

**231. Der Metabolismus des Retinoids Ro 10-9359.
Isolierung und Identifizierung der Hauptmetaboliten aus Plasma, Urin
und Faeces des Menschen sowie aus der Galle der Ratte
Synthese von drei Urinmetaboliten**

von Ralph Hänni¹⁾, Felix Bigler†, Walter Vetter, Gerhard Englert und Peter Loeliger
Forschungsabteilung der *F. Hoffmann-La Roche & Co., AG.*, CH-4002 Basel

(26. VII. 77)

**The Metabolism of the Retinoid Ro 10-9359.
Isolation and Identification of the Major Metabolites in Human Plasma, Urine and Feces
Synthesis of Three Urinary Metabolites**

Summary

After oral administration of therapeutic doses of the ³H-labelled aromatic retinoic acid analog (retinoid) Ro 10-9359 (ethyl all-*trans*-9-(4-methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonatetraenoate) to humans 75 and 15% of the ³H-dose were excreted within the first five days in the feces and the urine, respectively. Using chromatographic procedures including high pressure liquid chromatography 18 metabolites could be isolated from human urine. Their structures were elucidated by mass spectrometry and FT-¹H-NMR. spectroscopy. In these urinary metabolites the tetraene side chain of the parent compound Ro 10-9359 is shortened. The radioactivity of the identified urinary metabolites accounted for about 11% of the dose. Three urinary metabolites were synthesized. The main part of the radioactivity excreted within the first five days in the feces consisted of unchanged drug (60% of the dose). A smaller (amount 15% of the dose) could not be identified. The unchanged drug and a major metabolite, the corresponding acid, were found in human plasma.

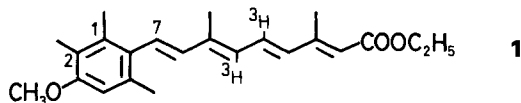
In an experiment with bile-duct cannulated rats the radioactively labelled retinoid Ro 10-9359 was injected intravenously. About 70% of the ³H-dose was excreted in the bile, within the first 48 hours. The whole radioactivity of the rat bile consisted of polar metabolites. No unchanged drug could be found. After enzymatic hydrolysis of the bile conjugates three metabolites were isolated. The main metabolite (49% of the *i.v.* dose) was a conjugate of the corresponding acid of the parent drug, already found as free compound in human plasma. The other bile metabolites (9 and 7% of the *i.v.* dose) had an intact side chain, too.

An enterohepatic recycling of the bile metabolites was observed in the rat.

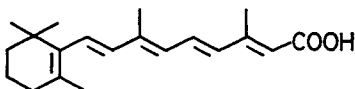
¹⁾ Autor, an welchen Korrespondenz zu richten ist.

1. Einleitung. – Ro 10-9359, all-*trans*-9(4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonatetraensäureäthylester²⁾ (*Schema 1*) ist ein aromatisches Analoges der Retinsäure (Vitamin-A-Säure, *Schema 2*). Dieses sogenannte Retinoid weist die gleiche Nonatetraen-Seitenkette auf wie Retinsäure, unterscheidet sich aber von dieser durch den aromatischen Ring.

Schema 1. Ro 10-9359



Schema 2. Retinsäure



Ro 10-9359 ist bei der Maus sowohl therapeutisch als auch prophylaktisch bei benignen und malignen epithelialen Tumoren der Haut wirksam [1] [2]. Ausserdem sind mit diesem Präparat Therapieerfolge bei Patienten mit Psoriasis, Keratosen und Präkanzerosen erzielt worden [3–5].

Nachdem bei der Ratte die Strukturen mehrerer Metaboliten von Retinsäure aufgekärt werden konnten [6] [7], stellte sich die Frage, ob nach Verabreichung des aromatischen Retinoids Ro 10-9359 analoge Biotransformationsprodukte auftreten.

Zu diesem Zweck wurden beim Menschen nach peroraler Gabe des mit Tritium markierten Präparates Plasma, Urin und Faeces auf Metaboliten untersucht. Menschliche Galle stand für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

Verschiedene Autoren haben gezeigt, dass Retinsäure bei der Ratte enterohepatisch recycelt wird [8–10]. Deshalb wurde bei der Ratte, nach intravenöser Injektion des Retinoids, die Galle untersucht, um zu sehen, ob dies für Ro 10-9359 auch zutrifft.

2. Experimentelles – Alle experimentellen Arbeiten mit dem Retinoid Ro 10-9359 oder mit seinen Metaboliten wurden wegen der Lichtempfindlichkeit der Substanzen in abgedunkelten Räumen ausgeführt.

2.1. Radioaktives Ro 10-9359. Für die Untersuchungen stand die mit zwei Tritiumatomen in den Stellungen 10 und 11 (*Schema 1*) markierte Verbindung zur Verfügung. Sie wurde in den Isotopenlaboratorien der *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG* synthetisiert und hatte eine spezifische Aktivität von 747 $\mu\text{Ci}/\text{mg}^3$).

2.2. Verabreichung des Retinoids Ro 10-9359 an den Menschen; Gewinnung von Blut, Faeces und Urin. Zwei Psoriasis-Patienten wurden je eine Kapsel mit 100 mg radioaktiver Wirksubstanz (5,0 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) peroral verabreicht. Blutproben (10 ml) wurden $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 5, 7, 12, 24 und 48 Std. nach Verabreichung entnommen. Als Antikoagulans diente Kaliumoxalat. Nach Zentrifugieren bei 3000 Upm wurde das Plasma abpipettiert und bei -20° aufbewahrt.

Der Urin und die Faeces wurden während fünf Tagen nach Verabreichung des Pharmakons gesammelt. In einem zweiten Versuch wurde bei fünf Patienten, welche täglich je 100 mg des nicht radioaktiven Präparates peroral erhielten, während vier Tagen der Urin gesammelt. Dieser wurde mit dem aus dem Versuch mit radioaktivem Ro 10-9359 stammenden Urin vereinigt und bis zur Aufarbeitung bei -20° aufbewahrt.

²⁾ Der Einfachheit halber erfolgt die Numerierung nicht nach der IUPAC-Nomenklatur, sondern nach *Schema 1*.

³⁾ Wir danken Dr. *J. Würsch* für die Synthese des radioaktiven Präparates.

2.3. *Tierexperiment zur Gewinnung von Rattengalle.* Zwei männlichen Ratten (Füllinsdorf Albino SPF, 200 g Körpergewicht) wurde unter Narkose mit Methoxyflurane (Penthane, *Abbott Laboratories*) der *Ductus choledochus* doppelt kanüliert (Methode nach *Gallo-Torres* [11]). Ein Polyäthylenkatheter wurde zur Ableitung reiner Galle eingelegt. Durch eine zweite Kanüle wurde während des Versuches eine Salzlösung (0,9% NaCl, 0,2% NaHCO₃, 0,04% KCl) in den Dünndarm infundiert (1,5 ml/Std.). Nach der Operation hatten die Tiere 24 Std. lang freien Zugang zu Futter und Wasser. Nach dieser Erholungszeit wurde den Ratten je 1,2 ml einer Lösung von radioaktivem Retinoid Ro 10-9359 in die linke *V. femoralis* injiziert. Die Galle wurde fraktioniert während 48 Std. aufgefangen (Gallenfluss: 0,5–1,1 ml/Std.).

Injektionslösung: 20 mg radioaktives Ro 10-9359 (spez. Akt. = 1 μ Ci/mg) wurden in 5 ml Aceton, 1,5 ml Tween 80 und 4,0 ml 0,9% NaCl-Lösung bei 40° gelöst und das Aceton i.R.V. bei 40° i. V. abgedampft.

2.4. *Intraduodenale Infusion der radioaktiven Rattengalle.* Die Galle einer Gallenfistelratte, die 2 mg/kg radioaktives Ro 10-9359 (1 μ Ci/mg) *p.o.* erhalten hatte, wurde einer zweiten, ebenfalls gallengangkanülierten Ratte, intraduodenal, anstelle natürlicher Galle, infundiert. Dabei wurde die radioaktive Galle in zwei Portionen, 15 und 23 ml (0–24 h- und 24–48 h-Sammelperiode) mit einer Pumpe bei einem konstanten Fluss von 3,1 ml/h eingeleitet. Das infundierte radioaktive Material entsprach einer Dosis von 0,2 mg Äq. Ro 10-9359 pro kg Körpergewicht.

2.5. *Dünnschichtchromatographie (DC).* Es wurden Kieselgel-Fertigplatten 60 F 254 (0,5 mm) der Firma *E. Merck* (Darmstadt) verwendet. Vor Gebrauch wurden die Platten mit Aceton und Chloroform gewaschen. Die Proben wurden strichförmig mittels eines Mikrodosers (*Desaga*) auf die Platten aufgetragen. Fließmittelsysteme waren: Hexan/Aceton 80:20, 50:50. Alle UV.-Licht absorbierenden Zonen auf den Platten wurden abgekratzt und die darin enthaltenen Substanzen mit Äthanol eluiert.

2.6. *Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC).* Pumpe: *Milton Roy* Mini Pump (24–240 ml/Std., 340 Atm.); Puls Dämpfung: *LDC 709*, bis 90 Atm.; Detektor: *Cecil CE 212 UV.*-Monitor mit variabler Wellenlängeneinstellung und 10 μ l Durchflusszelle; Säule: 50 cm Stahlrohr, innerer Durchmesser 3 mm, Einspritzkopf mit Septum; Stationäre Phase: Kieselgel (Partisil 5, *Whatman*), Partikeldurchmesser 6 μ . Mobile Phasen (*Merck p.a.*, entgast): Hexan/Tetrahydrofuran 98:2, 95:5, 85:15, 80:20; Hexan/Tetrahydrofuran/Acetonitril 60:30:10, 79:20:1; Hexan/Tetrahydrofuran/Essigsäure 84:15:1.

2.7. *Radioaktivitätsmessungen.* Die Radioaktivität der Proben wurde durch Flüssigkeits-Szintillations-Messung in einem *Nuclear-Chicago* Mark I Zähler mit externem ¹³³Ba Standard bestimmt. Die Quench-Korrektur erfolgte mittels eines programmierten Rechners, *Hewlett Packard* Modell 10. Die Szintillationslösung bestand aus einer Mischung von 3,5 g Butyl-PBD, *Ciba* [2-(4-Biphenyl)-5-(*p*-(*t*-butyl)phenyl)-1,3,4-oxadiazol] und 40 g Naphthalin in 350 ml Dioxan, 50 ml Toluol und 100 ml Äthylenglykolmonomethyläther.

Radioaktive Zonen der Dünnschichtchromatogramme wurden mit Äthanol eluiert. Aliquote Teile von Eluaten, welche radioaktives Material aus Dünnschichtchromatogrammen und aus der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie enthielten, sowie bis zu 100 μ l Urin, Gallen- und Plasma-proben wurden direkt in Polyäthylenmessfläschchen in 15 ml Szintillatorlösung gemessen. Die Faeces wurden vorher mit Äthanol homogenisiert und aliquote Teile der Suspension zur Messung eingesetzt.

2.8. *Massenspektrometrie (MS).* Alle Massenspektren wurden mit einem *AEI-MS 9* Massenspektrometer aufgenommen, unter Verwendung der Elektronenstoss-Ionisation. Die Daten der Hochauflösungen wurden mit einem *AEI-MS 902/DS 30* System erhalten. Die Proben wurden in 10 μ l eines (1:1)-Gemisches aus Methanol/Dichlormethan aufgenommen, auf ein Keramikstäbchen übergeführt und nach Verdunsten des Lösungsmittels im Stickstoffstrom in die Ionenquelle des Massenspektrometers eingebracht (Temp.: 250°, Elektronenenergie: 70 eV).

2.9. *Protonenresonanzspektroskopie (¹H-NMR).* Die Aufnahme der ¹H-NMR.-Spektren der synthetischen Produkte erfolgte bei 60 oder 100 MHz (*Varian* A-60 oder HA-100 Spektrometer). Als Lösungsmittel diente CDCl₃ oder DMSO-d₆.

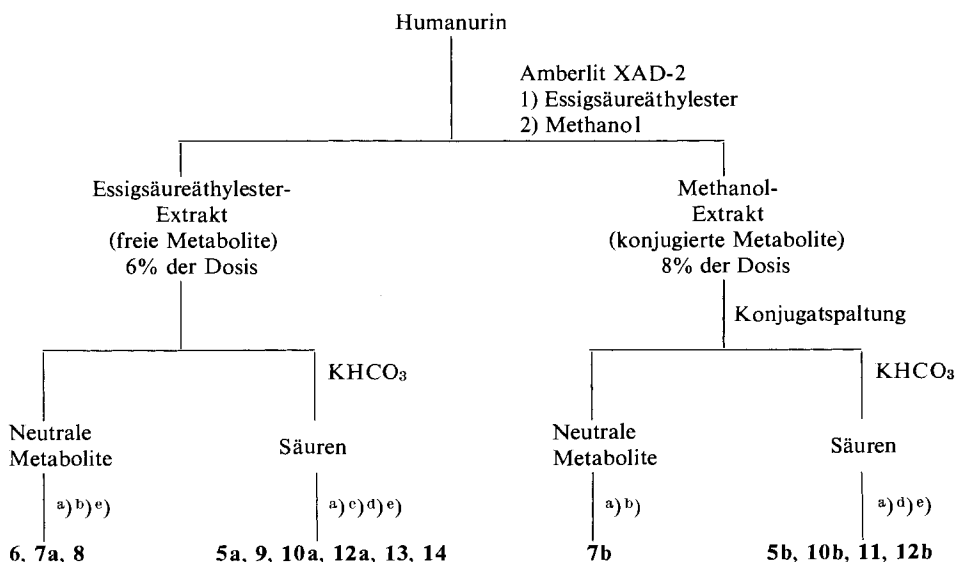
Da von den Metaboliten teilweise nur geringste Substanzmengen zur Verfügung standen (\geq 12 μ g), wurden ihre Spektren mittels Puls-Fourier-Transformationstechnik bei 90 MHz (*Bruker* HX-90/15 mit *Nicolet* 1083 Computer, 12 K Memory) oder bei 270 MHz (*Bruker* HX-270 mit *BNC-80* Com-

puter, 40 K Memory) aufgenommen. Dabei wurden bis zu 66000 Interferogramme akkumuliert. Als Lösungsmittel diente CDCl_3 . Bei den kleineren Substanzmengen wurde sogenannte 100%-D Qualität sowie Mikrozellen (*Wilmad*, ca. 0,17 ml) verwendet, um die Lösungsmittelsignale möglichst klein zu halten.

2.10. *Isolierungen*. 2.10.1. *Unverändertes Pharmakon und Metabolit 2a aus Humanplasma*. Bei beiden Patienten wurden die Plasmaproben, welche die meiste Radioaktivität enthielten, (3 und 5 Std. nach oraler Verabreichung von 100 mg Ro 10-9359) bei pH 6 mit Essigsäureäthylester erschöpfend extrahiert. Die Extrakte wurden eingedampft und durch präp. HPLC. fraktioniert. Als Fließmittel diente Hexan/Tetrahydrofuran/Essigsäure 84:15:1. Die UV.-Absorption des Säulen-Eluates wurde bei 350 nm gemessen. Es konnten zwei radioaktive Hauptfraktionen, Nr. 1 (unverändertes Pharmakon) und Nr. 2 (Metabolit **2a**) aufgefangen werden. Die Fraktion Nr. 2 konnte in äthanolischer Lösung mit Diazoäthan äthylisiert werden (3 Min., 25°).

2.10.2. *Metaboliten 5a–14 aus Humanurin*. Der Humanurin (ca. 30 l) wurde auf vier Säulen (75 × 6,5 cm) mit *Amberlite XAD-2* absorbiert (*Schema 3*). Jede Säule wurde mit 1,5 l Wasser ge-

Schema 3. *Isolierung der Urinmetaboliten des Retinoids Ro 10-9359*



a) Säulenchromatographie, Hexan/Chloroform/Methanol mit steigender Polarität.

b) Dünnschichtchromatographie, Hexan/Aceton 80:20.

c) Methylierung mit Diazomethan, 3 Min. 25°.

d) Dünnschichtchromatographie, Hexan/Aceton 50:50.

e) Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Fließmittel siehe *Tabelle 1*.

waschen und mit N_2 trocken geblasen. Nach Eluieren der Säulen mit je 1,5 l Essigsäureäthylester konnten vier Fraktionen gewonnen werden, die vereinigt wurden (40% der Tritium-Aktivität des Urins, 6% der Dosis). Nach Eluieren der Säulen mit je 1 l Methanol konnten vier weitere Fraktionen mit polaren, konjugierten Metaboliten isoliert werden (54% der Urin Aktivität, 8% der Dosis). Um die Säuren von den neutralen Verbindungen abzutrennen, wurde die Essigesterfraktion mit 2 N KHCO_3 ausgeschüttelt. Nach Ansäuern (pH 2) und Rückextraktion mit Äther konnten die sauren Metaboliten isoliert werden. Die Methanolfraction wurde in 500 ml Acetattpuffer (pH 4,6) gelöst und nach Zugaben von β -Glucuronidase/Arylsulfatase (5 ml, *Suc d'Helix pomatia*, *Industrie Biologique Française*) für 16 Std. bei 37° inkubiert. Nach Extraktion mit Essigsäureäthylester bei pH 4 wurden die Säuren von den neutralen Metaboliten durch Ausschütteln mit KHCO_3 -Lösung abge-

trennt (*Schema 3*). Die weitere Reinigung der Fraktion erfolgte durch Säulenchromatographie. Die Säuren wurden vorher mit Diazomethan methyliert. Als mobile Phase diente Hexan/Chloroform/Methanol mit steigender Polarität. Durch weitere Auftrennung mittels DC. und HPLC. konnten die Metaboliten **5a–14⁴**) in μg -Mengen isoliert werden (*Schema 3*). In der *Tabelle 1* sind die bei der HPLC. verwendeten mobilen Phasen und die gemessenen Retentionsvolumina angegeben. Die UV.-Detektion erfolgte bei 260 nm.

Tabelle 1. *Mobile Phasen und Retentionsvolumina von Ro 10-9359 und seiner Metaboliten bei der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*

	Mobile Phasen	Retentionsvolumen (ml)
1	Hex/THF 98:2	8,3
2-Methylester	Hex/THF 98:2	9,3
3-Methylester	Hex/THF 95:5	22,0
4-Methylester	Hex/THF 85:15	26,0
5a -Methylester	Hex/THF 95:5	31,5
6	Hex/THF 85:15	10,9
7a	Hex/THF 80:20	12,5
8	Hex/THF/ACN 75:20:5	13,0
9-Methylester	Hex/THF 99,5:0,5	27,0
10a -Methylester	Hex/THF 95:5	21,5
11 -Methylester	Hex/THF 99:1	24,0
12a -Methylester	Hex/THF 95:5	28,6
13 -Methylester	Hex/THF/ACN 60:30:10	8,0
14 -Methylester	Hex/THF/ACN 79:20:1	17,0

Hex = Hexan THF = Tetrahydrofuran ACN = Acetonitril.

2.10.3. *Untersuchung der Humanfaeces*. Die während fünf Tagen nach Verabreichung des radioaktiven Retinoids gesammelten und vereinigten Faeces eines Patienten wurden mit dem Stabmixer (*Polytron, Kinematica, Luzern/Schweiz*) in 1 l Äthanol homogenisiert. Nach Filtration wurde der Rückstand ein zweites Mal mit 0,5 l Äthanol homogenisiert und filtriert. Die vereinigten Filtrate wurden bis auf 300 ml im RV. eingeeengt. Nach Zugabe von 1 l Wasser und Einstellen auf pH 2 mit 2N HCl wurde die Suspension auf einer Säule mit *Amberlite XAD-2* (75 × 6,5 cm) adsorbiert. Nach Waschen mit 1,5 l Wasser konnte mit 2,5 l Essigsäureäthylester eine Fraktion gewonnen werden, welche 80% der in den Faeces vorhandenen Radioaktivität enthielt (unverändertes Pharmakon). Nach Eluieren mit 1 l Methanol konnte eine zweite Fraktion isoliert werden, welche weitere 10% der Faeces-Radioaktivität enthielt. Weitere 5% der ³H-Aktivität konnten nicht mehr von der Säule eluiert werden.

2.10.4. *Metaboliten 2b, 3 und 4 aus Rattengalle*. Die nach intravenöser Verabreichung von radioaktivem Ro 10-9359 während 48 Std. gesammelte Rattengalle beider Versuchstiere wurde vereinigt (70 ml). Nach Zugabe von 50 ml Äthanol und 200 ml Wasser wurde 3mal mit Essigsäureäthylester extrahiert. Die vereinigten Extrakte enthielten weniger als 3% der eingesetzten Tritium-Aktivität und wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde i. V. vom organischen Lösungsmittel befreit und mit 50 ml 0,1N Acetatpuffer (pH 4,6) versetzt. Nach Zugabe von 2 ml Glucuronidase/Arylsulfatase-Lösung (*Suc d' Helix pomatia, Industrie Biologique Française*) wurde während 6 Std. bei 37° inkubiert. Nach Extraktion der Inkubationslösung mit Essigsäureäthylester bei pH 4 konnte ein Extrakt gewonnen werden, der über 80% der in der Galle enthaltenen Tritium-Aktivität enthielt. Der Essigsäureäthylesterextrakt mit den freien Metaboliten wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie in drei Fraktionen aufgetrennt (Fließmittel: Hexan/Aceton 50:50). Die drei radioaktiven Zonen wurden mit Äthanol eluiert. Nach Abdampfen der äthanolischen Lösung wurde der Rückstand aus

4) Konjugierte Metaboliten nach enzymatischer Spaltung.

der apolarsten Fraktion in Chloroform/Äthanol 1:3 mit Diazoäthan äthylert (3 Min., 25°). Die Rückstände der beiden polareren Fraktionen wurden auf analoge Weise mit Diazomethan in Chloroform/Methanol 1:3 methyliert. Die Ester wurden durch präp. HPLC. weiter gereinigt (Fließmittel: Hexan/Tetrahydrofuran 98:2 (für **2b**), 95:5 (für **3**), 87:17 (für **4**). Die UV.-Detektion erfolgte bei 350 nm.

3. Resultate. – 3.1. *Struktur der Metaboliten.* Die Strukturaufklärung aller Metaboliten erfolgte aufgrund der ¹H-NMR. und massenspektroskopischen Resultate, die in den *Tabellen 2 bis 4* zusammengefasst sind⁵⁾6).

In den *Tabellen 2 und 3* sind die relativ intensiven Pike (>20%) der EI-Massenspektren zusammengestellt und, so weit es plausibel erschien, Teilen der ursprünglichen Molekelstruktur zugeordnet. Die Anordnung von Verbindungen und Pike in den Tabellen wurde so gewählt, dass die Ähnlichkeit von Teilstrukturen in den Metaboliten möglichst deutlich wird.

Pike, deren Herkunft nicht ohne weiteres auf die Molekelstrukturen zurückzuführen sind, wurden ohne Strukturzuordnung angeführt. Obwohl nicht mit Strukturelementen verknüpft, dienen auch diese Pike dazu, die Analogie gewisser Strukturen, z. B. der Methylester von **5a** und **10a** mit den entsprechenden Glycinkonjugaten **13** bzw. **14**, klarzulegen. Zum Vergleich mit den Metaboliten wurde auch das Massenspektrum des Pharmakons (**1**) in die *Tabelle 3* aufgenommen. In diesem Spektrum, sowie in den Spektren der Methylester der Metaboliten **2a** und **3**, mit gleichem Kohlenstoffgerüst, fällt die starke Fragmentierung im Bereich der Polyen-Kette auf. Drei Punkte sind besonders hervorzuheben: Der Verlust der mit dem Polyensystem konjugierten Carboxygruppe, der Verlust des aromatischen Restes als Benzylradikal und das Erscheinen dieses Restes als Benzyl- (bzw. Tropylium-)kation im Spektrum. Dasselbe Verhalten ist bei Carotinoiden, die entsprechende Strukturelemente enthalten, bekannt [12]. In vier Fällen wurden die Strukturen zusätzlich durch spektroskopischen und chromatographischen Vergleich mit synthetischen Proben bestätigt (Metaboliten **2a**, **5a**, **6** und **7a**).

Die Identifizierung des Metaboliten **3** erfolgte nach enzymatischer Spaltung und Veresterung mit Diazomethan nur aufgrund des Massenspektrums. Die Ähnlichkeit des Massenspektrums seines Methylesters mit den Methylestern von **1** und **2**, zusammen mit seiner Isolierung aus der Konjugat-Fraktion, beweist seine Struktur. Über mögliche *cis-trans*-Isomerie kann jedoch nichts ausgesagt werden, da für die Aufnahme eines ¹H-NMR.-Spektrums keine genügend reine Probe gewonnen werden konnte.

Für Metabolit **4** geht aus der Summenformel (*Tabelle 2*) sowie aus dem ¹H-NMR.-Spektrum hervor, dass eine der Methylgruppen am aromatischen Kern zur Hydroxymethyl-Gruppe oxydiert worden ist. Die Stellung dieser Gruppe im aromatischen Ring konnte nicht eindeutig festgelegt werden.

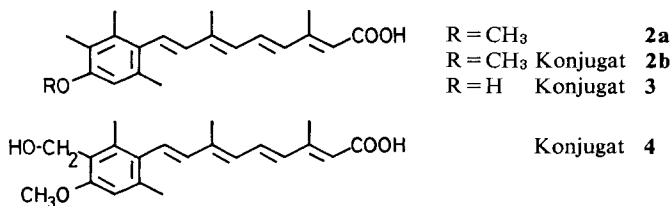
Beim Vergleich des ¹H-NMR.-Spektrums der Ausgangssubstanz Ro 10-9359 mit demjenigen des Methylesters von **4** fällt jedoch auf (vgl. *Tabelle 4*), dass vermutlich das im Spektrum von Ro 10-9359 bei 2,15 ppm erscheinende Methylsignal im Spektrum

5) Die Konfiguration an den Asymmetriezentren der Metaboliten **6** und **14** wurde noch nicht untersucht.

6) Herrn *W. Meister* danken wir für die Hilfe bei der Aufnahme und Interpretation der Massenspektren, Herrn *G. Oesterheld* für einige Vorversuche mit GC./MS.

von **4** fehlt. Da dieses Signal am wahrscheinlichsten der Methylgruppe an C(2) zuzuordnen ist, dürfte beim Metabolit **4** also möglicherweise die Methylgruppe an C(2) in eine Hydroxymethylgruppe umgewandelt worden sein. Wir schlagen daher die Struktur **4** (vgl. *Schema 4*) als Arbeitshypothese vor.

Schema 4. *Metaboliten von Ro 10-9359*



Das ¹H-NMR.-Spektrum des Methylesters von **5a** deutet auf eine all-*trans* Struktur der Seitenkette hin, da eine Kopplung $J_{7,8} = 16,3$ Hz ($\Delta^7 = \text{trans}$) und eine normale Verschiebung des H-C(8) beobachtet wird (*Tabelle 2*). Bei einer Δ^9 -*cis*-Struktur würde das Signal von H-C(8) bei etwa 0,4 ppm tieferem Feld erwartet [12].

Die Lacton-Struktur von **6** und **7a** folgt aus der Tatsache, dass diese Metaboliten in der Neutralfraktion auftreten und in den Massenspektren im Gegensatz zu allen übrigen Verbindungen (*Tabelle 3 und 4*), einen charakteristischen Pik bei m/e 99 zeigen.

Im ¹H-NMR.-Spektrum des synthetischen Lactons **6** und demjenigen des Metaboliten **7a** werden die Signale der beiden gekoppelten CH₂-Gruppen des Lactonrings als Multipletts bei *ca.* 2,1 ppm (H-C(10)) und *ca.* 2,6 ppm (H-C(11)), das Singulett der Methylgruppe an C(9) bei *ca.* 1,6 ppm in Übereinstimmung mit der Erwartung beobachtet.

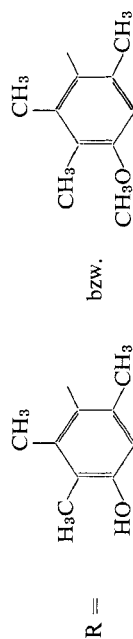
Der Metabolit **8** konnte nicht in reiner Form isoliert werden. Im ¹H-NMR.-Spektrum zeigt sich, dass die Probe unter anderem den Metaboliten als Diastereomerenmisch enthält. So treten insbesondere die Signale der Protonen an C(7) und C(8) (in beiden Komponenten $\Delta^7 = \text{trans}$) sowie das Singulett der Methylgruppe an C(9) doppelt auf (85:15). Eine einwandfreie spektroskopische Analyse dieser Substanz wurde jedoch durch Zufall ermöglicht: Bei der Synthese des Metaboliten **7a** entstand auf ungeklärtem Wege in kleinster Ausbeute ein Nebenprodukt, das sich nach ¹H-NMR.-Spektrum als identisch mit der Hauptkomponente des Diastereomerenmisch erwie. Diese Identität wurde durch ¹H-NMR./MS. (Summenformel) bestätigt. Die Daten in *Tabelle 2 und 4* sind den Spektren dieses Produktes entnommen. Das Massenspektrum der Verbindung erwies sich, vermutlich infolge von Pyrolyse (Öffnung des Lactonringes?), als schlecht reproduzierbar, so dass Pik-Intensitäten (*Tabelle 4*) nur in der Grössenordnung angegeben werden können.

Das Vorliegen eines 5-Ring-Lactons lässt sich aus dem IR.-Spektrum ableiten (1775 cm⁻¹) und wird durch die Tatsache bestätigt, dass der Metabolit im Gang der Analyse in derselben Fraktion erschien wie die anderen Lactone.

Einen wichtigen Hinweis auf die Stellung der Hydroxylgruppe (an C(10)) des Lactonrings bei der Hauptkomponente liefert der bei 2,97 und 2,51 ppm beobachtete *AB*-Teil eines *ABX*-Spektrums, bei dem der hohe Wert für die geminale Kopplung

Tabelle 2. Die intensiven Paks (Masse und Intensität in %) in den EI-Massenspektren von Ro 10-9359 und seiner Metaboliten 2a, 3, 4, 5a und 13 (mit Diazomethan verestert)^{a)}

	M^+	$M^+ - CH_3$	$M^+ - CH_3 - HOCH_3$	$M^+ - CO_2CH_3$	$M^+ - RCH_2$	$M^+ - RCH_2^+$	RCH_2^+	RH ⁺	
1 ^{a)}	354	339	293 ^{b)}	281 ^{c)}	191	150	163	265	201
	85	30	30	90	42	100	86	38	53
2a-	340	325	293	281	177	150	163	251	201
Methylester ^{a)}	100	37	33	67	59	83	63	42	41
3-	326	311	279	267	177	136	149	187	60
Methylester	80	30	45	80	70	80	100		
4-	356, 1977 ^{d)}								
Methylester	$C_{22}H_{28}O_4$								
5a-	274, 1560	259	227	215				200	187
Methylester	64	7	13	30				50	63
	$C_{17}H_{22}O_3$								43
13-	331, 1784	316	227 ^{e)}	215 ^{f)}				200	187
Methylester	51	15	34	78				100	55
	$C_{19}H_{25}NO_4$								48



a) Die angegebenen Formeln stellen nur Bruchstücke der ursprünglichen Molekülstrukturen dar. Die tatsächlichen Ionenstrukturen sind nicht bekannt.

b) $M^+ - C_2H_5OH - CH_3$.


c) $M^+ - COOC_2H_5$.

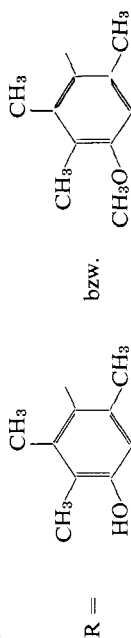
d) Probe nicht genügend rein für die Identifizierung von Fragmenten.

e) $M^+ - NH_2CH_2COOCH_3 - CH_3$.

f) $M^+ - CONHCH_2COOCH_3$.

Tabelle 3. Die intensiven Pike (Masse, Intensität in %) in den EI-Massenspektren der Metaboliten **6**, **7a**, **8**, **9**, **10a**, **12a** und **14** (mit Diazomethan verestert)^{a)}

	M^+	$M^+ - CH_3$	R	R , $-CH_3$	R , $-2 \times CH_3$	RCH_2^+				
6	274 100	259 51					99 39	215 61	201 64	
7a	260 96	245 51					99 37	201 51	187 36	184 45
8^{b)}	276, 1350 ~10 $C_{16}H_{20}O_4$		189 100 ^{c)}	174 ~40	159 ~20			232 ~10	205 ~20	
9-	262		203	188	173					
Methylester	75		100	41	20					
10a-	248		189	174	159					
Methylester	50		100	41	19					
11-	222									
Methylester	20									163
12a-	208									100
Methylester	25									149
14-	305, 1630		189	174	159					216 (M - Glycinmethylester)
Methylester	18 $C_{17}H_{23}NO_4$		100	32	15					14



a) Die angegebenen Formeln stellen nur Bruchstücke der ursprünglichen Molekülstrukturen dar. Die tatsächlichen Ionenstrukturen sind nicht bekannt.
 b) Spektrum der mit dem Metaboliten identischen synthetischen Substanz.
 c) Spektrum ist schlecht reproduzierbar.

Tabelle 4. $^1\text{H-NMR}$,-Daten von *Ro 10-9359* und seinen Metaboliten (chemische

Substanz	H-C(4)	H-C(7)	H-C(8)	H-C(9)	H-C(10)	H-C(11)
1	6,60 s	6,71 d (16,3)	6,23 d (16,3)	–	6,19 d (11,5)	7,03 $d \times d$ (11,5; 14,7)
2a ^{b)}	6,61 s	6,73 d (16,3)	6,24 d (16,3)	–	6,21 d (\sim 11)	7,09 $d \times d$ (11,5; 14,7)
4-Methylester	6,64 s	6,65 d (16,3)	6,24 d (16,3)	–	6,20 d (11,5)	7,03 $d \times d$ (11,5; 15)
5a-Methylester	6,52 s	6,48 d (16,5)	6,17 d (16,3)	–	5,65 t (7,2)	3,25 d (7,2)
6 ^{b)}	6,54 s	6,57 d (16,3)	5,59 d (16,3)	–	ca. 2,2 m	ca. 2,6 m
7a	6,51 s	6,58 d (16,4)	5,61 d (16,4)	–	ca. 2,2 m	ca. 2,6 m
8 ^{c)}	6,51 s	6,62 d (16,4)	5,57 d (16,4)	–	4,38 $br.s$	2,98 $d \times d$ (17,6; 6) 2,55 $d \times d$ (17,6; 1,8)
9-Methylester	6,57 s	6,41 d (16,3)	5,60 $d \times d$ (16,3; 8,0)	3,35 qi (ca. 7–8)	–	–
10a-Methylester	6,51 s	6,40 d (16,3)	5,61 $d \times d$ (16,3; 8,0)	3,35 qi (ca. 7–8)	–	–
11-Methylester	6,58 s	3,67 s	–	–	–	–
13-Methylester	6,53 s	6,54 d (16,3)	6,19 d (16,3)	–	5,64 t (7,3)	3,22 d (7,5)
14-Methylester	6,52 s	6,51 d (16,0)	5,62 $d \times d$ (16,0; 8,0)	3,25 qi (ca. 7–8)	–	–

a) s =Singulett, d =Dublett, $d \times d$ =doppeltes Dublett, t =Triplett, qa =Quartett, qi =Quintett,

b) Spektrum der mit dem Metaboliten identischen synthetischen Substanz.

c) Hauptkomponente des Metabolitengemisches.

Verschiebungen in ppm; in Klammern: Kopplungskonstanten in Hz; Lösungsmittel CDCl₃^{a)}

H-C(12)	H-C(14)	CH ₃ -Arom.	CH ₃ -C(9)	CH ₃ -C(13)	Sonstige Protonen	MHz
6,31 <i>d</i> (14,7)	5,78 <i>s</i>	2,28 <i>s</i> 2,23 <i>s</i> 2,15 <i>s</i>	2,10 <i>s</i>	2,36 <i>d</i> (~1)	OCH ₃ : 3,81 <i>s</i> OCH ₂ : 4,18 <i>qa</i> (7,1) CH ₃ : 1,23 <i>t</i> (7,1)	90
6,34 <i>d</i> (14,7)	5,82 <i>s</i>	2,30 <i>s</i> 2,24 <i>s</i> 2,15 <i>s</i>	2,12 <i>s</i>	2,38 <i>d</i> (~1)	OCH ₃ : 3,82 <i>s</i> COOH: ~7,53 <i>br.</i> (?)	90
6,33 <i>d</i> (15)	5,79 <i>s</i>	2,36 <i>s</i> 2,31 <i>s</i>	2,11 <i>s</i>	2,38 <i>d</i> (~1)	OCH ₃ : 3,85 <i>s</i> COOCH ₃ : 3,72 <i>s</i> OCH ₂ : 4,77 <i>d</i> (6,5) OH: 2,05 <i>t</i> (6,5)	270
-	-	2,22 <i>s</i> 2,21 <i>s</i> 2,16 <i>s</i>	1,91 <i>s</i>	-	OH: 4,54 <i>s</i> COOCH ₃ : 3,72 <i>s</i>	270
-	-	2,23 <i>s</i> 2,18 <i>s</i> 2,13 <i>s</i>	1,60 <i>s</i>	-	OCH ₃ : 3,78 <i>s</i>	60
-	-	2,18 <i>s</i> 2,18 <i>s</i> 2,15 <i>s</i>	1,63 <i>s</i>	-	OH: 4,50 <i>s</i>	90
-	-	2,16 <i>s</i> 2,16 <i>s</i> 2,15 <i>s</i>	1,63 <i>s</i>	-	OH(C(4)): 4,57 <i>s</i> OH(C(10)): 1,97 <i>d</i>	30 270
-	-	2,25 <i>s</i> 2,19 <i>s</i> 2,13 <i>s</i>	1,38 <i>d</i> (7,3)	-	OCH ₃ : 3,80 <i>s</i> COOCH ₃ : 3,71 <i>s</i>	90
-	-	2,20 <i>s</i> 2,20 <i>s</i> 2,15 <i>s</i>	1,38 <i>d</i> (7,3)	-	OH: 4,52 <i>s</i> COOCH ₃ : 3,72 <i>s</i>	270
-	-	2,32 <i>s</i> 2,21 <i>s</i> 2,14 <i>s</i>	-	-	OCH ₃ : 3,79 <i>s</i> COOCH ₃ : 3,67 <i>s</i>	270
-	-	2,23 <i>s</i> 2,23 <i>s</i> 2,16 <i>s</i>	1,95 <i>s</i>	-	OH: 4,56 COOCH ₃ : 3,77 <i>s</i> NH: 6,14 <i>br.</i> NCH ₂ : 4,07 <i>d</i> (5,0)	270
-	-	2,22 <i>s</i> 2,22 <i>s</i> 2,15 <i>s</i>	1,40 <i>d</i> (7,0)	-	OH: 4,54 <i>s</i> COOCH ₃ : 3,77 <i>s</i> NH: 6,21 <i>br.</i> NCH ₂ : 4,08 <i>d</i> (5,0)	270

m = Multipllett, br. = breites Signal.

$J(A, B) = 17,6$ Hz die Nachbarschaft der Methylengruppe zur Carbonylgruppe beweist und somit die C(10) der Hydroxylgruppe festliegt.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Methylesters des Metaboliten **9** zeigt neben den aromatischen Methylsignalen ein weiteres, jedoch als Dublett bei 1,38 ppm ($J = 7,3$ Hz) erscheinendes Methylsignal. Das als ungefähres Quintett auftretende Signal des Kopplungspartners H–C(9) wird bei 3,35 ppm beobachtet. Dessen Kopplungspartner gibt seinerseits offenbar Anlass zu einem doppelten Dublett bei 5,60 ppm ($J = 16,3$ und 8 Hz), das dem olefinischen Proton H–C(8) zuzuordnen ist. Damit liegt die angegebene Struktur des Metaboliten **9** sowie aufgrund analoger $^1\text{H-NMR}$ -Daten auch diejenige des Metaboliten **10a** fest.

Die bei **5a** bereits gefundenen Signale finden sich im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **13** bei fast gleichen Verschiebungen wieder. Das zusätzlich bei **13** beobachtete Dublett ($J = 5,3$ Hz; 2H) bei 4,07 ppm und das breite Signal bei 6,16 ppm werden der $\text{CH}_2\text{-NH}$ -Gruppe zugeordnet. Diese Signale werden bei fast gleicher Lage auch im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Methylesters von **14** beobachtet. Nach Zugabe von D_2O tritt hier eine Verschärfung des $\text{CH}_2\text{-N}$ -Signales infolge partiellen Austausches des H–N ein.

3.2. *Vorkommen der Metaboliten.* 3.2.1. *Humanplasma. Intaktes Pharmakon.* Die aus dem Plasma von zwei Psoriasis-Patienten isolierte Fraktion Nr. 1 (0,6 μg) war unverändertes Pharmakon, Ro 10-9359. Ein Vergleichspräparat des Pharmakons wies im Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatogramm die gleiche Retentionszeit auf, wie die aus dem Plasma isolierte Substanz (Tabelle 1). Als (1:1)-Gemisch konnte das Vergleichspräparat und die Fraktion Nr. 1 im Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatogramm nicht getrennt werden.

Metabolit 2a. Der aus dem Plasma isolierte Metabolit **2a** wurde als Äthylester (1,2 μg), nach Veresterung mit Diazoäthan, erhalten. Sein MS. (Tabelle 4) war identisch mit demjenigen des verabreichten Präparates. Der Metabolit **2a** ist demnach die aus dem Pharmakon durch Esterhydrolyse hervorgegangene Säure.

3.2.2. *Humanurin.* Die mit dem Urin innerhalb von fünf Tagen nach oraler Verabreichung des radioaktiven Retinoids Ro 10-9359 ausgeschiedene Tritium-Menge betrug bei beiden Patienten 15% der Dosis.

Aus dem Urin konnten die Metaboliten **5a**, **5b**, **6**, **7a**, **7b**, **8**, **9**, **10a**, **10b**, **11**, **12a**, **12b**, **13** und **14** in Mengen zwischen 20 bis 300 μg isoliert werden (Schema 3). Die Konjugate **5b**, **7b**, **10b**, **11** und **12b** wurden während der Aufarbeitung (Schema 3) enzymatisch zu den freien Metaboliten gespalten und danach auf gleiche Weise isoliert. Die Anteile der Metaboliten **5b**, **7a**, **10b** und **12b** an der Gesamt-Tritium Aktivität des Humanurins betragen je 10% (1,5% der Dosis); diejenigen der Metaboliten **5a**, **6**, **7b**, **8**, **9**, **10a**, **11**, **12a**, **13** und **14** je 3,3% (0,5% der Dosis).

3.2.3. *Humanfaeces. Intaktes Pharmakon.* Die mit den Faeces innerhalb von fünf Tagen nach oraler Verabreichung des radioaktiven Retinoids Ro 10-9359 ausgeschiedene ^3H -Menge betrug bei beiden Patienten 75% der Dosis.

Die Hauptmenge der in den Faeces vorhandenen radioaktiven Produkte war unverändertes Pharmakon (60% der Dosis); sie wies dasselbe chromatographische Verhalten und ein identisches MS. auf wie eine Vergleichsprobe. Ein kleinerer Anteil der mit den Faeces eliminierten ^3H -Radioaktivität konnte nicht identifiziert werden (15% der Dosis).

3.2.4. *Rattengalle.* Nach intravenöser Verabreichung des radioaktiven Retinoids Ro 10-9359 an zwei gallengangkanülierte Ratten, wurden 70% der Dosis innerhalb von 48 Std. *via* Galle eliminiert, die Hauptmenge (40% der Dosis) innerhalb der ersten 6 Std. Es wurde kein unverändertes Pharmakon gefunden. Alle radioaktiv markierten Substanzen in der Galle waren sehr polar. Nach enzymatischer Spaltung der Konjugate und Äthylierung konnten 100 μg (aus **2b**) und nach Methylierung 15 μg (aus **3**) und 20 μg (aus **4**) der Ester isoliert werden. Die Identifizierung der Methylester bzw. Äthylester der enzymatisch gespaltenen Metaboliten **3**, **4** und **2b** erfolgte mittels MS. Der Anteil von **2b**

an der Gesamt-Radioaktivität der Rattengalle betrug 70% (49% der *i. v.* Dosis), der Anteil von **3** betrug 10% (7% der *i. v.* Dosis) und derjenige von **4** 13% (9% der *i. v.* Dosis).

3.2.5. *Enterohepatischer Kreislauf bei der Ratte.* Die aus dem *p. o.*-Versuch stammende, während 48 Stunden gesammelte Galle wurde intraduodenal einer gallengangkanülierten Ratte infundiert. Innerhalb von 48 Std. wurden 17% der Tritium-Dosis mit der Galle wieder ausgeschieden.

4. Diskussion. – Nach peroraler Verabreichung des aromatischen Retinoids Ro 10-9359 beim Menschen trat im Blut neben dem unveränderten Pharmakon der biologisch aktive Metabolit **2a**, die entsprechende Säure auf. Weder das unveränderte Pharmakon, noch die entsprechende Säure **2a** wurden im Humanurin gefunden. Hingegen erschien das Pharmakon nach peroraler Verabreichung beim Menschen in grosser Menge in den Faeces. Um abzuklären, ob die unveränderte Substanz in den Faeces *via* Galle dorthin gelangte oder evtl. nicht absorbiert wurde, musste die Galle untersucht werden. Da die menschliche Galle für diese Untersuchung nicht zur Verfügung stand, wurde in einem Tierversuch die Galle von Ratten, welche das radioaktive Retinoid Ro 10-9359 intravenös verabreicht erhalten hatten, analysiert. In diesem Tierversuch zeigte sich, dass Ro 10-9359 höchstens zu 0,1% unverändert *via* Galle ausgeschieden wird. Wenn dies auch beim Menschen zutrifft, dann muss die gesamte Menge des unveränderten Pharmakon, welche nach peroraler Gabe in den Faeces gefunden wurde, nicht absorbiertes Material darstellen (60% der peroralen Dosis).

Das Retinoid Ro 10-9359 wird beim Menschen rasch zur Säure **2a** hydrolysiert. Durch weiteren Abbau der Tetraenseitenkette werden die Metaboliten **5a**, **6**, **7a**, **8**, **9**, **10a** und **12a**, durch Abbau und anschliessende Konjugation die Metaboliten **5b**, **7b**, **10b**, **11**, **12b**, **13** und **14** gebildet. Alle diese Metaboliten wurden beim Menschen mit dem Urin ausgeschieden.

Die Konjugate **13** und **14** sind Glycinderivate der Metaboliten **5a** bzw. **10a**. Die übrigen konjugierten Metaboliten **5b**, **7b**, **10b**, **11** und **12b** wurden wegen ihres sehr polaren Charakters nicht als Konjugate (Glucuronide oder Sulfate) isoliert, sondern durch enzymatische Spaltung in die analogen freien Metaboliten übergeführt, welche darauf auf gleiche Art wie die unkonjugierten Metaboliten **5a**, **6**, **7a**, **8**, **9**, **10a** und **12a** identifiziert wurden. Die abgespaltenen, wasserlöslichen Reste (Glucuronsäure oder Schwefelsäure) wurden nicht identifiziert.

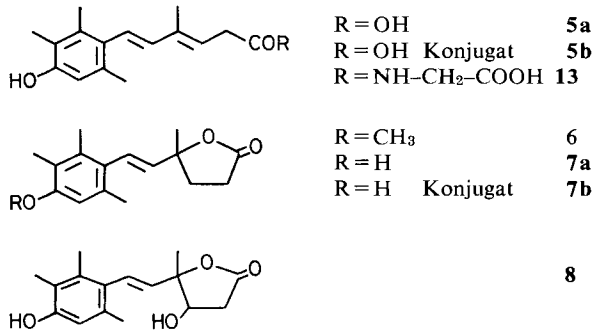
Unter den 18 aus menschlichem Urin isolierten Metaboliten besitzen die Metaboliten **5a**, **5b**, **6**, **7a**, **7b**, **8** und **13** noch 16 C-Atome des C₂₀-Grundgerüsts von Ro 10-9359 (*Schema 5*). Die Metaboliten **6**, **7a**, **7b** und **8** mit einer Methyl- γ -Lacton-gruppierung dürften aus dem Grundgerüst des Metaboliten **5a** durch Hydroxylierung an C(9) und Ringschluss zum Lacton hervorgegangen sein. Metabolit **8**, der eine Hydroxylgruppe an C(10) trägt, könnte aus **5a** durch Epoxidbildung an der Doppelbindung C(9)–C(10) mit anschliessender Öffnung des Epoxids zum Diol und γ -Lactonbildung entstanden sein.

Die Metaboliten **9**, **10a**, **10b**, **11**, **12a**, **12b** und **14**, mit noch weiter abgebauten Seitenketten sind Säuren (*Schema 6*).

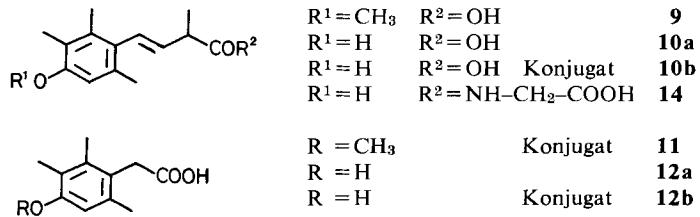
Ausser bei den Metaboliten **6**, **9** und **11** ist die aromatische Methoxygruppe durch Oxydation zum Phenol gespalten worden.

Die Metaboliten **2a**, **5a**, **6** und **7a** wurden synthetisiert (*Schema 7*). Dabei wurde vom Keton **15**, einem kristallinen Zwischenprodukt aus der Synthese von Ro 10-9359

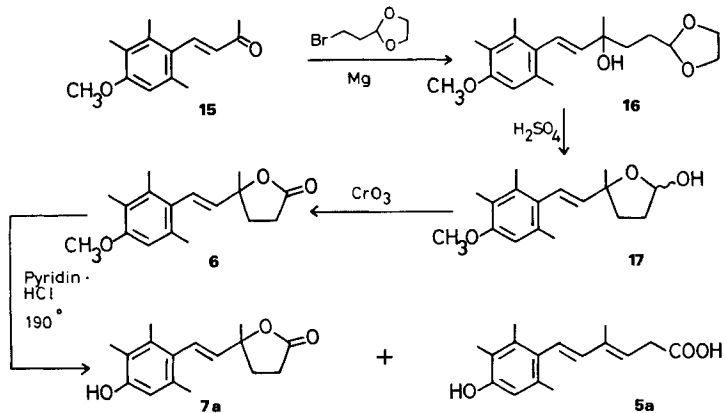
Schema 5. Metaboliten von Ro 10-9359



Schema 6. Metaboliten von Ro 10-9359



Schema 7. Synthese der Metaboliten 5a, 6 und 7a



[13] ausgegangen. Die aus menschlichem Urin isolierten und identifizierten Metaboliten repräsentieren 73% der im Urin ausgeschiedenen Radioaktivität (11% der oralen Dosis). Aus den Faeces konnte nur unverändertes Pharmakon Ro 10-9359 isoliert werden (80% der in den Faeces vorhandenen Radioaktivität, 60% der oralen Dosis). Die nach *i.v.* Verabreichung des Retinoids 10-9359 bei der Ratte aus der Galle isolierten Metaboliten **2b**, **3** und **4** sind wasserlösliche Konjugate und weisen alle die intakte Tetraseitenkette auf. Metabolit **2b** stellt das Konjugat der entsprechenden Säure des verabreichten Pharmakons dar. Metabolit **3** ist offenbar aus Metabolit **2b** durch Umwandlung der aromatischen Methoxygruppe zum Phenol und Metabolit **4** durch Oxydation einer aromatischen Methylgruppe [wahrscheinlich jene an C(2)] zum entsprechenden Alkohol entstanden.

Wie bereits erwähnt, wurden im menschlichen Urin nur Metaboliten gefunden, die gegenüber Ro 10-9359 eine um 4, 6 oder 9 C-Atome verkürzte Seitenkette aufweisen. Der Abbau der Seitenkette von Ro 10-9359 könnte formal durch wiederholte β -Oxydation, analog dem Abbau von Fettsäuren, erfolgen. Ein solcher Abbau der Tetraen-Seitenkette wurde bereits früher, ohne Kenntnis der Strukturen der Metaboliten **5a–14**, von *De Luca et al.* für Vitamin A postuliert [14] [15]. Oxydation der Seitenkette von Ro 10-9359 an C(8), C(10) und C(12) würde zu den von uns tatsächlich isolierten Metaboliten **11** und **12a**, **9** und **10a** und **5a** führen. Eine Verbindung, welche durch Oxydation in α -Stellung zur Carbäthoxygruppe [an C(14)] entstehen würde, konnte bis heute nicht gefunden werden. Hingegen wurde berichtet [14] [15], dass nach Verabreichung von Retinsäure, die in der Carboxygruppe mit ^{14}C radioaktiv markiert war, in der Atemluft grosse Mengen von radioaktivem $^{14}\text{CO}_2$ nachgewiesen wurden. Dies ist allerdings kein Beweis dafür, dass beim Abbau von Retinsäure zuerst die α -Stellung oxydiert wird, und die Carboxygruppe als CO_2 verloren geht, bevor die übrigen C-Atome der Seitenkette (C(8), C(10) und C(12)) oxydiert werden. Das in der Atemluft nachgewiesene $^{14}\text{CO}_2$ könnte auch aus einem Spaltstück der Seitenkette nach Oxydation an C(8), C(10) oder C(12) entstanden sein. Aus den Strukturen der von uns isolierten Urinmetaboliten geht nicht hervor, ob der Abbau der Seitenkette in einer Sequenz, im Sinne einer vom Ende der Seitenkette her fortschreitenden β -Oxydation, erfolgt, oder ob die Oxydation unspezifisch an den C-Atomen der Seitenkette stattfindet. Dies könnte nur durch eine Untersuchung der abgespaltenen Reste der Seitenkette abgeklärt werden.

Nachdem die Strukturen von 18 Metaboliten des Retinoids Ro 10-9359 aufgeklärt werden konnten und davon bereits vier synthetisiert wurden, bleibt abzuklären, ob diese eine interessante biologische Aktivität aufweisen. Dies wird mit den synthetisch hergestellten Verbindungen erfolgen.

5. Synthese der Metaboliten 2a, 5a, 6 und 7a. – Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der drei C_{16} -Urinmetaboliten **5a**, **6** und **7a** diente das Keton **15**, ein kristallines Zwischenprodukt aus der Synthese von Ro 10-9359 (*Schema 7*) [13]. *Grignardreaktion* mit 3-Äthylendioxy-propylbromid [16] lieferte das Acetal **16** in 69% Ausbeute. Unter milden Hydrolysebedingungen mit 3N Schwefelsäure wurde das Lactol **17** als Diastereomerenmisch gebildet. CrO_3 -Oxydation in verdünnter Schwefelsäure überführte das Lactol **17** in guter Ausbeute in den kristallinen Metaboliten **6**.

Zur Überführung der Verbindung **6** in die Metaboliten **7a** und **5a** wurde das Lacton **6** während 45 Min. in Pyridinhydrochlorid bei 190° erhitzt. Die aromatische Methyläthergruppierung wurde dabei fast vollständig zum Phenol gespalten. Im weiteren öffnete sich zu einem grossen Teil die Lactongruppierung zur Säure **5a** und einer zu **5a** isomeren Säure, bei welcher beide Doppelbindun-

gen der Seitenkette in Konjugation zur Carboxygruppe stehen. Mittels chromatographischer Trennung und fraktionierter Kristallisation gelang es, aus dem Gemisch die Verbindungen **7a** und **5a** rein zu isolieren.

Ein Vergleich der spektroskopischen Daten (MS. und $^1\text{H-NMR.}$) der synthetischen Verbindungen **5a**, **6** und **7a** mit denen der Metaboliten zeigte, dass die synthetisierten Verbindungen identisch mit den isolierten Urinmetaboliten sind.

Acetal 16. Zur Herstellung des *Grignard*-Reagens wurde eine Lösung von 12,2 g (0,065 mol) 3-Äthylendioxy-propylbromid (*Schema 7*) [13] in 50 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran unter Rühren und in einer Argonatmosphäre während 1,5 Std. zu 1,6 g (0,065 mol) Magnesiumspänen getropft. Durch Kühlen wurde die Temp. zwischen 30–35° gehalten. Nach weiterem 1,5stdg. Rühren bei dieser Temp. wurde tropfenweise bei 10–20° eine Lösung von 10,9 g (0,05 mol) **15** in 20 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran zugegeben. Nach 2stdg. Rühren bei 20° und Zugabe von eiskalter, ges. Ammoniumchlorid-Lösung wurde 3mal mit Äther extrahiert, die Ätherphasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Äthers wurden 15,4 g eines Öls erhalten. Chromatographische Reinigung auf einer Kieselgelsäule (Fließmittel: Benzol/Essigsäureäthylester 4:1) lieferte 11,1 g eines gelblichen Öls, welches die folgenden spektroskopischen Daten aufwies (UV. λ_{max} in nm, IR.-Banden in cm^{-1} , NMR.-Signale in ppm, MS.-Signale in m/e (rel. Intensität))⁷⁾. IR. (CHCl_3): 3480, 1598. – $^1\text{H-NMR.}$ (CDCl_3): 1,38 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(9)$); 1,79 (*m*, 4H, H-C(10), H-C(11)); 2,14, 2,20 und 2,25 (*s*, je 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(1)$, $\text{CH}_3\text{-C}(2)$ und $\text{CH}_3\text{-C}(5)$); 2,35 (*s*, 1H, OH); 3,77 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 3,90 (*m*, 4H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$); 4,88 (*m*, 1H, H-C(12)); 5,55 (*d*, $J=16$, 1H, H-C(8)); 6,50 (*d*, $J=16$, 1H, H-C(7)); 6,55 (*s*, 1H, H-C(4)). – MS.: 320 (M^+ , 0,5%), 302 (10%), 229 (9%), 201 (21%), 199 (21%), 163 (15%), 73 (100%).

Lactol 17. Eine Lösung von 25,6 g (0,08 mol) **16** in 500 ml Aceton wurde mit 100 ml 2N H_2SO_4 versetzt. Nach 6stdg. Rühren bei 20° war dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr feststellbar. Der Ansatz wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt. Aus einem anderen Ansatz wurde das Lactol wie folgt isoliert: Nach beendeter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch auf Eis/Wasser gegeben und 2mal mit Äther extrahiert. Nach Waschen der Ätherphasen mit Hydrogencarbonatlösung und ges. NaCl-Lösung wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und abdestilliert. Der Rückstand wurde auf einer Kieselgelsäule (Fließmittel: Dichlormethan/Essigsäureäthylester 4:1) gereinigt, worauf nach Abdestillieren des Fließmittels das Lactol **17** kristallisierte (Smp. 79–85°). Aus dem $^1\text{H-NMR.}$ -Spektrum geht hervor, dass es sich um ein Diastereoisomeren-gemisch im Verhältnis 5:1 handelt. – $^1\text{H-NMR.}$ (CDCl_3): 1,39 und 1,54 (2*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(9)$); *ca.* 2,0–2,25 (*ca.* 12H, $\text{CH}_3\text{-C}(1)$, $\text{CH}_3\text{-C}(2)$, $\text{CH}_3\text{-C}(5)$, H-C(10) und H-C(11)); 3,40, 3,50 (2*d*, $J=4$, 1H, OH); 3,75 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 5,47 und 5,72 ppm (2*d*, $J=17$, 1H, H-C(8)); 5,55 (*m*, 1H, H-C(12)); 6,43 und 6,57 (2*d*, $J=17$, 1H, H-C(7)); 6,52 (*s*, 1H, H-C(4)). – MS.: 276 (M^+ , 1%), 258 (52%), 243 (33%), 229 (39%), 199 (100%), 150 (50%).

Metabolit 6. Nach Abkühlen des rohen Lactol-Ansatzes auf 0° wurde innerhalb 1 Std. *Jones*-Reagens [17] zugegetropft. Nach beendeter Reaktion wurde das Gemisch auf Eis/Wasser gegossen und 3mal mit Äther extrahiert. Die Ätherphasen wurden 3mal mit ges. Na_2CO_3 - und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels verblieben 16,8 g eines gelben Öls. Kristallisation aus Äther/Hexan ergab 8,6 g leicht gelbliche Kristalle des Metaboliten **6** vom Smp. 58–60°. Nach chromatographischer Reinigung der Mutterlauge und Kristallisation resultierten weitere 2,8 g farbloser Kristalle vom Smp. 59–60° (52% der Theorie, ausgehend von Keton **15**). – IR. (CHCl_3): 1774, 1595, 1485. – UV. (Äthanol): 254 ($\epsilon=8600$). – $^1\text{H-NMR.}$: siehe *Tabelle 4*. – MS.: siehe *Tabelle 3*.

Metaboliten 5a und 7a. 3,6 g (0,013 mol) **6** und 40 g umkristallisiertes Pyridinhydrochlorid wurden unter Argonatmosphäre in einem Ölbad bei einer Temperatur von 190° unter Umschwenken geschmolzen. Nach 15 Min. wurde eine klare Schmelze erhalten. Nach weiterem Erhitzen für 30 Min. bei dieser Temperatur anschliessend Abkühlen wurde in Eis/Wasser und Äther aufgenommen. Die Wasserphase wurde mit 1N HCl auf pH 3 gestellt und 3mal mit Äther extrahiert. Nach Waschen der Ätherphasen mit ges. NaCl-Lösung, Trocknen über Natriumsulfat und Abdestillieren des Lösungsmittels resultierten 3,5 g eines dunkelgelben Öls, das mittels Säulenchromatographie (Fließ-

⁷⁾ Siehe Fussnote ^{a)} in *Tabelle 4*.

mittel: Hexan/Äther mit steigender Polarität) in zwei Fraktionen aufgetrennt wurde. Aus der unpolaren Fraktion konnten nach Kristallisation aus Äther/Hexan 0,46 g (13% der Theorie) des Metaboliten **7a** als farblose Kristalle vom Smp. 113,5–115° gewonnen werden. – IR. (CHCl₃): 3608, 3364, 1768, 1660, 1594. – ¹H-NMR.: siehe *Tabelle 4*. – MS.: siehe *Tabellen 2 und 3*.

C₁₆H₂₀O₃ (260,14) Ber. C 73,82 H 7,74% Gef. C 73,74 H 7,71%

Die polare Fraktion wurde mittels präp. Schichtchromatographie weiter aufgetrennt. Durch fraktionierte Kristallisation konnte der Metabolit **5a**, Smp. 130–131°, isoliert werden. – UV. (Äthanol): 226 (ε=22900) und 278 (ε=16600). – ¹H-NMR. (CDCl₃): 1,91 (*s*, 3H, CH₃-C(9)); 2,15 und 2,20 (2*s*, 3H und 6H, CH₃-C(1), CH₃-C(2) und CH₃-C(5)); 3,28 (*d*, *J*=7, 2H, H-C(11)); 5,63 (*t*, *J*=7, 1H, H-C(10)); 6,13 (*d*, *J*=16, 1H, H-C(8)); 6,49 (*s*, 1H, H-C(4)); 6,50 (*d*, *J*=16, 1H, H-C(7)). – MS.: 260 (*M*⁺, 84%), 245 (19%), 227 (9%), 215 (17%), 200 (45%), 199 (100%), 187 (78%), 185 (45%).

C₁₆H₂₀O₃ (260,14) Ber. C 73,82 H 7,74% Gef. C 73,52 H 7,80%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *W. Bollag*, *Europ. J. Cancer* **10**, 731 (1974).
- [2] *W. Bollag*, *Europ. J. Cancer* **11**, 721 (1975).
- [3] *H. Koch*, *Quintessenz*, **6**, Referat 5468 (1976).
- [4] *F. Ott & W. Bollag*, *Schweiz. med. Wschr.* **105**, 439 (1975).
- [5] *A. Schimpf*, *Z. Hautkr.* **51**, 265 (1976).
- [6] *R. Hänni, F. Bigler, W. Meister & G. Englert*, *Helv.* **59**, 2221 (1976).
- [7] *R. Hänni & F. Bigler*, *Helv.* **60**, 881 (1977).
- [8] *R. D. Zachman & J. A. Olson*, *Nature* **201**, 1222 (1964).
- [9] *P. E. Dunagin, R. D. Zachman & J. A. Olson*, *Biochim. biophys. Acta* **90**, 432 (1964).
- [10] *R. D. Zachman, P. E. Dunagin & J. A. Olson*, *J. Lipid. Res.* **7**, 3 (1966).
- [11] *H. S. Gallo-Torres & O. N. Miller*, *Proc. Soc. Exptl. biol. Med.* **130**, 552 (1969).
- [12] *W. Vetter, G. Englert, N. Rigassi & U. Schwieter*, *Carotenoids*, Ed. O. Isler, Birkhäuser Verlag Basel 1971, S. 189.
- [13] *H. Mayer, W. Bollag, R. Hänni & R. Rüegg*, *Experientia*, im Druck.
- [14] *A. Roberts & H. F. De Luca*, *Biochem. J.* **102**, 600 (1967).
- [15] *H. F. De Luca & A. Roberts*, *Amer. J. Clin. Nutr.* **22**, 945 (1969).
- [16] *G. Büchi & H. Wüst*, *J. org. Chemistry* **34**, 1122 (1969).
- [17] *C. Djerassi*, *J. org. Chemistry* **21**, 1547 (1956).