

**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

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

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1.6 | Phytoestrogene | 24 |
| 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 |
| 2 | Problemstellung | 30 |
| 3 | Chemischer Teil | 32 |
| 3.1 | Synthese von 2'-Aminoisoflavonderivaten | 32 |
| 3.1.1 | Synthese des Daidzeinderivats 9 | 36 |
| 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 |
| 3.1.2 | Synthese des Genisteinderivats 24 | 46 |
| 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 |
| 3.2 | Synthese weiterer Isoflavonderivate | 67 |
| 3.2.1 | Versuche zur Herstellung von 8-Aminogenisteinderivaten | 67 |
| 3.2.1.1 | Versuche zur Herstellung des Ethanons 26 | 69 |
| 3.2.2 | Geplante Herstellung von 7-(2-Piperidinoethoxy)-genistein 29 | 71 |
| 3.2.2.1 | Herstellung der Piperidinoethoxy-substituierten Isoflavone 29 und 30 | 74 |
| 3.3 | Versuche zur Herstellung von 4'-(Piperidinoethoxy)-substituierten Salicyloylindolen | 79 |
| 3.3.1 | Versuche zur Herstellung des Salicyloylindols 31 | 83 |
| 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 Acetoxyalkoxybenzoesäurederivat nach Grignard | 98 |
| 3.3.2 | Versuche zur Herstellung des Salicyloylindols 47 | 101 |
| 3.3.2.1 | Versuche zur Herstellung und anschließenden Reduktion des Isoflavons 48 | 102 |
| 3.3.2.2 | Reduktion des Isoflavons 17 | 103 |
| 3.3.3 | Die Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation | 104 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.4 | Versuche zur Herstellung von 3-Phenyl-4-chinolon-derivaten | 108 |
| 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 |
| 4 | Pharmakologischer Teil | 125 |
| 4.1 | <i>In vitro</i>-Zytotoxizitätstest an der MCF-7-Zelllinie | 125 |
| 4.1.1 | Ergebnisse der Zytotoxizitätstests | 125 |
| 4.1.2 | Vergleich der Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit den zytotoxischen Eigenschaften Genisteins | 129 |
| 4.2 | Radioligandbindungsstudien am Estrogenrezeptor | 130 |
| 4.2.1 | Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien | 131 |
| 4.2.1.1 | Radioligandbindungsstudien am ER- α | 132 |
| 4.2.1.2 | Radioligandbindungsstudien am ER- β | 134 |
| 4.2.1.3 | Vergleich der Radioligandbindungsstudien | 135 |
| 4.3 | Bestimmung der estrogenen Wirkung | 136 |
| 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 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 4.4 | Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen | 140 |
| 5 | Experimenteller Teil | 142 |
| 5.1 | Chemikalien | 142 |
| 5.2 | Geräte | 142 |
| 5.3 | Synthesvorschriften und analytische Daten | 143 |
| 5.4 | Pharmakologische Testungen | 178 |
| 5.4.1 | Zytotoxizitätstest | 178 |
| 5.4.1.1 | Kristallviolett-Assay in Mikrotiterplatten | 178 |
| 5.4.2 | Der Luciferase-Assay | 180 |
| 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 |
| 6 | Zusammenfassung | 185 |
| 6.1 | Deutsche Zusammenfassung | 185 |
| 6.2 | Englische Zusammenfassung | 198 |

| | | |
|----------|--------------------------------|------------|
| 7 | Literaturverzeichnis | 202 |
| 8 | Abkürzungsverzeichnis | 213 |
| 9 | Publikationsverzeichnis | 218 |
| | Anhang | |
| | Lebenslauf | |