

EUR 2450.d

EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT - EURATOM

DARSTELLUNG VON 6-AZACHOLESTERIN

MIT C¹⁴ AN C-4 ODER C-26

von

H. LETTRE

(Universität Heidelberg)

1965



Bericht abgefasst vom
Institut für Experimentelle Krebsforschung
der Universität Heidelberg, Deutschland

Euratom-Vertrag Nr. 027-63-2 RISD

HINWEIS

Das vorliegende Dokument ist im Rahmen des Forschungsprogramms der Kommission der Europäischen Atomgemeinschaft (EURATOM) ausgearbeitet worden.

Es wird darauf hingewiesen, dass die Euratomkommission, ihre Vertragspartner und alle in deren Namen handelnden Personen :

- 1° — keine Gewähr dafür übernehmen, dass die in diesem Dokument enthaltenen Informationen richtig und vollständig sind oder dass die Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden und Verfahren nicht gegen gewerbliche Schutzrechte verstößt;
- 2° — keine Haftung für die Schäden übernehmen, die infolge der Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden oder Verfahren entstehen könnten.

Dieser Bericht wird zum Preise von 25.— bfrs. verkauft.
Bestellungen sind zu richten an : PRESSES ACADEMIQUES
EUROPEENNES - 98, chaussée de Charleroi, Brüssel 6.

Die Zahlung ist zu leisten durch Ueberweisung an die :

— BANQUE DE LA SOCIETE GENERALE (Agence Ma
Campagne) - Brüssel - Konto Nr. 964.558;

— BELGIAN AMERICAN BANK and TRUST COMPANY -
New York - Konto Nr. 22.186;

— LLOYDS BANK (Europe) Ltd. - 10 Moorgate, London E.C.2,
als Bezug ist anzugeben : «EUR 2450.d - DARSTELLUNG VON
6-AZACHOLESTERIN MIT C₁₄ AN C-4 ODER C-26».

Gedruckt von SMEETS s.p.r.l.
Brüssel, August 1965.

Das vorliegende Dokument wurde an Hand des besten Abdruckes
vervielfältigt, der zur Verfügung stand.

EUR 2450.d

DARSTELLUNG VON 6-AZACHOLESTERIN MIT C¹⁴ AN C-4
ODER C-26 von H. LETTRE (Universität Heidelberg)

Europäische Atomgemeinschaft - EURATOM

Bericht abgefasst vom Institut für Experimentelle Krebsforschung der
Universität Heidelberg (Deutschland)

Euratom-Vertrag Nr. 027-65-2 RISD

Brüssel, August 1965 - 10 Seiten

Die Methode zur Herstellung von 6-Azacholesterin aus Cholesterin wurde überarbeitet. Es wurde eine neue Methode zur Herstellung des Zwischenproduktes der 5 β -Acetoxy-5,6-seco-cholestan-5-on-6-säure II gefunden. Unter Verwendung von an C-4 mit C¹⁴ markiertem Cholesterin

EUR 2450.d

PRODUCTION OF 6-AZACHOLESTERIN LABELLED WITH C¹⁴
IN THE C-4 OR C-26 POSITION

by H. LETTRE

(Universität Heidelberg)

European Atomic Energy Community - EURATOM

Report prepared at the Institut für Experimentelle Krebsforschung der
Universität Heidelberg (Germany)

Euratom Contract No. 027-65-2 RISD

Brussels, August 1965 - 10 pages

The method for the production of 6-azacholesterin from cholesterin was revised. A new route was found for the preparation of the intermediate product 5 β -acetoxy-5,6-seco-cholestane-5-one acid II. With the use of cholesterin labelled with C¹⁴ in the C-4 position, the required labelled

EUR 2450.d

PRODUCTION OF 6-AZACHOLESTERIN LABELLED WITH C¹⁴
IN THE C-4 OR C-26 POSITION

by H. LETTRE

(Universität Heidelberg)

European Atomic Energy Community - EURATOM

Report prepared at the Institut für Experimentelle Krebsforschung der
Universität Heidelberg (Germany)

Euratom Contract No. 027-65-2 RISD

Brussels, August 1965 - 10 pages

The method for the production of 6-azacholesterin from cholesterin was revised. A new route was found for the preparation of the intermediate product 5 β -acetoxy-5,6-seco-cholestane-5-one acid II. With the use of cholesterin labelled with C¹⁴ in the C-4 position, the required labelled

EUR 2450.d

PRODUCTION OF 6-AZACHOLESTERIN LABELLED WITH C¹⁴
IN THE C-4 OR C-26 POSITION

by H. LETTRE

(Universität Heidelberg)

European Atomic Energy Community - EURATOM

Report prepared at the Institut für Experimentelle Krebsforschung der
Universität Heidelberg (Germany)

Euratom Contract No. 027-65-2 RISD

Brussels, August 1965 - 10 pages

The method for the production of 6-azacholesterin from cholesterin was revised. A new route was found for the preparation of the intermediate product 5 β -acetoxy-5,6-seco-cholestane-5-one acid II. With the use of cholesterin labelled with C¹⁴ in the C-4 position, the required labelled

wurde nur mit Schwierigkeit das gewünschte markierte 6-Azacholesterin erhalten. Die Herstellung des an C-26 mit C¹⁴ markierten 6-Azacholesterins gelang ohne Besonderheiten. Weiterhin wurden tritiiertes 6-Azacholesterin, 5,6-Seco-cholestan-3 β , 5 α , 6-triol und 5,6-Seco-sitostan-3 β , 5 α , 6-triol hergestellt. Die Verbindungen wurden zum Teil auf ihre Wirkung auf tierische Zellen, auf pflanzliche Zellen und auf ihre Verteilung im Tierkörper hin untersucht. Neuaufgetretene radiochemische Probleme sollen noch geklärt werden.

6-azacholesterin could only be obtained with difficulty. No trouble was encountered in the production of 6-azacholesterin labelled with C¹⁴ in the C-26 position. Other substances produced were tritiated 6-azacholesterin, 5,6-seco-cholestane-3 β , 5 α , 6-triol and 5,6-seco-sitostane-3 β , 5 α , 6-triol. Some of the compounds were tested in order to ascertain their effect on animal and plant cells and their distribution in the animal organism. Some radiochemical problems not previously encountered have still to be clarified.

6-azacholesterin could only be obtained with difficulty. No trouble was encountered in the production of 6-azacholesterin labelled with C¹⁴ in the C-26 position. Other substances produced were tritiated 6-azacholesterin, 5,6-seco-cholestane-3 β , 5 α , 6-triol and 5,6-seco-sitostane-3 β , 5 α , 6-triol. Some of the compounds were tested in order to ascertain their effect on animal and plant cells and their distribution in the animal organism. Some radiochemical problems not previously encountered have still to be clarified.

6-azacholesterin could only be obtained with difficulty. No trouble was encountered in the production of 6-azacholesterin labelled with C¹⁴ in the C-26 position. Other substances produced were tritiated 6-azacholesterin, 5,6-seco-cholestane-3 β , 5 α , 6-triol and 5,6-seco-sitostane-3 β , 5 α , 6-triol. Some of the compounds were tested in order to ascertain their effect on animal and plant cells and their distribution in the animal organism. Some radiochemical problems not previously encountered have still to be clarified.

EUR 2450.d

EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT - EURATOM

**DARSTELLUNG VON 6-AZACHOLESTERIN
MIT C¹⁴ AN C-4 ODER C-26**

von

H. LETTRE

(Universität Heidelberg)

1965



Bericht abgefasst vom
Institut für Experimentelle Krebsforschung
der Universität Heidelberg, Deutschland

Euratom-Vertrag Nr. 027-63-2 RISD

DARSTELLUNG VON 6-AZACHOLESTERIN MIT C¹⁴ AN
C-4 ODER C-26 (+)

Ziel des Forschungsvorhabens war die Darstellung von 6-Azacholesterin mit C¹⁴ an C-4 oder C-26. Die Darstellung der unmarkierten Verbindung erfolgt über die folgenden Stufen (H. Lettré und L. Knof, Chemische Berichte 93, 2860 (1960)):

1. Cholesterinacetat I wird in die 3 β -Acetoxy-5,6-seco-cholestan-5-on-6-säure II übergeführt.
2. II wird über das Säurechlorid und Säureazid in das Isocyanat III übergeführt.
3. III geht durch katalytische Hydrierung (möglicherweise über IV) in 3 β -Acetoxy-6-aza-cholestan V über.
4. V geht nach Einwirkung von unterchloriger Säure und anschließender Behandlung mit alkoholischer Kalilauge in 6-Azacholesterin (VI) über.

Mit Einschluss der Acetylierung des Cholesterins haben wir eine 7-stufige Reaktionsfolge vorliegen. Die Acetylierung kann als praktisch quantitativ angesehen werden. Wenn aber die folgenden Stufen nur je mit 50% Ausbeute verlaufen, so bleibt für das Endprodukt nur eine Ausbeute von 1,3% bezogen auf das Ausgangsmaterial. Es liegt auf der Hand, dass es notwendig war, zunächst mit nicht markiertem Material die einzelnen Stufen sorgfältig auszuarbeiten und nach Methoden zu suchen, welche die Darstellung der Zwischenprodukte ausbeutenmässig und hinsichtlich der erforderlichen Zeit der Darstellung verbessern. Bei Arbeiten mit markierten Verbindungen erscheint gerade der letztgenannte Punkt wesentlich, da durch die strahlenwirkung bedingte Nebenreaktionen nicht vorauszusehen sind und die Ausbeute beeinträchtigen können.

Verbesserung der Darstellung der 3 β -Acetoxy-5,6-seco-cholestan-5-on-6-säure (II)

Die Einwirkung von Ozon auf Cholesterinacetat wurde früher von uns eingehend untersucht (H. Lettré und A. Jahn, Liebigs Annalen der Chemie 608, 43 (1957)). In alkoholfreien Lösungsmitteln entstehen amorphe Produkte wechselnder Zusammensetzung.

(+)Manuskript erhalten am 12. März 1965.

Bei Gegenwart von Alkohol entstehen kristallisierte Produkte definierter Zusammensetzung, welche pro Mol Cholesterinacetat 1 Mol Ozon und 1 Mol Alkohol enthalten. Die Reaktion kann so formuliert werden, dass als Zwischenprodukt ein Zwitterion der Formel VII entsteht, das in eine cyclische Form VIII übergehen kann, an die sich Alkohol zu IX addiert. Das chemische Verhalten von IX steht mit dieser Formulierung in Übereinstimmung.

Wir haben nun untersucht, ob eine ähnliche Addition von Aminen möglich ist. Eine Ozonisierung bei Gegenwart von Aminen ist nicht durchführbar, da diese unter diesen Bedingungen oxidiert werden. Fügt man nach der Ozonisierung in alkoholfreiem Medium zu dem Reaktionsprodukt ein Amin wie Dimethylamin, so reduziert dieses VII zu dem Aldehyd, der unter Aufnahme eines zweiten Moleküls Dimethylamin in X übergeht. Die meisten primären und sekundären Amine verhalten sich gleichartig, wenn auch nicht in allen Fällen definierte Endprodukte gefasst werden konnten. Eine Ausnahme von allen bisher untersuchten Aminen macht das Piperidin. Bei dessen Zusatz scheidet sich ein kristallines Produkt aus, das sich als das Piperidinsalz der Ketosäure II erwies. Es hat also eine Umlagerung des Ozonids VII in die isomere Ketosäure II stattgefunden. Diese Wirkung ist für Piperidin spezifisch. N-Methylpiperidin beispielsweise zeigt keine umlagernde Wirkung. Vermutlich verläuft die Umlagerung so, dass Piperidin ein Proton vom Stickstoff an die peroxydische Gruppe in VII abgibt und das Proton von C-6 aufnimmt.

Die Reaktion verläuft ausreichend rasch, so dass in einem Arbeitstag die Ketosäure II aus Cholesterinacetat hergestellt werden kann. Demgegenüber erfordert die Herstellung von II aus Cholesterinacetat durch Oxydation mit Chromsäure 3 bis 4 Wochen bei verlustreicher fraktionierter Kristallisation. Auch die Ausbeute ist besser: aus 5 g Cholesterinacetat werden 3,1 g Piperidinsalz und hieraus 2,2 g Ketosäure erhalten.

Die Methode wurde von Herrn Dipl.-Chem. K. Mathes bearbeitet und wird in dessen Dissertation 1965 beschrieben werden. Sie wurde inzwischen hier von Herrn Dr. W. Mehrhof und Herrn A. Egle mehrfach reproduziert. Die Methode stellt einen Fortschritt in der Herstellung der Ketosäure II dar. Ich glaube jedoch, dass das Anwendungsgebiet zu klein ist, um eine Patentierung zu rechtfertigen. Ich möchte um Ihr Einverständnis bitten, die Methode zu gegebener Zeit veröffentlichen zu dürfen.

Die Überführung der Ketosäure II in das Säurechlorid verläuft glatt mit Thionylchlorid oder Phosphorpentachlorid. Um das Säurechlorid rein zu erhalten, ist es erforderlich, von reiner Ketosäure auszugehen. Da das Säureazid nicht isoliert wird und das aus ihm entstehende Isocyanat nur kristallin erhalten wird, wenn man von reinem Säurechlorid ausgeht, ist hier eine Stufe, die wesentlich für das Gelingen der Gesamtreaktion ist. Bei den Umsetzungen der markierten Verbindungen müssen an dieser Stelle Verluste durch Reinigung in Kauf genommen werden.

Für die Überführung des Azids in das Isocyanat wurde früher Dimethylformamid als Lösungsmittel verwendet. Als besser erwies sich das Erhitzen des gut getrockneten Isocyanats in absolutem Toluol bei Wasserbadtemperatur. Zur Kristallisation des Isocyanats erwies sich Hexan als Lösungsmittel vorteilhafter als das früher verwendete Dimethylformamid.

Die folgenden Reaktionen, Hydrierung, Halogenierung und Abspaltung von Halogenwasserstoff und hydrolytische Abspaltung der Acetylgruppe wurde wie früher durchgeführt

Darstellung von 4-C¹⁴-6-Azacholesterin

1 mC C-4-C¹⁴-Cholesterin, bezogen von dem Radiochemical Centre Amersham, wurde mit 5 g nicht markiertem Cholesterin gemischt und das Gemisch acetyliert. Hieraus wurden 2,1 g Ketosäure II erhalten. Das Säurechlorid kristallisierte nicht. Nach dem Infrarotspektrum enthält es etwa 25% des Säurechlorids der 5,6-Seco- Δ^3 -cholesten-5-on-6-säure, die durch Abspaltung von Essigsäure aus II entsteht. Die Ursache für das Verhalten des 4-C¹⁴-Derivats ist unbekannt; bei dem 26-C¹⁴-Derivat trat diese Abspaltung nicht ein. Da von nicht kristallinem Säurechlorid ausgegangen werden musste, konnte das Isocyanat auch nicht kristallin erhalten werden. Das Endprodukt konnte kristallin erhalten werden. Ausbeute 80 mg vom Schmp. 148°, 1,55 % des Ausgangsmaterials.

Die Versuche wurden mehrfach wiederholt, jedoch konnten keine günstigeren Ergebnisse erzielt werden.

Darstellung von 26-C¹⁴-6-Azacholesterin

Bei der Verwendung von 26-C¹⁴-Cholesterin, 1 mC gemischt mit 5 g unmarkiertem Cholesterin, konnten alle Zwischenstufen in

kristalliner Form erhalten werden. Das Endprodukt wurde in einer Menge von 100 mg vom Schmp. 155 - 160° erhalten. 1,94% des Ausgangsmaterials.

Verwendung von 7 α (T)-Cholesterin

Das in 7-Stellung tritiierte Cholesterin wird von dem Radiochemical Centre Amersham hergestellt. Für die Klärung des Reaktionsmechanismus der Umlagerung des Ozonids VII in die Keto-säure II wäre es von Interesse festzulegen, dass die Protonen an C-7 hieran nicht beteiligt sind. Die Versuche mit der Verbindung sind noch nicht durchgeführt worden, werden aber in nächster Zeit begonnen werden.

Tritiierung von 6-Azacholesterin

Nichtmarkiertes 6-Azacholesterin wurde zur Tritiierung nach der Wilzbach-Methode nach Amersham gegeben. Das zurückgehaltene Produkt war stark zersetzt und es konnten nur etwa 10% 6-Azacholesterin hieraus zurückgewonnen werden. Es erscheint zweckmäßiger für die Darstellung tritiierten 6-Azacholesterins von tritiiertem Cholesterin auszugehen.

Das nach der Wilzbach-Methode erhaltene Produkt wurde für die unten erwähnten Versuche über die Verteilung des 6-Azacholesterins im Tierkörper verwendet.

5,6-Seco-cholestan-3 β ,5 α ,6-triol

Das Triol zeigt an Zellen in der Gewebekultur eine cytotoxische Wirkung. Es wurde bisher nicht mit C¹⁴ markiert hergestellt, sondern nur in tritiiertem Form, wobei von tritiiertem Cholesterin ausgegangen wurde. Es wurde zur autoradiographischen Analyse seiner Löslichkeit und Verteilung verwendet (vgl. H. Lettré, Euratom-Bulletin 1962 H.4, 20-24).

5,6-Seco-sitostan-3 β ,5 α ,6-triol

In früheren Untersuchungen (H.Lettré und D. Hotz, Liebigs Annalen der Chemie 620, 63 (1959)) wurde gefunden, dass das aus dem pflanzlichen Sterin Sitosterin hergestellte Triol keine Wirkung auf tierische Zellen in vitro hat. Herr Dip.-Chem.

P. Beheim hat in den Experimenten für seine Doktorarbeit, die er gerade schreibt, weitere Analoge, z.B. das 6-Aza-sitosterin, hergestellt. Das Triol aus Sitosterin zeigte in mehreren Versuchen eine Beschleunigung der Keimung von Samen. Es wurde als tritiierte Verbindung hergestellt. Unmarkiertes Triol wurde zur Tritiierung nach der Wilzbach-Methode nach Amersham gegeben. Das zurückerhaltene Präparat war stark zersetzt und es konnte aus dem Reaktionsprodukt kein reines Triol isoliert werden. Daher wurde Sitosterin nach Wilzbach tritiiert und hieraus das Triol hergestellt. Das Produkt wurde in Äthanol-Wasser stabilisiert.

Herr Beheim hat es zur Bestimmung der Löslichkeit des Triols in Wasser verwendet. Nach der Messung der Aktivität einer gesättigten Lösung beträgt sie 4.7 mg/liter.

Bei der Prüfung der Verteilung der Verbindung in Pflanzen traten unerwartete Komplikationen auf, als die Aktivität im Flüssigkeits-Scintillationszähler gemessen wurde. Das pflanzliche Material wurde mit Äthanol extrahiert und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Nach Zugabe der Scintillationslösung wurde eine hohe Impulszahl gemessen, die rasch (in ca. 30 Minuten) abklang. Dieser Effekt wurde auch mit nicht vorbehandelten Kontrollpflanzen erhalten; die Lichteinwirkung spielt hierbei eine Rolle. Andererseits bewirken die Extraktstoffe aus den Pflanzen einen starken Löscheffekt. Zu den Extrakten hinzugefügte Radioaktivität wurde völlig verdeckt und konnte nicht gemessen werden. Aus diesem Grunde war eine eindeutige Aussage über die Aufnahme durch und Verteilung in Pflanzen für das Triol noch nicht möglich. Es ist notwendig, mit diesem Material mit dem Geiger-Zähler zu messen.

Weiter hat Herr Beheim eine Methode entwickelt, um die Phosphorsäureester des vorgenannten Triols herzustellen. Hierdurch ist es möglich, das Natriumsalz herzustellen, das in Wasser leicht löslich ist. Diese Methode lässt sich auch auf das analoge Cholesterinderivat übertragen.

Versuche über die Verteilung von 6-Azacholesterin im Tierkörper

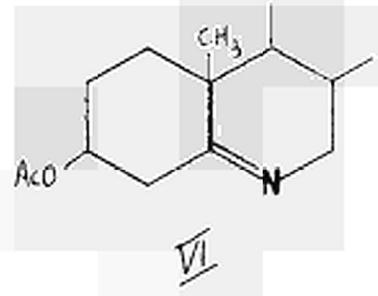
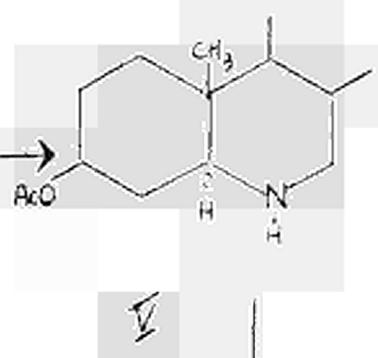
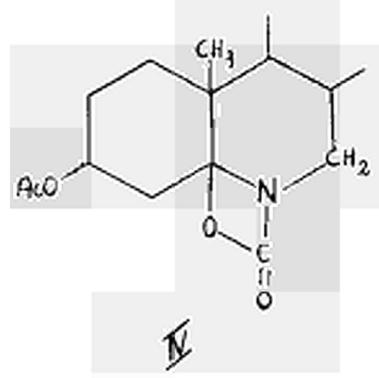
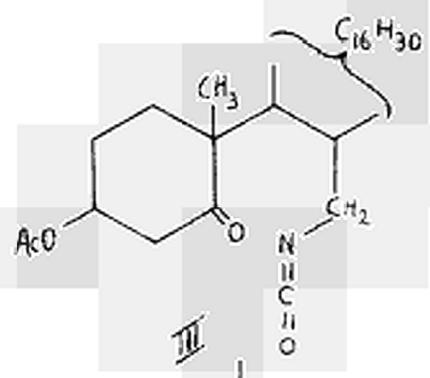
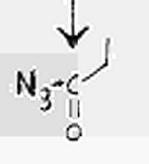
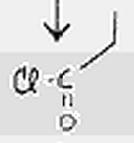
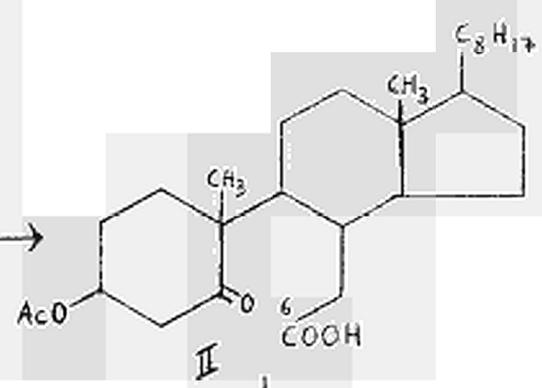
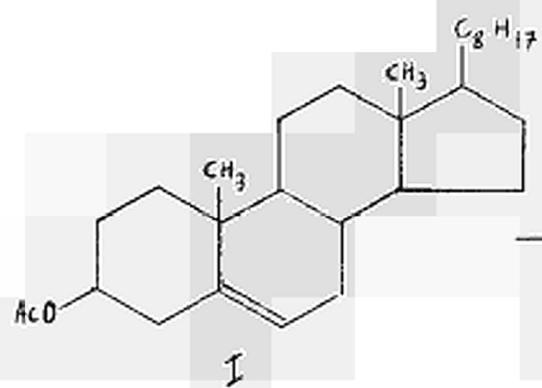
Das oben erwähnte tritiierte 6-Azacholesterin wurde Ratten verschiedenen Alters intraperitoneal injiziert. In verschiedenen Zeitabständen wurden Versuchstiere getötet und verschiedene Organe

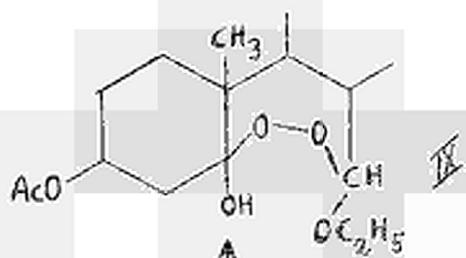
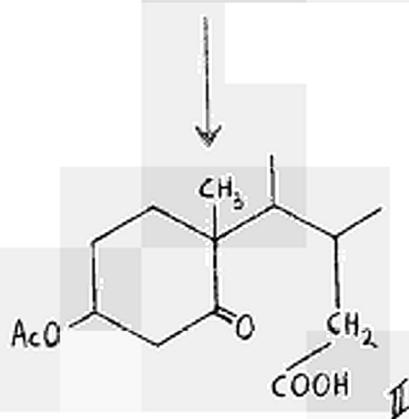
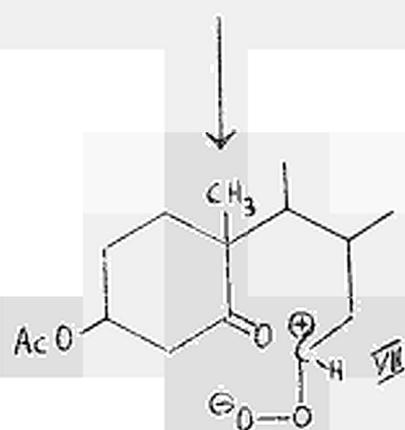
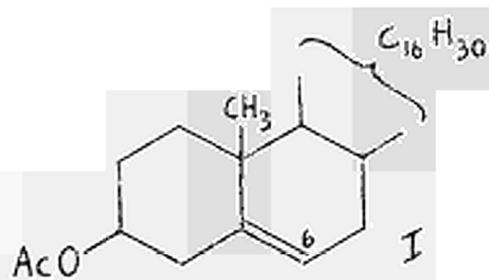
entnommen. Aus der Bestimmung der Aktivität ergab sich, dass der Hauptausscheidungsweg über die Leber geht. Im Gehirn fand sich die Verbindung nicht. Diese Resultate wurden auch durch autoradiographische Untersuchung der verschiedenen Gewebe bestätigt.

Trüchtige Ratten erhielten durch intraperitoneale Injektionen tritiiertes 6-Azacholesterin. In den Embryonen oder den ausgetragenen Jungen war keine Radioaktivität in nachweisbarer Menge vorhanden. Diese Untersuchungen sind in der Dissertation von Herrn Harry Phillips enthalten, die dieser gerade zusammenstellt. Untersuchungen über die Verteilung der Verbindung zwischen einem Tumor und dem Wirtsorganismus sollen mit den mit C^{14} markierten 6-Azacholesterinen durchgeführt werden.

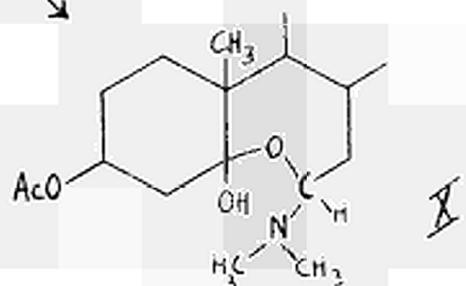
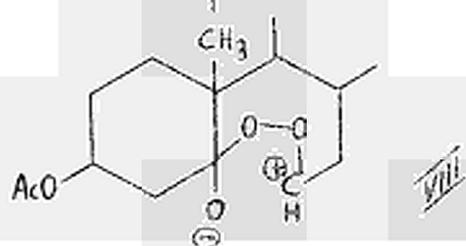
Insgesamt konnten von der chemischen Seite her die gestellten Probleme gelöst werden. Es erscheint vom radiochemischen Standpunkt aus von Interesse zu klären, warum das an C-4 markierte Cholesterin anders reagiert als unmarkiertes Cholesterin oder das an C-26 markierte Produkt. Diese offenen Fragen sollen mit den noch vorhandenen markierten Ausgangsstoffen noch geklärt werden.

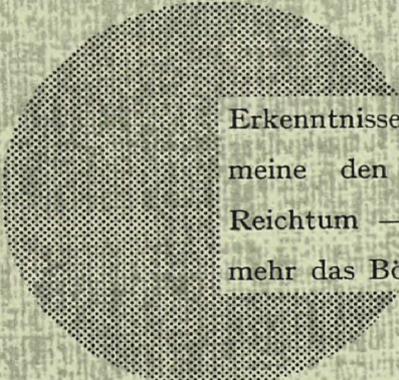
Es ist beabsichtigt, die experimentellen Einzelheiten in dem Journal of Labelled Compounds zu veröffentlichen.





+ C_2H_5OH





Erkenntnisse verbreiten ist soviel wie Wohlstand verbreiten — ich meine den allgemeinen Wohlstand, nicht den individuellen Reichtum — denn mit dem Wohlstand verschwindet mehr und mehr das Böse, das uns aus dunkler Zeit vererbt ist.

Alfred Nobel

CDNA02450DEC

EURATOM – C.I.D.
51 - 53, rue Belliard
Bruxelles (Belgique)