

**Versuche zur Herstellung  
selektiver Estrogenrezeptor-Modulatoren  
mit Isoflavon-, 3-Salicyloylindol- und  
3-Phenyl-4-chinolinon-Teilstrukturen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Silvia Tappmeyer**

aus Dissen TW

Berlin 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Löwe

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Rehse

Datum der Disputation: 03.09.2004

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

**Herrn Prof. Dr. W. Löwe**

am Institut für Pharmazie der  
Freien Universität Berlin angefertigt.

Für die Überlassung des interessanten Themas,  
seine freundliche, motivierende Unterstützung,  
die stete Gesprächsbereitschaft sowie die vielseitige  
Förderung danke ich ihm sehr herzlich.

Mein besonderer Dank gilt den **Kollegen des Arbeitskreises Löwe – Rica Albuschat, Astrid Lumetzberger, Anja Lüth, Sonja Wöge und Christoph Dietrich** – für das angenehme Arbeitsklima sowie ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Des Weiteren möchte ich **allen Arbeitskollegen**, insbesondere den Assistenten des Chemiepraktikums im 8. Semester, für die gute Arbeitsatmosphäre und die nicht immer nur fachlichen Diskussionen danken.

**Herrn Prof. Dr. Gust** danke ich für die Unterstützung bei den pharmakologischen Untersuchungen zur Bestimmung der zytotoxischen und der estrogenen Eigenschaften. **Frau Silke Bergemann** danke ich für die Durchführung der Zelltests. **Frau Sandra Busch** danke ich für ihre freundliche Diskussionsbereitschaft.

Insbesondere möchte ich den **Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie** für die Aufnahme der Spektren sowie ihre Freundlichkeit und Gesprächsbereitschaft danken.

**Herrn Dr. Holzmann** danke ich für die Aufnahme der FAB-Spektren und der Hochauflösung der EI-Massenspektren sowie seine freundliche Diskussionsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt **meinen Eltern** für ihre Unterstützung, **meiner Schwester Sabina** und **meinen Freunden, insbesondere Sonja**, für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre Aufmunterungen.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Brustkrebs</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Klimakterium</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1</b>	Die weiblichen Wechseljahre	2
<b>1.2.2</b>	Die Hormonersatztherapie	2
<b>1.3</b>	<b>Estrogene</b>	<b>3</b>
<b>1.4</b>	<b>Estrogenrezeptoren</b>	<b>4</b>
<b>1.4.1</b>	Die Entdeckung der Estrogenrezeptoren	4
<b>1.4.2</b>	Die funktionellen Domänen der Estrogenrezeptoren	5
<b>1.4.3</b>	<b>Rezeptoraktivierung</b>	<b>7</b>
1.4.3.1	Membranständige Estrogenrezeptoren	9
<b>1.4.4</b>	<b>Coregulatoren</b>	<b>9</b>
1.4.4.1	Coaktivatoren	10
1.4.4.2	Corepressoren	10
<b>1.4.5</b>	Alternative Aktivierungswege	11
<b>1.4.6</b>	<b>ERR: Estrogenrezeptor-verwandte Rezeptoren</b>	<b>12</b>
<b>1.4.7</b>	<b>Bindungsmodi verschiedener Liganden an ER-<math>\alpha</math> und ER-<math>\beta</math></b>	<b>13</b>
<b>1.5</b>	<b>Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren</b>	<b>19</b>
<b>1.5.1</b>	<b>Neue selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren</b>	<b>20</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Wirkmechanismus der SERM</b>	<b>23</b>

---

<b>1.6</b>	<b>Phytoestrogene</b>	<b>24</b>
1.6.1	Vorkommen der Phytoestrogene	24
1.6.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen von Phytoestrogenen mit Isoflavonstruktur	25
1.6.3	Genistein	27
1.6.3.1	Estrogenrezeptor-abhängige Wirkungen des Genisteins	27
1.6.3.2	Estrogenrezeptor-unabhängige Wirkungen des Genisteins	28
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Chemischer Teil</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Synthese von 2'-Aminoisoflavonderivaten</b>	<b>32</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Synthese des Daidzeinderivats 9</b>	<b>36</b>
3.1.1.1	Herstellung des 7-Hydroxy-4'-methoxy-2'-nitroisoflavons 4	36
3.1.1.2	Versuche zur Herstellung des Benzamids 9	38
3.1.1.2.1	Herstellung des 2'-Aminodaidzeins 6	38
3.1.1.2.2	Herstellung des 1-[2-(4-Carboxy-phenoxy)-ethyl]-piperidiniumchlorids 8	39
3.1.1.2.3	Versuch der Umsetzung des 2'-Aminodaidzeins 6 mit dem Benzoesäurederivat 8	40
3.1.1.2.4	Versuch zur Herstellung des 2'-Amino-4',7-dimethoxyisoflavons 11	40
3.1.1.2.5	Herstellung des 2'-Amino-7-hydroxy-4'-methoxyisoflavons 12	41
3.1.1.2.6	Herstellung des 2'-Amino-4',7-dimethoxyisoflavons 11	43
3.1.1.2.7	Herstellung des Benzamids 9	44
<b>3.1.2</b>	<b>Synthese des Genisteinderivats 24</b>	<b>46</b>
3.1.2.1	Herstellung des 2'-Amino-5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavons 19	46
3.1.2.1.1	Herstellung des Ethanons 16	46
3.1.2.1.2	Herstellung des 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-2'-nitroisoflavons 17	48
3.1.2.1.3	Reduktion des 2'-Nitroisoflavons 17 zu dem 2'-Aminoisoflavon 19	50
3.1.2.2	Versuche zur Herstellung des Benzamids 24	50

---

3.1.2.2.1	Herstellung des Benzamids 21	50
3.1.2.2.2	Spaltung der Methoxy-Gruppen des Benzamids 21	51
3.1.2.2.3	Herstellung des Benzamids 23	56
3.1.2.2.4	Vergleich der Protonenresonanzspektren der Benzamide 22 und 23	57
3.1.2.2.5	Herstellung des Benzamids 24	59
3.1.2.2.6	Herstellung des 2'-Aminogenisteins 25	63
<b>3.2</b>	<b>Synthese weiterer Isoflavonderivate</b>	<b>67</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Versuche zur Herstellung von 8-Aminogenisteinderivaten</b>	<b>67</b>
3.2.1.1	Versuche zur Herstellung des Ethanons 26	69
<b>3.2.2</b>	<b>Geplante Herstellung von 7-(2-Piperidinoethoxy)-genistein 29</b>	<b>71</b>
3.2.2.1	Herstellung der Piperidinoethoxy-substituierten Isoflavone 29 und 30	74
<b>3.3</b>	<b>Versuche zur Herstellung von 4'-(Piperidinoethoxy)- substituierten Salicyloylindolen</b>	<b>79</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Versuche zur Herstellung des Salicyloylindols 31</b>	<b>83</b>
3.3.1.1	Herstellung und anschließende Reduktion des Isoflavons 33	83
3.3.1.2	Reduktion des Isoflavons 32	86
3.3.1.3	Reduktion des Isoflavons 4	91
3.3.1.4	Geplante Reduktion des Isoflavons 5	96
3.3.1.5	Umsetzung von 6-Methoxyindol mit Diacetoxybenzoesäure nach Grignard	96
3.3.1.6	Umsetzung von 6-Methoxyindol mit einem Acetoxyalkoxybenzoe- säurederivat nach Grignard	98
<b>3.3.2</b>	<b>Versuche zur Herstellung des Salicyloylindols 47</b>	<b>101</b>
3.3.2.1	Versuche zur Herstellung und anschließenden Reduktion des Isoflavons 48	102
3.3.2.2	Reduktion des Isoflavons 17	103
<b>3.3.3</b>	<b>Die Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation</b>	<b>104</b>

---

<b>3.4</b>	<b>Versuche zur Herstellung von 3-Phenyl-4-chinolon-derivaten</b>	<b>108</b>
3.4.1	Versuch zur Herstellung des Chinolons 53 nach <i>Traxler</i>	110
3.4.2	Versuch zur Herstellung des Chinolons 53 nach <i>Wislicenus</i>	111
3.4.3	Herstellung des Chinolons 53 nach <i>Croisy</i>	116
3.4.4	Demethylierung des Chinolons 53	121
3.4.5	Versuch der Herstellung der Chinoline 62 oder 63	123
<b>4</b>	<b>Pharmakologischer Teil</b>	<b>125</b>
<b>4.1</b>	<b><i>In vitro</i>-Zytotoxizitätstest an der MCF-7-Zelllinie</b>	<b>125</b>
4.1.1	Ergebnisse der Zytotoxizitätstests	125
4.1.2	Vergleich der Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit den zytotoxischen Eigenschaften Genisteins	129
<b>4.2</b>	<b>Radioligandbindungsstudien am Estrogenrezeptor</b>	<b>130</b>
4.2.1	Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien	131
4.2.1.1	Radioligandbindungsstudien am ER- $\alpha$	132
4.2.1.2	Radioligandbindungsstudien am ER- $\beta$	134
4.2.1.3	Vergleich der Radioligandbindungsstudien	135
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung der estrogenen Wirkung</b>	<b>136</b>
4.3.1	Allgemeines	136
4.3.2	Ermittlung der agonistischen Wirkung	137
4.3.3	Ermittlung der antagonistischen Wirkung	139
4.3.4	Auswertung des Luciferase-Assays	140



---

<b>4.4</b>	<b>Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen</b>	<b>140</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>142</b>
<b>5.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>142</b>
<b>5.2</b>	<b>Geräte</b>	<b>142</b>
<b>5.3</b>	<b>Synthesvorschriften und analytische Daten</b>	<b>143</b>
<b>5.4</b>	<b>Pharmakologische Testungen</b>	<b>178</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Zytotoxizitätstest</b>	<b>178</b>
5.4.1.1	Kristallviolett-Assay in Mikrotiterplatten	178
<b>5.4.2</b>	<b>Der Luciferase-Assay</b>	<b>180</b>
5.4.2.1	Allgemeine zellbiologische Arbeitsmethoden	180
5.4.2.1.1	MCF-7-2a-Zelllinie	180
5.4.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	181
5.4.2.1.3	Herstellung von ct-FCS	181
5.4.2.2	Testung auf estrogenen Wirkung im Luciferase-Assay	182
5.4.2.2.1	Kultivierung der Zelllinie	182
5.4.2.2.2	Aussaat der Zellen	183
5.4.2.2.3	Substanzzugabe	183
5.4.2.2.4	Zellernte und Zellyse	183
5.4.2.2.5	Messung der Lumineszenz	183
5.4.2.2.6	Bestimmung der Zellmasse	184
5.4.2.2.7	Auswertung	184
5.4.2.3	Testung auf antiestrogenen Wirkung	184
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>185</b>
<b>6.1</b>	<b>Deutsche Zusammenfassung</b>	<b>185</b>
<b>6.2</b>	<b>Englische Zusammenfassung</b>	<b>198</b>

---

<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>202</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>213</b>
<b>9</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>218</b>
	<b>Anhang</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	