

Institut für Pharmazeutische Chemie¹, Institut für Anorganische und Analytische Chemie² der Technischen Universität Braunschweig und Department Pharmazeutische und Medizinische Chemie³ der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Germany

Exemestan-Derivate – Synthese und Prüfung auf Aromatase-Hemmung

K. GÖRLITZER¹, CH. BONNEKESSEL¹, P. G. JONES², A. PALUSZAK³, R. W. HARTMANN³

Eingegangen am 5. August 2005, angenommen am 13. September 2005

Prof. Dr. K. Görlitzer, Institut für Pharmazeutische Chemie, Beethovenstraße 55, D-38106 Braunschweig
k.goerlitzer@tu-bs.de

Pharmazie 61: 575–581 (2006)

Der irreversible Aromatase-Hemmstoff Exemestan (**6**) reagiert mit Nitromethan und Natriumethanolat zum Michael-Addukt **9**. Durch Nef-Reaktion der Nitro-Verbindung **9** wird der Aldehyd **10** erhalten, der in einer Hantzsch-Reaktion mit β -Aminocrotonsäuremethylester in Eisessig das 1,4-Dihydropyridin (DHP) **11** liefert. Die neuen Verbindungen erwiesen sich im Vergleich mit **6** ($IC_{50} = 0,23 \mu M$) als etwas weniger potente Aromataseinhibitoren (IC_{50} Werte: **9**, $0,91 \mu M$; **10**, $2,5 \mu M$; **11**, $10 \mu M$). Das 1,4-DHP **11** wurde mit CAN oder elektrochemisch ($E_{1/2} = 1,18 V$) zum korrespondierenden Pyridin **12** dehydriert.

Derivatives of exemestane – synthesis and evaluation of aromatase inhibition

The irreversible aromatase inhibitor exemestane (**6**) reacts with nitromethane and sodium ethanolate to yield the Michael adduct **9**. The aldehyde **10** is obtained by Nef reaction of the nitro compound **9** and affords the 1,4-dihydropyridine (DHP) **11** by Hantzsch reaction using methyl β -aminocrotonate in acetic acid. The new compounds showed a reduced inhibitory potency towards aromatase (IC_{50} values: **9**, $0.91 \mu M$; **10**, $2.5 \mu M$; **11**, $10 \mu M$) compared to **6** ($IC_{50} = 0.23 \mu M$). The 1,4-DHP **11** was dehydrogenated with CAN or electrochemically ($E_{1/2} = 1.18 V$) to yield the corresponding pyridine **12**.

1. Einleitung

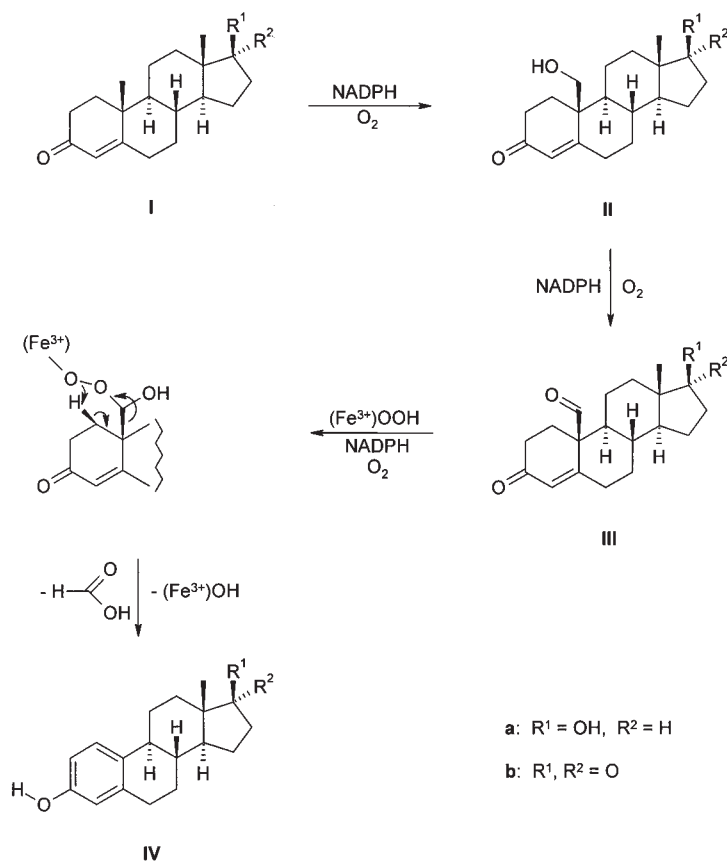
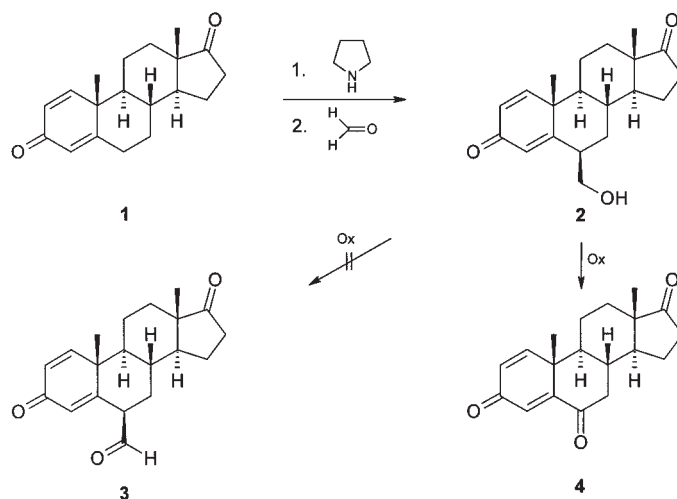
Die Umwandlung von Androgenen zu Estrogenen erfolgt in drei Schritten durch die Cytochrom P-450-Aromatase. Im ersten Schritt wird Androstendion (**1b**) bzw. Testosteron (**1a**) an C-19 hydroxyliert, wobei als Zwischenprodukt die 10-Hydroxymethyl-Verbindung **II** gebildet wird. Im zweiten Schritt erfolgt eine weitere Hydroxylierung an C-19 zum geminalen Diol. Daraus wird nach Wasserabspaltung der Aldehyd **III** erhalten. Im dritten Schritt wird die Bindung zwischen C-10 und C-19 oxidativ gespalten und unter Eliminierung von Ameisensäure Estradiol (**IVa**) bzw. Estron (**IVb**) erhalten (Cole und Robinson 1990) (Schema 1). Exemestan, 6-Methylen-androsta-1,4-dien-3,17-dion (**6**), ist ein irreversibler Aromatase-Hemmstoff. Eine Synthesestufe von Exemestan ist die 6 β -Hydroxymethyl-Verbindung **2** (Wagner und Ponsold 1986). Uns interessierte, ob das Oxidationsprodukt von **2**, der 6 β -Carbaldehyd **3**, und daraus durch Hantzsch-Synthese darstellbare 1,4-Dihydropyridine als Substrate für das Enzym Aromatase in Frage kommen und dieses hemmen (Schema 2).

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Androsta-1,4-dien-3,17-dion (**1**) wurde zunächst durch Umsetzung mit Pyrrolidin zu einem Dienamin aktiviert, das mit Formaldehyd-Lösung unter Alkylierung zu 6 β -Hy-

droxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion (**2**) reagierte. Die Dehydrierung des primären Alkohols **2** zum Aldehyd **3** gelang jedoch trotz Anwendung vielfältiger milder Oxidationsmittel nicht. Verwendet wurden Pyridinium-chlorochromat (PCC), die Swern-Oxidation mit Oxalylchlorid in Dimethylsulfoxid (DMSO), 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) und Dess-Martin-Periodinan (DMP) (1,1-Dihydro-1,1,1-triacetoxy-1,2-benziodoxol-3(1H)-on). Bei allen Versuchen konnte durch Flash-Chromatographie (FC) neben Exemestan nur das bekannte Androsta-1,4-dien-3,6,17-trion (**4**) (Buzzetti et al. 1993) isoliert werden (Schema 2). Mit Thionylchlorid reagierte der Alkohol **2** zur 6-Chlormethyl-Verbindung **5**, allerdings in schlechter Ausbeute (13 %). Da das 4-H im 1H NMR-Spektrum nicht nur eine Fernkopplung mit 2-H, sondern auch eine mit 6-H gibt, ist an C-6 Konfigurationsumkehr eingetreten (Schneider et al. 1973). Die Röntgenkristallstrukturanalyse von **5** beweist die 6 α -Stellung der Chlormethyl-Gruppe (Abb. 1). Wegen der geringen Ausbeute an **5** wurde auf die Umsetzung mit Cyanid zum Nitril und auf Versuche zu dessen Reduktion mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBALH) zum Aldehyd **3** verzichtet⁴.

Statt dessen wurde der Alkohol **2** mit methanolischer Salzsäure zu Exemestan (**6**) (Wagner et al. 1987) dehydratisiert und als Nebenprodukt der Methylether **7** isoliert. Da die Michael-Addition von Exemestan (**6**) mit Malonsäurediet-

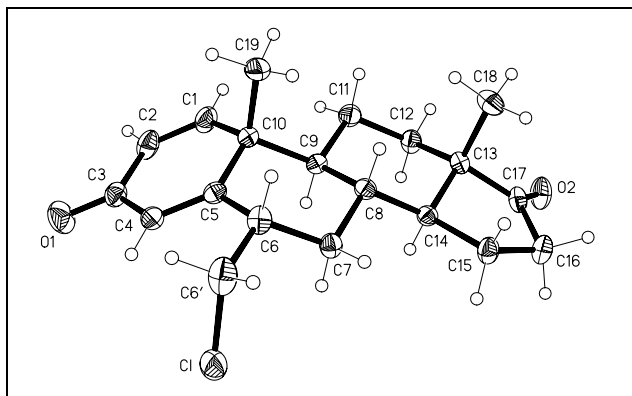
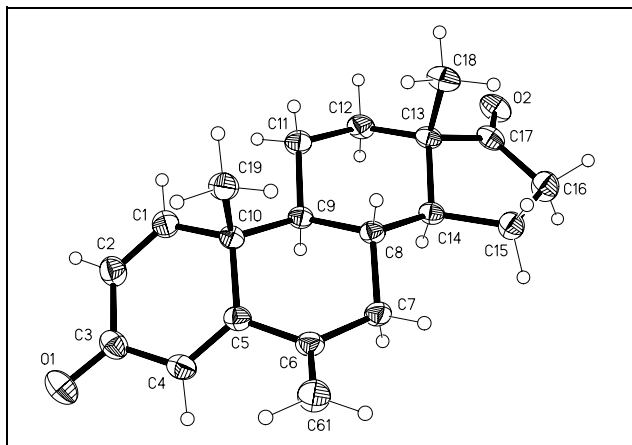
Schema 1: Mechanismus der Aromatase**Schema 2**

Ox = a: PCC, b: $\text{DMSO}/(\text{COCl})_2$, c: IBX, d: DMP

hylester und Natriumethanolat das Alkylmalonat **8** nur in 6 % Ausbeute lieferte, wurde der Plan aufgegeben, daraus über den Propionsäureester und das Propanol-Derivat den 6 β -Propionaldehyd zu synthetisieren.

Die geringe Reaktionsbereitschaft von Exemestan an der semicyclischen Doppelbindung kann einerseits auf das gekreuzt konjugierte System ungesättigter Ketone zurückgeführt werden, wodurch der nucleophile Angriff an δ -C-6¹ erschwert wird. Andererseits kann die 6-Methylen-Gruppe

durch Konformationsänderung im Ring B aus der Ebene des Ringes A heraustreten und einen eher olefinischen Charakter annehmen. Zur Klärung wurden von Exemestan Einkristalle erzeugt und einer Röntgenkristallstrukturanalyse zugeführt. Danach ist der Ring A nahezu planar (mittlere Abweichung aus der besten Ebene: 0.04 Å). Der Torsionswinkel C(4)-C(5)-C(6)-C(6¹) beträgt -42.3° und zeigt eine deutliche Abweichung der Methylen-Doppelbindung von der Ebene des Ringes A (Abb. 2).

Abb. 1: Röntgenstrukturanalyse von **5**Abb. 2: Röntgenstrukturanalyse von **6**

Im ^1H NMR-Spektrum des durch FC isolierten Michael-Addukts **8** zeigt das 4-H keine Kopplung mit dem 6-H. Der Substituent in 6-Stellung nimmt deshalb die β -Position ein.

Bei der Umsetzung von Exemestan mit Nitromethan und Ethanolat zum 2-Nitroethyl-Addukt **9** wurde nach Optimierung wenigstens eine Ausbeute von 32 % erreicht. Der 2-Nitroethyl-Substituent besitzt α -Konfiguration, da das 4-H als Triplett zwei Fernkopplungen über vier Bindungen aufweist.

Durch Nef-Reaktion wurde die 2-Nitroethyl-Gruppe von **9** in das Acetaldehyd-Derivat **10** überführt. Im ^1H NMR-Spektrum von **10** tritt das Aldehyd-Proton bei $\delta = 9.87$ ppm in Resonanz, im IR-Spektrum wird eine zusätzliche Carbonylvalenzschwingung bei 1720 cm^{-1} registriert.

Der Aldehyd **10** reagierte bei der Hantzsch-Synthese mit β -Aminocrotonsäuremethylester in Eisessig zum 1,4-Dihydropyridin (DHP) **11**. Im ^1H NMR-Spektrum von **11** werden aufgrund der unterschiedlichen chemischen Umgebung und/oder behinderter Rotation jeweils zwei Singulets für magnetische inäquivalente C-CH₃- und O-CH₃-Gruppen des 1,4-DHP registriert. Das 4-H des DHP erscheint durch Kopplung mit den benachbarten Methylen-Protonen als Triplett, das NH-Proton tritt als Singulett auf (Schema 3).

Zur Bestimmung der Hemmung menschlicher Aromatase wurden plazentare Mikrosomen und die $^3\text{H}_2\text{O}$ -Methode benutzt (Thompson und Siiteri 1974, Hartmann und Batzl 1986). Die Verbindungen **9–11** waren etwas weniger aktiv als Exemestan (**6**), wobei **9** immerhin noch 33 mal so potent wie die Referenzverbindung Aminoglutethimid war (Tabelle 1).

Tabelle 1: Aromatasehemmung durch Exemestan (**6**) und die Verbindungen **9–11**

Verbindung	Aromatasehemmung ^a IC ₅₀ [μM]	Relative Potenz ^b
6	$0,23 \pm 7,2\%$	131
9	$0,91 \pm 3,7\%$	33
10	$2,5 \pm 5,4\%$	12
11	$10 \pm 6,7\%$	3

^a Substrat: 1 β - ^3H -Androstendion/Androstendion (500 μM)

^b relativ zu Aminoglutethimid (IC₅₀ = 30 μM)

Das 1,4-DHP **11** lieferte bei der Dehydrierung mit Ammoniumcer(IV)-nitrat (CAN) in Aceton (Pfister 1990) das korrespondierende Pyridin-Derivat **12**. Die analog zu 4-Alkyl-1,4-DHP beobachtete Spaltung (Borsche und Hahn 1939; Niknam et al. 2005) von **11** in das 6 α -Methylan-1,4-dien-3,17-dion (**13**) und den 2,6-Dimethylpyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester (**14**) trat nicht ein (Schema 4).

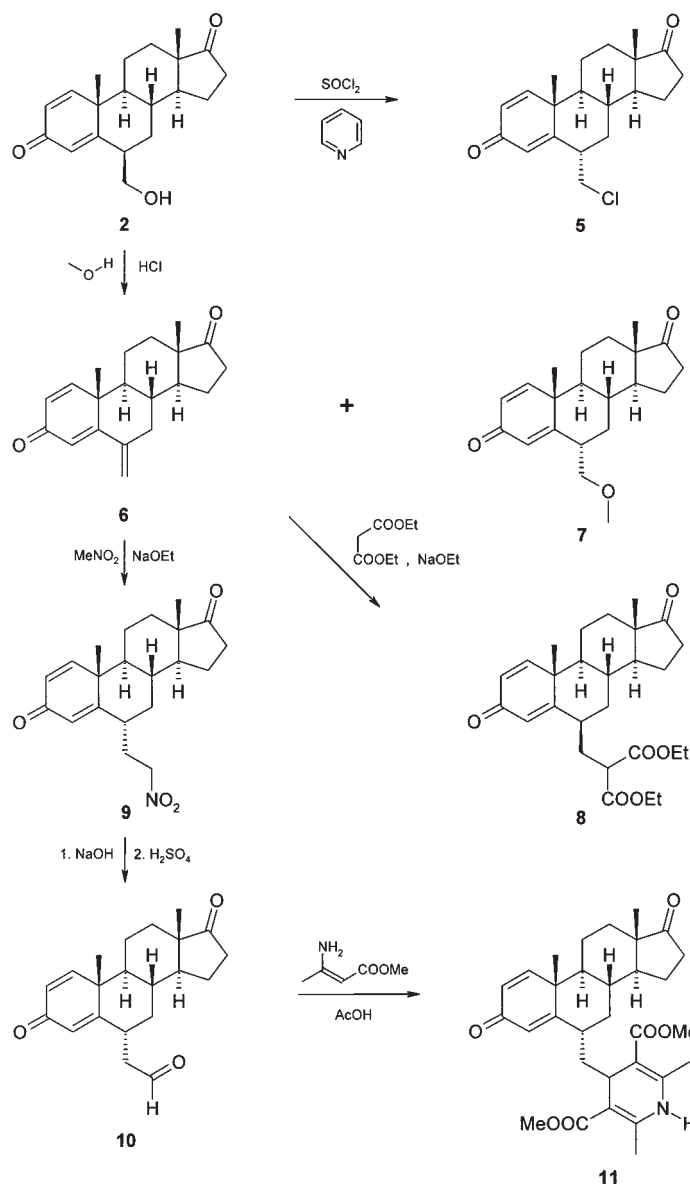
Um objektive Daten über die Stabilität des 1,4-DHP zu erhalten, wurde das Halbstufenpotential $E_{1/2}$ von **11** durch anodische Oxidation an der rotierenden Platinelektrode (RPE) mit Hilfe der Differenz-Puls-Voltammetrie bestimmt. $E_{1/2}$ betrug 1.18 V. Dieser Wert stimmt gut mit dem $E_{1/2} = 1.15$ V der Referenz-Substanz Nifedipin überein.

3. Experimenteller Teil

3.1. Allgemeine Angaben

Schmp.: Linström-Gerät (SPA-1, Fa. Bühler), nicht korrigiert. Elementaranalysen: C-H-N-O Elemental Analyzer 1106, Carlo Erba und CE Instruments FlashEA[®] 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest. IR-Spektren (FT-IR): ATI Mattson Genesis Series FT-IR-Spektrometer. UV/VIS-Spektren (UV): Philips PU 8730 und Analytik Jena Specord 200 UV/VIS-Spektrometer. Spezifische Drehung: Polarimeter Perkin Elmer 241. (1): 0.1 %ige Lösung in CH₂Cl₂; (2): 0.1 %ige Lösung in Dioxan. MS: Finnigan-MAT 8430, Finnigan-MAT 8400-MSS I und Finnigan-MAT 90 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig). Elektronenstoßionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV. Chemische Ionisation (CI)-MS: Reaktandgas NH₃. Elektrospray Ionisation (ESI)-MS. ^1H NMR (400.13 MHz)- und ^{13}C NMR (100.61 MHz): Bruker AM 400 und Bruker Avance DRX-400 (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig; einschließlich der NOE- und DEPT-Messungen, ^{13}C , ^1H -COSY-, HSQC- und ^{13}C , ^1H -COLOC-, HMBC-Spektren). Die chemischen Verschiebungen sind in ppm nach der δ_{TMS} -Skala angegeben. Für die Multiplizität der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, m = Multiplett, m ~ d = dublettähnliches Multiplett, m ~ t = triplettähnliches Multiplett, m_c = Zentrum eines symmetrischen Multipletts. Spektren-Simulationen: MestRe-C 2.3a, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Santiago de Compostela, ACDLabs 7.00 Release, Product Version 7.05 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario, Canada). HPLC: LiChrograph[®] L-6200 Gradientenpumpe; LiChrograph[®] L-4750 Dioden-Array-Detektor; LiChroCART[®] Auto-fix; PC 486 DX; D 7000 DAD System Manager Software. Trennsäule: LiChroCart[®] 125-4; LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 μm). Vorsäule: LiChroCart[®] 4-4, Select B. Flussrate: 1.000 ml/min, isokratische Elution. Mobile Phasen: (1): MeCN/H₂O (50:50); (2): MeCN/Phosphat-Pufferlösung pH 4,5 (0,05 mol/l) (50:50); (3): MeCN/H₂O (40:60). Injektionsvolumen: 20.0 μl . Detektion (DAD): 254 nm. Nettoretentionszeit (t_R) in min; Totzeit des Systems ermittelt mit Thiohamstoff. FC: Kieselgel 60 (Fa. Merck), Eluenten siehe jeweilige Substanzbeschreibung. DC: DC-Platten: Polygram[®] SIL G/UV254-Fertigfolien für die DC, 40 \times 80 mm (Macherey-Nagel). Differenz-Puls-Voltammetrie: Anodische Oxidation. Messgeräte: Polarecord E 506, Titriergefäß EA 875-20. Arbeitselektrode: Rotierende Platinscheibenelektrode (RPE) E 628-10, 4 mm Scheibendurchmesser, 1500 U/min. Bezugselektrode: Gesättigte Kalomelektrode (GKE) EA 404. Hilfselektrode: Platindrahtelektrode EA 285. (alle Geräte Fa. Metrohm). Pulsamplitude (ΔE): -100 mV. Auswertung: Graphische Ermittlung des Spitzenpotentials (E_p), Berechnung des Halbstufenpotentials nach $E_{1/2} = E_p + \Delta E/2$. Leitelektrolyt: 0.05 mmol/l LiClO₄/MeCN. Probenvorbereitung: Konzentration ca. 0.5 mmol/l LiClO₄-Lösung.

Schema 3



3.2. Röntgenstrukturanalysen

Die Einkristalle wurden entweder durch Flüssigdiffusion aus Petroläther/Ethylacetat (**5**) oder Umkristallisation aus Cyclohexan/ Me_2CO (**6**) gewonnen. Numerische Einzelheiten sind in der Tabelle zusammengestellt.

Datensammlung: Die Kristalle wurden in Inertöl montiert und in den Kaltgasstrom des Diffraktometers gebracht (Bruker SMART 1000 CCD). Es wurde bei -140°C mit $\text{Mo-K}\alpha$ -Strahlung ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) bis $2\theta\ 60^\circ$ gemessen. **Strukturverfeinerung:** Es wurde anisotrop gegen F^2 verfeinert (Programm SHELXL-97, G.M. Sheldrick, Universität Göttingen). Wasserstoffatome wurden wie folgt verfeinert: starre idealisierte Methylgruppen, sonst mit einem Riding-Modell. Für **5** konnte die absolute Konfiguration röntgenographisch bestätigt werden (Fleck-Parameter $-0.03(6)$); für **6**, eine Verbindung ohne anomale Streuer, wurden Friedel-Paare gemittelt und die bekannte absolute Konfiguration angenommen.

Vollständige Daten (außer Strukturfaktoren) wurden unter den Nummern CCDC-279025 (**5**) bzw. -279026 (**6**) beim Cambridge Crystallographic Data Centre deponiert und können kostenlos angefordert werden vom Direktor, CCDC, 12 Union Rd., Cambridge CB2 1EZ, UK (e-mail: deposit@chemcrs.cam.ac.uk), oder via www.ccdc.cam.ac.uk/contents/retrieving.html.

3.3. 6 β -Hydroxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion (**2**)

2.84 g (10 mmol) Androsta-1,4-dien-3,17-dion (**1**) werden in 20 ml Pyrrolidin gelöst und unter N_2 20 h unter Rückfluss erhitzt. Man engt i. Vak. bis zur Trockne ein, nimmt den öligen Rückstand mehrfach in Methanol auf

und destilliert das Lösemittel i. Vak. ab. Nach letztmaliger Methanolzugabe wird langsam bis zur beginnenden Kristallisation eingeeengt. Nach Abkühlen im Kühlschrank werden die gelben Kristalle von 1 α ,3-Dipyrrolidinylandrosta-3,5-dien-17-on abgesaugt und mit Methanol gewaschen. Diese werden androsta-3,5-dien-17-on in einem Gemisch aus 80 ml Benzol und 160 ml abs. EtOH gelöst und nach Zugabe von 2.0 ml 35% iger wässriger Formaldehydlösung 5 h unter N_2 bei RT gerührt. Dann wird der Ansatz i. Vak. zur Trockne eingeeengt, mit CH_2Cl_2 aufgenommen, viermal mit 10% iger H_2SO_4 und einmal mit H_2O ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen werden vereinigt und mit CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird einer FC an Kieselgel 60 (Eluent: Cyclohexan/ Me_2CO 1:1) unterzogen. Ausbeute: 1.10 g (35%). Farblose Kristalle, Schmp. 189°C , $193\text{--}196^\circ\text{C}$ (Wagner und Ponsold 1986). ^1H NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ (ppm) = 0.89 (s, 3H, 18- H_3), 1.03–1.09 (m, 1H, 9-H), 1.20 (s, 3H, 19- H_3), 1.15–1.31 (m, 3H, 7-HH, 12-HH, 14-H), 1.49–1.76 (m, 3H, 8-H, 11-HH, 15-HH), 1.81–2.06 (m, 5H, 7-HH, 11-HH, 12-HH, 15-HH, 16-HH), 2.43 (dd, $^2J = 19.0 \text{ Hz}$, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 1H, 16-HH), 2.71 (dd, $^3J = 6.8 \text{ Hz}$, $^3J = 13.8 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 3.63 (mc, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 4.77 (t, $^3J = 5.6 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 6.02 (d, $^4J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, 4-H), 6.08 (dd, $^3J = 10.1 \text{ Hz}$, $^4J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, 2-H), 7.17 (d, $^3J = 10.1 \text{ Hz}$, 1H, 1-H). ^{13}C NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$) + DEPT: δ (ppm) = 13.57 (C-18), 19.56 (C-19), 21.09 (C-15), 21.51 (C-11), 30.23 (C-8), 30.95 (C-12), 31.97 (C-7), 35.22 (C-16), 43.07 (C-10), 47.04 (C-13), 48.20 (C-6), 49.81 (C-14), 50.67 (C-9), 62.89 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 125.96 (C-2), 126.43 (C-4), 156.88 (C-1), 168.31 (C-5), 184.91 (C-3), 219.25 (C-17). Die Zuordnung der C- und H-Atome ist durch HSQC und HMBC gesichert! MS (EI): m/z (%) = 314 [$\text{M}]^{+}$

Schema 4

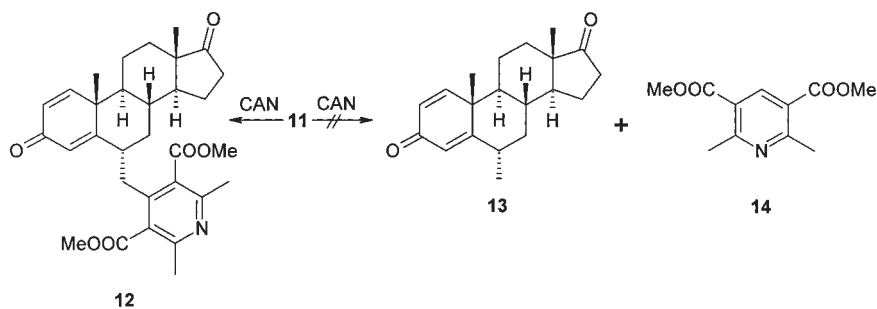


Tabelle 2: Röntgenographische Daten von 5 und 6

Verbindung	5	Exemestan (6)
Summenformel	C ₂₀ H ₂₅ ClO ₂	C ₂₀ H ₂₄ O
M _r	332.86	296.39
Habitus	gelbes Prisma	farblose Tafel
Kristallgröße (mm)	0.40 × 0.18 × 0.14	0.38 × 0.33 × 0.16
Kristallsystem	orthorhombisch	orthorhombisch
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Gitterkonstanten		
a (Å)	10.1528(12)	10.3335(12)
b (Å)	11.7441(16)	12.1239(14)
c (Å)	14.2087(18)	12.9953(14)
V (Å ³)	1694.2(4)	1628.1(3)
Z	4	4
ρ _{ber} (Mg m ⁻³)	1.305	1.209
μ (mm ⁻¹)	0.233	0.076
F(000)	712	640
Zahl der Reflexe:		
gemessen	26700	18843
unabhängig	4959	2698
R _{int}	0.0463	0.0280
Daten	4959	2698
Parameter	210	201
Goodness-of-fit an F ²	0.994	1.060
R-Werte [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0400, wR2 = 0.0988	R1 = 0.0350, wR2 = 0.0965
R-Werte (alle Daten)	R1 = 0.0519, wR2 = 0.1047	R1 = 0.0381, wR2 = 0.0996
Δρ (max/min) (e Å ⁻³)	0.365 und -0.505	0.286 und -0.177

(18), 134 (100). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1730 (17-C=O), 1661 (3-C=O), 1610 (C=C). Spezifische Drehung (1): $[\alpha]_D^{20} = +90.1$, $\alpha_D = +93$ (Buz-zetti et al. 1993). UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 243 nm (4.18). HPLC (3): $t_s = 1.61$ min (99.3 %). C₂₀H₂₆O₃ (314.4)

3.4. 6-Oxo-androsta-1,4-dien-3,17-dion (4)

3.4.1. Mit Pyridiniumchlorochromat (PCC)

0.65 g (3 mmol) PCC und 0.05 g (0.6 mmol) wasserfreies NaOAc werden in 5 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ unter Rühren gelöst. Nach Zugabe einer Lösung von 0.63 g (2 mmol) **2** in 3 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ wird 8 h bei RT gerührt. Überschüssiges PCC bzw. NaOAc wird durch einen mit Seesand und Kieselgel bedeckten Glasintertiegel abgesaugt und mit CH₂Cl₂ gewaschen. Das Filtrat wird dreimal mit H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Einengen i. Vak. wird der Rückstand einer FC an Kieselgel 60 (Eluent: Cyclohexan/Me₂CO 2:1) unterzogen. Ausbeute: 0.12 g (20 %).

3.4.2. Durch Swern-Oxidation

Zu einer Lösung von 0.29 g (2.3 mmol, 0.20 ml) Oxalsäuredichlorid in 5 ml CH₂Cl₂ werden bei -60 °C unter N₂ 0.38 g (4.9 mmol, 0.35 ml) DMSO in 1 ml CH₂Cl₂ zugegotropft und 30 min bei derselben Temperatur gerührt. Dann werden 0.60 g (1.9 mmol) **2** in 3 ml CH₂Cl₂ bei -60 °C zugegeben und weitere 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach Zutropfen von 0.96 g (9.5 mmol, 1.3 ml) Triethylamin wird langsam auf RT erwärmt und die Reaktion mit 10 ml Wasser abgebrochen. Die Phasen

werden getrennt, die wässrige noch zweimal mit je 10 ml CH₂Cl₂ ausgeschüttelt und die organischen Phasen vereinigt. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wird i. Vak. eingengt und der Rückstand einer FC an Kieselgel 60 (Eluent: Cyclohexan/Me₂CO 2:1) unterzogen. Ausbeute: 0.10 g (17 %).

3.4.3. Mit o-Iodoxybenzoesäure (IBX)

0.41 g (1.5 mmol) IBX werden zu einer Lösung von 0.31 g (1 mmol) **2** in 5 ml DMSO gegeben. Nach 40 min wird die Lösung mit ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen werden mit H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird einer FC an Kieselgel 60 (Eluent: Cyclohexan/Me₂CO 2:1) unterzogen. Ausbeute: 0.06 g (21 %). Farblose Kristalle, Schmp. 205 °C (Me₂CO/Cyclohexan), 205–207 °C (Buz-zetti et al. 1993). ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 0.97 (s, 3 H, 18-H₃), 1.24 (s, 3 H, 19-H₃), 1.36–1.53 (m, 2 H, CH, CH₂), 1.58–1.69 (m, 2 H, CH, CH₂), 1.75–1.82 (m, 1 H, CH, CH₂), 1.97–2.04 (m, 3 H, CH, CH₂), 2.11–2.24 (m, 3 H, CH, CH₂), 2.49–2.56 (m, 1 H, CH₂), 2.78–2.84 (m, 1 H, CH₂), 6.32 (dd, ³J = 10.2 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 1 H, 2-H), 6.40 (t, ⁴J = 1.9 Hz, 1 H, 4-H), 7.09 (d, ³J = 10.2 Hz, 1 H, 1-H). ¹³C NMR (CDCl₃) + DEPT: δ (ppm) = 13.76 (C-18), 19.09 (C-19), 21.66 (CH₂), 22.11 (CH₂), 30.90 (CH₂), 33.99 (CH), 35.42 (CH₂), 44.55 (C), 45.54 (CH₂), 47.68 (C), 49.01 (CH), 51.12 (CH), 125.34 (C-2), 128.37 (C-4), 152.87 (C-1), 160.77 (C-5), 185.04 (C-3/C-6), 200.81 (C-6/C-3), 218.63 (C-17). MS (EI): m/z (%) = 298 [M]⁺ (20), 283 [M-CH₃]⁺ (3), 135 (100). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1730 (17-C=O), 1691 (6-C=O), 1661 (3-C=O), 1621 (C=C). HPLC (3): $t_s = 2.40$ min (97.8 %). C₁₉H₂₂O₃ (298.4)

3.5. 6a-Chlormethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion (5)

Zu einer Lösung von 0.31 g (1 mmol) **2** in 15 ml Toluol werden ein Tropfen Pyridin und 0.14 ml (2 mmol) Thionylchlorid gegeben. Es wird 15 min bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen der Lösung wird vorsichtig H₂O zugegeben, mit ges. Na₂CO₃-Lsg. neutralisiert und die beiden Phasen getrennt. Die organische Phase wird dreimal mit H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Die wässrige Phase wird mit dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Die Rückstände beider organischer Phasen werden einer FC an Kieselgel 60 (Eluent: Cyclohexan/Me₂CO 2:1) unterzogen. Ausbeute: 0.04 g (13 %). Farblose Kristalle, Schmp. 189 °C (Me₂CO/Cyclohexan). ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 0.96 (s, 3 H, 18-H₃), 1.09–1.17 (m, 1 H, CH), 1.29 (s, 3 H, 19-H₃), 1.61–1.74 (m, 3 H, CH, CH₂), 1.85–1.94 (m, 3 H, CH₂), 1.95–2.17 (m, 4 H, CH₂), 2.34–2.52 (m, 2 H, CH, CH₂), 2.74–2.82 (m, 1 H, CH, CH₂), 3.57 (dd, ²J = 11.0 Hz, ³J = 7.3 Hz, 1 H, CHH-Cl), 3.83 (dd, ²J = 11.0 Hz, ³J = 5.4 Hz, 1 H, CHH-Cl), 6.04 (t, ⁴J = 1.6 Hz, 1 H, 4-H), 6.27 (dd, ³J = 10.2 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1 H, 2-H), 7.07 (d, ³J = 10.2 Hz, 1 H, 1-H). MS (EI): m/z (%) = 332 [M]⁺ (27), 334 (9), 317 [M-CH₃]⁺ (3), 170 (100). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 1742 (17-C=O), 1659 (3-C=O), 1621 (C=C). Spezifische Drehung (1): $[\alpha]_D^{20} = +87.8$. UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 243 nm (4.17). HPLC (1): $t_s = 4.39$ min (98.3 %). C₂₀H₂₅ClO₂ (332.9)

3.6. 6-Methylen-androsta-1,4-dien-3,17-dion (6)

0.31 g (1 mmol) **2** werden in 30 ml Methanol gelöst und dann 0.6 ml konz. HCl zugesetzt. Nach 24 h Rühren bei RT wird mit ges. NaHCO₃-Lsg. neutralisiert und i. Vak. eingengt. Nach Zugabe von H₂O wird viermal mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit H₂O und Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösemittel i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird einer FC an Kieselgel 60 (Eluent: Cyclohexan/Me₂CO 2:1) unterzogen. Die Substanz wird als erste Fraktion eluiert. Ausbeute: 0.18 g (60 %). Farblose Kristalle, Schmp. 193 °C (Me₂CO/Cyclohexan), 192–195 °C (Wagner et al. 1987). ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 0.94 (s, 3 H, 18-H), 1.17 (s, 3 H, 19-H), 1.33 (m, 1 H, 12-H), 1.35 (m, 1 H, 9-H),

1.36 (m, 1 H, 14-H), 1.65 (m, 3 H, 11-HH, 11-HH, 15-HH), 1.88 (m, 1 H, 15-HH), 1.90 (m, 1 H, 12-HH), 1.93 (m, 1 H, 8-H), 1.94 (m, 1 H, 7-HH), 2.14 (m, 1 H, 16-HH), 2.49 (m, 1 H, 16-HH), 2.63 (m, 1 H, 7-HH), 5.00 (m ~ t, 1 H, 6 =CHH), 5.07 (m ~ t, 1 H, 6 =CHH), 6.17 (d, $^4J = 1.9$ Hz, 1 H, 4-H), 6.26 (dd, $^3J = 10.2$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, 1 H, 2-H), 7.07 (d, $^3J = 10.2$ Hz, 1 H, 1-H). NOE-Differenzspektrum: Gesättigte 1H -Signale (verstärkte 1H -Signale) = 5.00 (6 =CHH, 7-H), 5.07 (6 =CHH, 4-H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) + DEPT: δ (ppm) = 13.78 (C-18), 19.67 (C-19), 21.79 (C-11), 22.07 (C-15), 31.11 (C-12), 35.29 (C-8), 35.60 (C-16), 39.22 (C-7), 43.60 (C-10), 47.60 (C-13), 49.89 (C-9), 50.76 (C-14), 112.42 (6 =CH₂), 122.76 (C-4), 127.80 (C-2), 145.25 (C-6), 153.96 (C-1), 167.16 (C-5), 186.29 (C-3), 219.54 (C-17). Die Zuordnung der C- und H-Atome ist durch HSQC und HMBC gesichert! MS (EI): m/z (%) = 296 [M] $^{++}$ (10), 281 [$M-CH_3$] $^{++}$ (8), 148 (100). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1732 (17-C=O), 1657 (3-C=O), 1620 (C=C). Spezifische Drehung (2): $[\alpha]_D^{20} = +266.0$, $\alpha_D = +282.1$ (Longo und Lombardi 1989). UV (EtOH 96 %): λ_{max} (lg ϵ) = 246 nm (4.15), 273 (Schulter), 247 (4.14) (Longo und Lombardi 1989). HPLC (2): $t_R = 3.82$ min (98.5 %). $C_{20}H_{24}O_2$ (296.4)

3.7. 6a-Methoxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion (7)

Darstellung siehe 3.6. Die Substanz wird als zweite Fraktion eluiert. Ausbeute: 0.03 g (8 %). Farblose Kristalle, Schmp. 142 °C. 1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 0.94 (s, 3 H, 18-H₃), 1.07–1.17 (m, 1 H, CH), 1.28 (s, 3 H, 19-H₃), 1.56–1.73 (m, 3 H, CH, CH₂), 1.83–2.22 (m, 7 H, CH₂), 2.35–2.55 (m, 1 H, CH, CH₂), 2.68–2.75 (m, 1 H, CH, CH₂), 3.40 (s, 3 H, OCH₃), 3.45 (dd, $^2J = 9.1$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, 1 H, CHH–OCH₃), 3.64 (dd, $^2J = 9.1$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, 1 H, CHH–OCH₃), 3.77 (m, 1 H, CH, CH₂), 6.02 (t, $^4J = 1.7$ Hz, 1 H, 4-H), 6.26 (dd, $^3J = 10.2$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1 H, 2-H), 7.05 (d, $^3J = 10.2$ Hz, 1 H, 1-H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) + DEPT: δ (ppm) = 14.04 (C-18), 19.18 (C-19), 22.12 (CH₂), 22.44 (CH₂), 31.41 (CH₂), 34.99 (CH), 35.83 (CH₂), 36.27 (CH₂), 39.33 (CH), 43.75 (C), 47.88 (C), 50.89 (CH), 53.32 (CH), 59.33 (CH), 73.83 (CH₂–OCH₃), 122.11 (C-2), 127.49 (C-4), 156.02 (C-1), 167.88 (C-5), 186.10 (C-3), 219.94 (C-17). MS (EI): m/z (%) = 328 [M] $^{++}$ (68), 296 [$M-MeOH$] $^{++}$ (100). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1732 (17-C=O), 1663 (3-C=O), 1625 (C=C). Spezifische Drehung (1): $[\alpha]_D^{20} = +105.3$. UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 237 nm (4.01). HPLC (1): $t_R = 2.69$ min (97.6 %). $C_{21}H_{28}O_3$ (328.5)

3.8. Diethyl-2-(3,17-dioxoandrosta-1,4-dien-6 β -yl)-malonat (8)

0.092 g (4 mmol) Na werden in 15 ml EtOH gelöst und nacheinander mit 0.30 g (1 mmol) **6** und 0.64 g (4 mmol) Malonsäurediethylester versetzt. Die Lösung wird 7 h unter N₂ zum Rückfluss erhitzt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand in H₂O aufgenommen und mit 6 M-HCl angesäuert. Die wässrige Phase wird viermal mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit H₂O und Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert, und der Rückstand einer FC an Kieselgel 60 (Eluent: Petroläther/EtOAc 1:1) unterzogen. Ausbeute: 0.03 g (6 %). Gelbes Öl. 1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 0.94 (s, 3 H, 18-H₃), 1.05–1.15 (m, 1 H, CH), 1.24 (s, 3 H, 19-H₃), 1.28 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 6 H, O–CH₂–CH₃), 1.57–1.74 (m, 3 H, CH, CH₂), 1.81–2.16 (m, 9 H, CH₂), 2.27–2.34 (m, 1 H, CH, CH₂), 2.44–2.51 (m, 2 H, CH₂), 3.51 (dd, $^3J = 6.4$ Hz, $^3J = 8.6$ Hz, 1 H, 6 2 -H), 4.22 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 4 H, O–CH₂–CH₃), 6.12 (s, 1 H, 4-H), 6.27 (dd, $^3J = 10.2$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 1 H, 2-H), 7.08 (d, $^3J = 10.2$ Hz, 1 H, 1-H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) + DEPT: δ (ppm) = 13.74 (C-18), 13.98 (2 \times O–CH₂–CH₃), 18.48 (C-19), 21.75 (CH₂), 22.25 (CH₂), 30.24 (CH₂), 31.05 (CH₂), 35.18 (CH), 35.47 (CH₂), 36.58 (CH), 39.19 (CH₂), 43.73 (C), 47.58 (C), 49.31 (CH), 50.07 (CH), 53.93 (CH), 61.49 (CH₂), 61.53 (CH₂), 121.30 (C-2), 127.17 (C-4), 156.19 (C-1), 168.81 (COOEt), 168.85 (COOEt), 169.27 (C-5), 185.66 (C-3), 219.41 (C-17). MS (EI): m/z (%) = 456 [M] $^{++}$ (48), 248 [$M-H_2C=C(COOEt)_2$] $^{++}$ (100). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1736 (17-C=O, COOEt), 1661 (3-C=O), 1622 (C=C). UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 243 nm (4.11). HPLC (1): $t_R = 6.40$ min. $C_{27}H_{36}O_6$ (456.6)

3.9. 6a-(2-Nitroethyl)-androsta-1,4-dien-3,17-dion (9)

1,18 g (4 mmol) **6** werden in 20 ml EtOH gelöst. Anschließend wird eine Lösung aus 0.96 g (16 mmol) Nitromethan und 0.46 g (20 mmol) Na in 250 ml EtOH zugetropft und 22 h unter N₂ zum Rückfluss erhitzt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. wird der Rückstand in H₂O aufgenommen und mit 10%iger H₂SO₄ angesäuert. Die wässrige Phase wird viermal mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit H₂O und Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert, und der Rückstand einer FC an Kieselgel 60 (Eluent: Cyclohexan/Me₂CO 3:1) unterzogen. Ausbeute: 0.45 g (32 %). Gelbe Kristalle, Schmp. 191 °C (EtOH). 1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 0.95 (s, 3 H, 18-H₃), 1.07 (m, 1 H, CH), 1.27 (s, 3 H, 19-H₃), 1.57–1.74 (m, 4 H, CH, CH₂), 1.75–1.97 (m, 5 H, CH₂), 1.98–2.18 (m, 3 H, CH, CH₂), 2.38–2.57 (m,

3 H, CH, CH₂), 4.53 (m_c, 2 H, CH₂–NO₂), 6.05 (t, $^4J = 1.6$ Hz, 1 H, 4-H), 6.28 (dd, $^3J = 10.2$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1 H, 2-H), 7.08 (d, $^3J = 10.2$ Hz, 1 H, 1-H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) + DEPT: δ (ppm) = 13.78 (C-18), 18.65 (C-19), 21.80 (CH₂), 22.25 (CH₂), 28.91 (CH₂), 31.06 (CH₂), 35.10 (CH), 35.50 (CH₂), 35.93 (CH), 38.77 (CH₂), 43.85 (C), 47.64 (C), 50.06 (CH), 53.73 (CH), 73.21 (CH₂–NO₂), 121.37 (C-2), 127.19 (C-4), 156.13 (C-1), 168.03 (C-5), 185.51 (C-3), 219.35 (C-17). MS (EI): m/z (%) = 357 [M] $^{++}$ (29), 339 [$M-H_2O$] $^{++}$ (10), 232 (100). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1734 (17-C=O), 1660 (3-C=O), 1622 (C=C), 1554, 1377 (NO₂). Spezifische Drehung (1): $[\alpha]_D^{20} = +87.9$. UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 243 nm (4.18). HPLC (1): $t_R = 3.02$ min (99.1 %). $C_{21}H_{27}NO_4$ (357.4)

3.10. 6a-(2-Oxoethyl)-androsta-1,4-dien-3,17-dion (10)

0.36 g (1 mmol) **9** werden in 10 ml 0.5 M-methanolischer KOH gelöst. Nach 3 h Rühren bei RT wird der Ansatz langsam in eine eiskalte 3 M-H₂SO₄ eingetropft. Nach 4 h Rühren wird der Niederschlag abgesaugt, neutral gewaschen und über P₂O₅ getrocknet. Zur Erhöhung der Ausbeute wird die Mutterlauge viermal mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit H₂O und Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Dieser Rückstand sowie der Niederschlag werden einer FC an Kieselgel 60 (Eluent: Cyclohexan/Me₂CO 3:1) unterzogen. Ausbeute: 0.10 g (31 %). Farblose Kristalle, Schmp. 177 °C (EtOH). 1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 0.96 (s, 3 H, 18-H₃), 1.01–1.15 (m, 1 H, CH), 1.33 (s, 3 H, 19-H₃), 1.56–1.75 (m, 4 H, CH, CH₂), 1.84–1.97 (m, 5 H, CH, CH₂), 2.03–2.12 (m, 2 H, CH, CH₂), 2.52 (m_c, 2 H, CH, CH₂), 2.87 (dd, $^2J = 17.7$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, 1 H, CHH–CHO), 3.14 (m_c, 1 H, CHH–CHO), 5.96 (t, $^4J = 1.7$ Hz, 1 H, 4-H), 6.26 (dd, $^3J = 10.2$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 1 H, 2-H), 7.07 (d, $^3J = 10.2$ Hz, 1 H, 1-H), 9.87 (s, 1 H, CHO). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) + DEPT: δ (ppm) = 13.85 (C-18), 18.91 (C-19), 21.85 (CH₂), 22.24 (CH₂), 31.17 (CH₂), 33.39 (CH), 35.08 (CH), 35.57 (CH₂), 38.94 (CH₂), 43.94 (C), 45.84 (CH₂–CHO), 47.69 (C), 50.22 (CH), 53.35 (CH), 121.57 (C-2), 127.27 (C-4), 155.96 (C-1), 168.36 (C-5), 185.73 (C-3), 200.01 (CHO), 219.51 (C-17). MS (EI): m/z (%) = 326 [M] $^{++}$ (68), 311 [$M-CH_3$] $^{++}$ (10), 91 (100). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1730 (17-C=O), 1659 (3-C=O), 1720 (C=O, Aldehyd), 1620 (C=C). Spezifische Drehung (1): $[\alpha]_D^{20} = +113.7$. UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 243 nm (4.54). HPLC (1): $t_R = 1.90$ min (98.3 %). $C_{21}H_{26}O_3$ (326.4)

3.11. Dimethyl-4-[(3,17-dioxoandrosta-1,4-dien-6a-yl)methyl]-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-3,5-pyridindicarboxylat (11)

0.33 g (1 mmol) **10** werden in 5 ml AcOH gelöst, mit 0.29 g (2.5 mmol) β -Aminocrotonsäuremethylester versetzt und 2 h unter N₂ bei RT gerührt. Nun lässt man den Ansatz weitere 20 h bei 60 °C rühren. Die abgekühlte Lösung wird mit H₂O verdünnt und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Nach Waschen der vereinigten organischen Phasen mit H₂O und Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird einer FC an Kieselgel 60 (Eluent: Cyclohexan/Me₂CO 3:1) unterzogen. Ausbeute: 0.30 g (58 %). Hellgelbe Kristalle, Schmp. 156 °C (Me₂CO/Cyclohexan). 1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 0.76 (m, 1 H, 7-HH), 0.94 (s, 3 H, 18-H₃), 1.20 (s, 3 H, 19-H₃), 1.21–1.35 (m, 2 H, 6 1 -HH, 14-H), 1.59–1.99 (m, 6 H, 6 1 -HH, 8-H, 11-HH, 11-HH, 15-HH, 15-HH), 2.00–2.21 (m, 4 H, 16-HH, 7 1 -HH, CH, CH₂), 2.31 (s, 3 H, 2 1 /6 1 -CH₃), 2.33 (s, 3 H, 6 2 /2 1 -CH₃), 2.37–2.54 (m, 3 H, 6-H, 16-HH, CH, CH₂), 3.67 (s, 3 H, OCH₃), 3.82 (s, 3 H, OCH₃), 4.05 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 1 H, 4'-H), 6.14 (s, 1 H, NH), 6.24 (dd, $^3J = 10.1$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1 H, 2-H), 6.27 (m ~ t, 1 H, 4-H), 7.03 (d, $^3J = 10.1$ Hz, 1 H, 1-H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) + DEPT: δ (ppm) = 13.80 (C-18), 18.64 (C-19), 19.46 (6'-CH₃/2'-CH₃), 19.56 (2'-CH₃/6-CH₃), 22.01 (C-11/15), 22.34 (C-15/11), 30.26 (C-4'), 31.22 (C-12), 34.42 (C-6), 35.26 (C-8), 35.65 (C-16), 38.71 (C-6'), 39.87 (C-7), 43.78 (C-10), 47.69 (C-13), 50.33 (C-14), 51.13 (COOCH₃), 51.19 (COOCH₃), 53.56 (C-9), 102.95 (C-5'/C-3'), 103.36 (C-3'/C-5'), 121.59 (C-4), 127.26 (C-2), 145.36 (C-2'/C-6'), 145.86 (C-6'/C-2'), 156.19 (C-1), 168.14 (COOCH₃), 170.89 (C-5), 186.33 (C-3), 219.84 (C-17). Die Zuordnung der C- und H-Atome ist durch HSQC und HMBC gesichert! MS (ESI): m/z = 544 [$M + Na$] $^+$. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3334 (N–H), 1739 (17-C=O), 1696 (C=O, Ester), 1659 (3-C=O), 1616 (C=C). Spezifische Drehung (1): $[\alpha]_D^{20} = +145.0$. UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 235 nm (4.39), 343 (3.76). HPLC (1): $t_R = 4.46$ min (99.5 %). $C_{31}H_{39}NO_6$ (521.7)

3.12. Dimethyl-4-[(3,17-dioxoandrosta-1,4-dien-6a-yl)methyl]-2,6-dimethyl-3,5-pyridin-dicarboxylat (12)

0.10 g (0.2 mmol) **11** werden in 4 ml Me₂CO gelöst. Unter Rühren werden 0.44 g (0.8 mmol) CAN, gelöst in 4 ml H₂O, zugetropft. Nach 30 min wird i. Vak. eingeengt, noch etwas H₂O zugegeben und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Nach Waschen der vereinigten organischen Phasen mit H₂O und Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Ausbeute: 0.09 g (87 %). Gelbes Öl. 1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) = 0.67–0.83 (m, 1 H, CH,

CH₂), 0.89 (s, 3 H, 18-H₃), 0.93–1.21 (m, 1 H, CH), 1.22 (s, 3 H, 19-H₃), 1.24–2.52 (m, 11 H, CH, CH₂), 2.54 (s, 6 H, 2'-CH₃, 6'-CH₃), 2.57–2.85 (m, 2 H, CH₂), 3.13 (m, 1 H, 6¹-HH), 3.90 (s, 6 H, OCH₃), 6.12 (s, 1 H, 4-H), 6.27 (dd, ³J = 10.2 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1 H, 2-H), 7.09 (d, ³J = 10.2 Hz, 1 H, 1-H). ¹³C NMR (CDCl₃) + DEPT: δ (ppm) = 13.60 (C-18), 18.53 (C-19), 21.50 (CH₂), 22.01 (CH₂), 22.84 (CH₃), 30.93 (CH₂), 32.68 (CH₂), 34.69 (CH), 35.36 (CH₂), 37.56 (CH₂), 39.41 (CH), 43.70 (C), 47.38 (C), 50.18 (CH), 52.41 (OCH₃), 53.28 (CH), 120.90 (C-4), 126.93 (C-2), 127.36 (C-5'/C-3'), 127.86 (C-3'/C-5'), 144.14 (C-4'), 155.45 (C-2'/C-6'), 155.88 (C-1), 168.48 (COOCH₃), 169.65 (C-5), 185.58 (C-3), 219.42 (C-17). MS (EI): m/z (%) = 519 [M]⁺⁺ (29), 224 (100). IR (KBr): ν̄ (cm⁻¹) = 1731 (17-C=O), 1662 (C=O, Ester, 3-C=O), 1623 (C=C). Spezifische Drehung (1): [α]_D²⁰ = +224.4. UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 239 nm (4.18). HPLC (1): t_s = 2.22 min. C₃₁H₃₇NO₆ (519.6)

3.13. Aromatasehemmung

Aus frischem menschlichen Plazentagewebe wurde die Aromatase als Mikrosomenpräparation gewonnen (Thompson und Siiteri 1974; Hartmann und Batzl 1986) und bei –70 °C aufbewahrt. Die Hemmaktivitäten der Verbindungen wurden *in vitro* nach Thompson und Siiteri (1974), modifiziert nach Hartmann und Batzl (1986), bestimmt. Die Enzymaktivität wurde durch Messung der ³H₂O-Bildung während der Aromatisierung von 1β-³H-Androstendion (15–30 Ci/mmol, Perkin Elmer, NEN, Boston, MA) verfolgt. Jedes Inkubationsröhrchen enthielt 0,025 µCi an markiertem Substrat, 0,5 µmol unmarkiertes Substrat, 0,5 mmol NADPH, 10 mmol Glucose-6-Phosphat, 1U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Hemmstoff (0–250 µM in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,4)). Die Testverbindungen wurden in Ethanol gelöst und mit Puffer verdünnt. Die Endkonzentration an Ethanol betrug 2 %.

⁴ Bei der Reaktion von Exemestan (**6**) mit Natriumcyanid in Ethanol/Wasser wurden vier Substanzen neben Edukt detektiert.

Literatur

- Borsche W, Hahn H (1939) Über vielkernige kondensierte Systeme mit heterocyclischen Ringen. IV. Justus Liebigs Ann Chem 537: 219–245.
- Buzzetti F, Salle ED, Longo A, Briatico G (1993) Synthesis and aromatase inhibition by potential metabolites of exemestane (6-methylenandrosta-1,4-diene-3,17-dione). Steroids 58: 527–532.
- Cole PA, Robinson CH (1990) Mechanism and Inhibition of Cytochrome P-450 Aromatase. J Med Chem 33: 2933–2942.
- Hartmann RW, Batzl C (1986) Aromatase inhibitors. Synthesis and evaluation of mammary tumor inhibiting activity of 3-alkylated 3-(4-aminophenyl)piperidine-2,6-diones. J Med Chem 29: 1362–1369.
- Longo A, Lombardi P (1989) Process for preparation of methylene derivatives of androsta-1,4-diene-3,17-dione, EP 307134. Chem Abstr 111: 134643f.
- Longo A, Lombardi P (1989) Process for preparation of methylene derivatives of androsta-1,4-diene-3,17-one. EP 307134. Chem Abstr 111: 136643f.
- Niknam K, Zolfigol MA, Razavian SM, Mohammadpoor-Baltork I (2005) Molybdatophosphoric acid/NaNO₂/wet SiO₂ as an efficient system for oxidation of 1,4-dihydropyridines under mild and heterogeneous conditions. Heterocycles 65: 657–660.
- Pfister JR (1990) Rapid, high-yield oxidation of Hantzsch-type 1,4-dihydropyridines with ceric ammonium nitrate. Synthesis: 689–690.
- Schneider F, Bolter A, Müller M, Müller P, Fürst A (1973) Über den Verlauf der Umsetzung von Steroid-3,5-dienaminen mit Formaldehyd. Helv Chim Acta 56: 2396–2404.
- Thompson EA, Siiteri PK (1974) Utilization of oxygen and reduced NADP by human placental microsomes during aromatization of androstendione. J Biol Chem 249: 5364–5372.
- Wagner H, Ponsold K (1986) Verfahren zur Herstellung von 6β-Hydroxymethylandrosta-1,4-dien-3,17-dion, DD 258820. Chem Abstr 111: 7672q (1989).
- Wagner H, Ponsold K, Schumann G (1987) Verfahren zur Herstellung von 6-Methylandrosta-1,4-dien-3,17-dion, DD 264220. Chem Abstr 111: 78501v (1989).