 H 12.16 N 3.59 Gef. C 79.95 H 12.14 N 3.69

*3 $\beta$ -Hydroxy-6-aza- $\Delta^5$ -cholesten (6-Aza-cholesterin) (VIb)*: 2 g *Va*, in 50 ccm absol. Äther gelöst, werden mit 5 ccm einer äther. 1 *m* Lösung von unterchloriger Säure (dargestellt nach S. GOLDSCHMIDT<sup>9)</sup>) versetzt. Nach 5 Min. wird die äther. Lösung mit eiskalter 0.5 *n*  $H_2SO_4$ , dann mit 0.5 *n*  $NaOH$  ausgeschüttelt. Der Rückstand der getrockneten äther. Lösung, der das *N*-Chlorderivat von *Va* enthält, wird mit 40 ccm 5-proz. methanol. Kalilauge 1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Nach Zugabe von Wasser bis zur beginnenden Trübung scheidet sich beim Abkühlen das Reaktionsprodukt aus, das aus Aceton oder Essigester umkristallisiert wird. Ausb. 79% d. Th. Bei raschem Anheizen schmilzt die Verbindung bei 174–175° (Zers.), bei langsamem Anheizen zersetzt sie sich ab 161°.

$C_{26}H_{45}NO$  (397.6) Ber. C 80.61 H 11.70 N 3.61 Gef. C 80.84 H 11.71 N 3.72

Durch katalyt. Hydrierung in Eisessig oder durch Reduktion mit Lithiumalanat in Tetrahydrofuran haben wir *VIb* in *Vb* übergeführt. Durch 15 Min. langes Erhitzen auf 180° oder durch 8 stdg. Kochen in Benzol/Aceton (2:1) (1 g in 30 ccm) bei Gegenwart der gleichen Gewichtsmenge Aluminiumisopropylat wurden aus *VIb* 52 bzw. 55% *IV* erhalten.

<sup>9)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. 46, 2728 [1913].