

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer selektiver Estrogenrezeptor-Modulatoren mit Isoflavon- bzw. Azaisoflavonstruktur.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese der Isoflavonderivate **9** und **24**, deren Grundstruktur entweder vom Daidzein oder vom Genistein abgeleitet ist (Abb. 6.1).

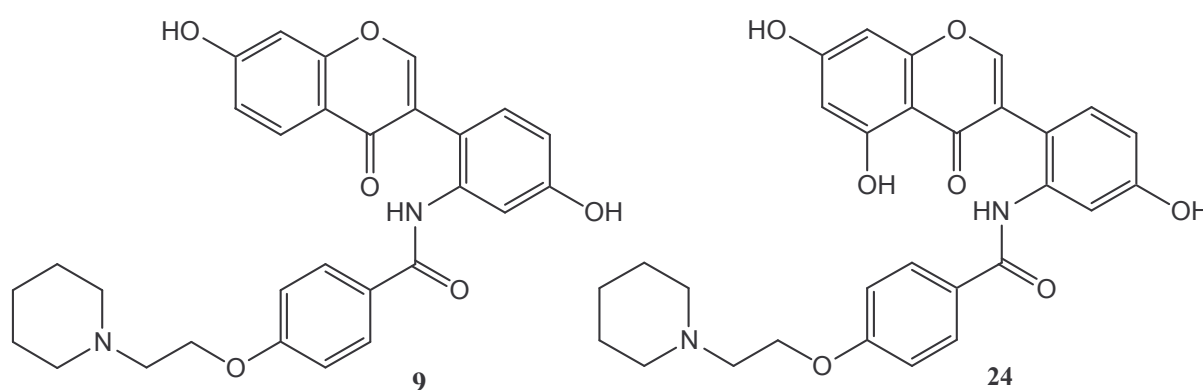


Abb. 6.1: Die Verbindungen **9** und **24**

Die Synthese beider Verbindungen beginnt mit der Herstellung des Nitrils **1**, das aus 4-Chlor-3-nitroanisol hergestellt wird.

Das Nitril **1** wird hydrolysiert, und die resultierende Phenyllessigsäure **2** kann anschließend in einer Friedel-Crafts-Alkanoylierung zu dem Ethanon **3** umgesetzt werden (Abb. 6.2). Die Verbindung **3** reagiert mit *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal in einer modifizierten Knoevenagel-Reaktion zu dem 2'-Nitroformononetin **4**. Die Reduktion der Nitro-Gruppe des Isoflavons **4** führt zu dem 2'-Aminofornononetin **12**, das mit Jodmethan zu dem dimethoxylierten Isoflavon **11** umgesetzt wird. Die Verbindung **11** reagiert mit 4-(Piperidinoethoxy)-benzoesäurechlorid zum Benzamid **15**, dessen Methoxy-Gruppen mit Bortribromid gespalten werden. Dabei entsteht das gewünschte Benzamid **9**.

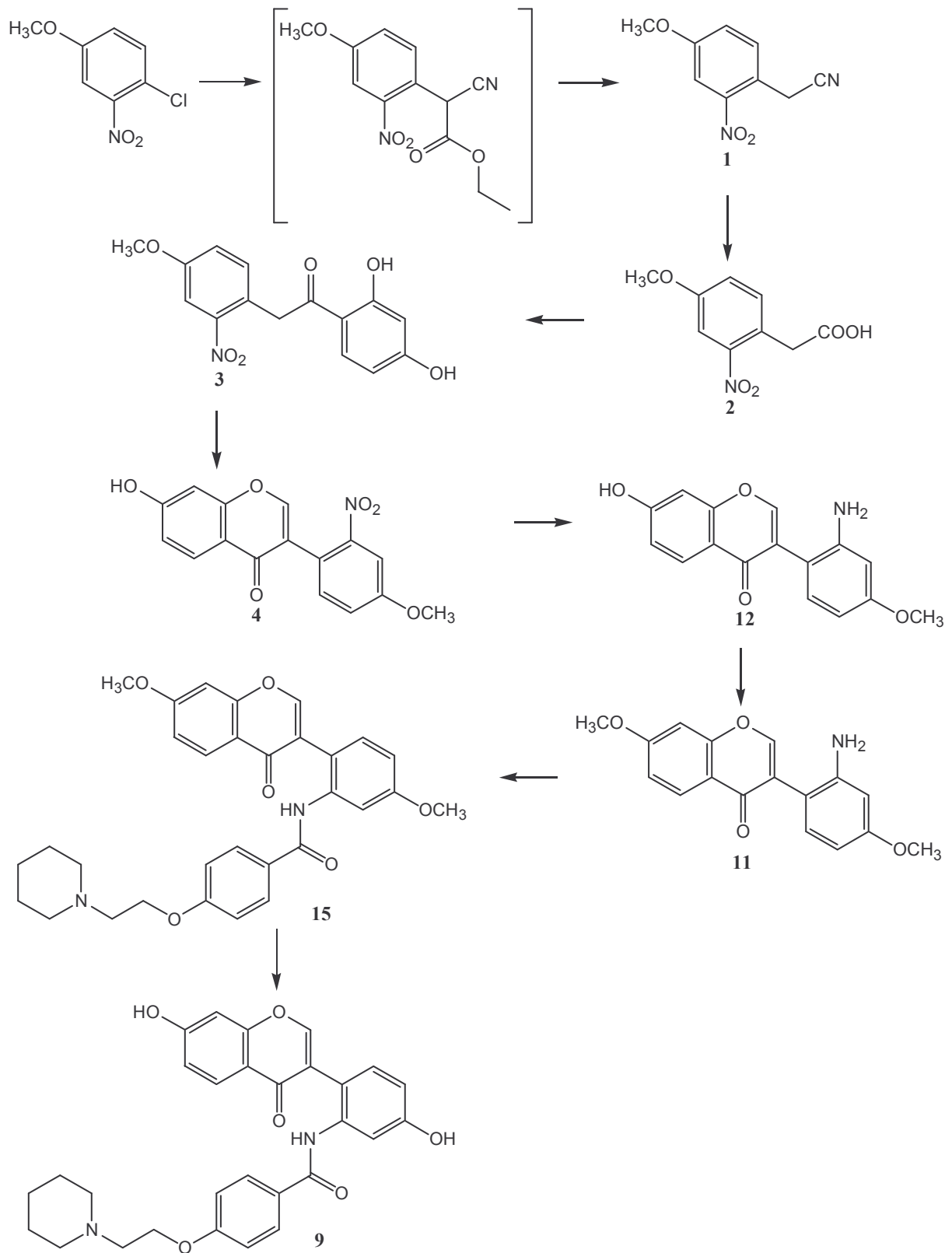


Abb. 6.2: Herstellung des Benzamids 9

Die Synthese der Verbindung **24** geht ebenfalls von dem Nitril **1** aus, das in einer Houben-Hoesch-Reaktion mit Phloroglucinol zu dem Ethanon **16** umgesetzt wird (Abb. 6.3).

Der Ringschluss des Ethanons **16** zu dem 2'-Nitrobiochanin A **17** gelingt mit Methansulfonylchlorid in DMF. Die Reduktion der Nitro-Gruppe des Isoflavons **17** führt zu dem 2'-Aminobiochanin A **19**, das mit 4-(Piperidinoethoxy)-benzoesäurechlorid zu dem Biochanin A-Derivat **23** umgesetzt wird. Die Spaltung der Methoxy-Gruppe von **23** gelingt mit Bortribromid. Nach der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wird das Genisteinderivat **24** anschließend mit etherischer HCl als Hydrochlorid gefällt.

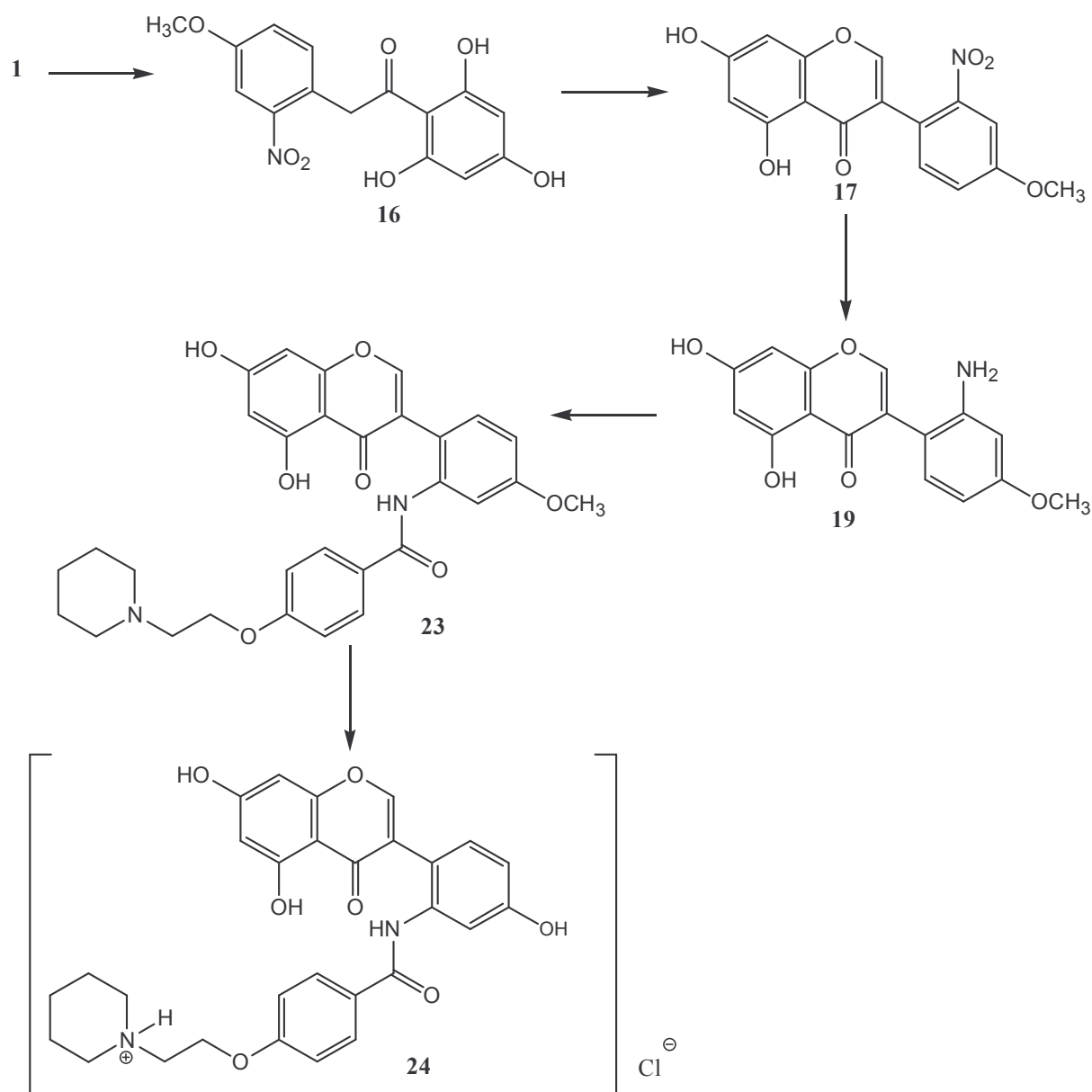


Abb. 6.3: Herstellung des Benzamids **24**

Zuvor wurde erfolglos versucht, das gewünschte Genisteinderivat **24** über das dimethoxylierte Benzamid **21** zu erhalten. Dazu wurde das Isoflavon **19** mit Jodmethan zu dem dimethoxylierten Isoflavon **20** umgesetzt, das nach Reaktion mit 4-(Piperidinoethoxy)-benzoesäurechlorid das Benzamid **21** ergibt. Die Spaltung der beiden Methoxy-Gruppen des Benzamids **21** gelingt jedoch nicht vollständig; die gewünschte Verbindung **24** entsteht nur in sehr geringen Mengen. Das Hauptprodukt der Reaktion ist das Prunetinderivat **22**, das nur noch eine Methoxy-Gruppe aufweist. Die Spaltung der verbliebenen Methoxy-Gruppe von **22** gelingt nicht mit Bortribromid.

Nach der erfolgreichen Einführung der basischen Seitenkette in Position 2' des Daidzeins und des Genisteins, sollte in einem zweiten Teil der Arbeit versucht werden, das Genistein in Position 8 mit der Seitenkette zu substituieren. Die resultierende Verbindung wird durch die Struktur **28** beschrieben (Abb. 6.4).

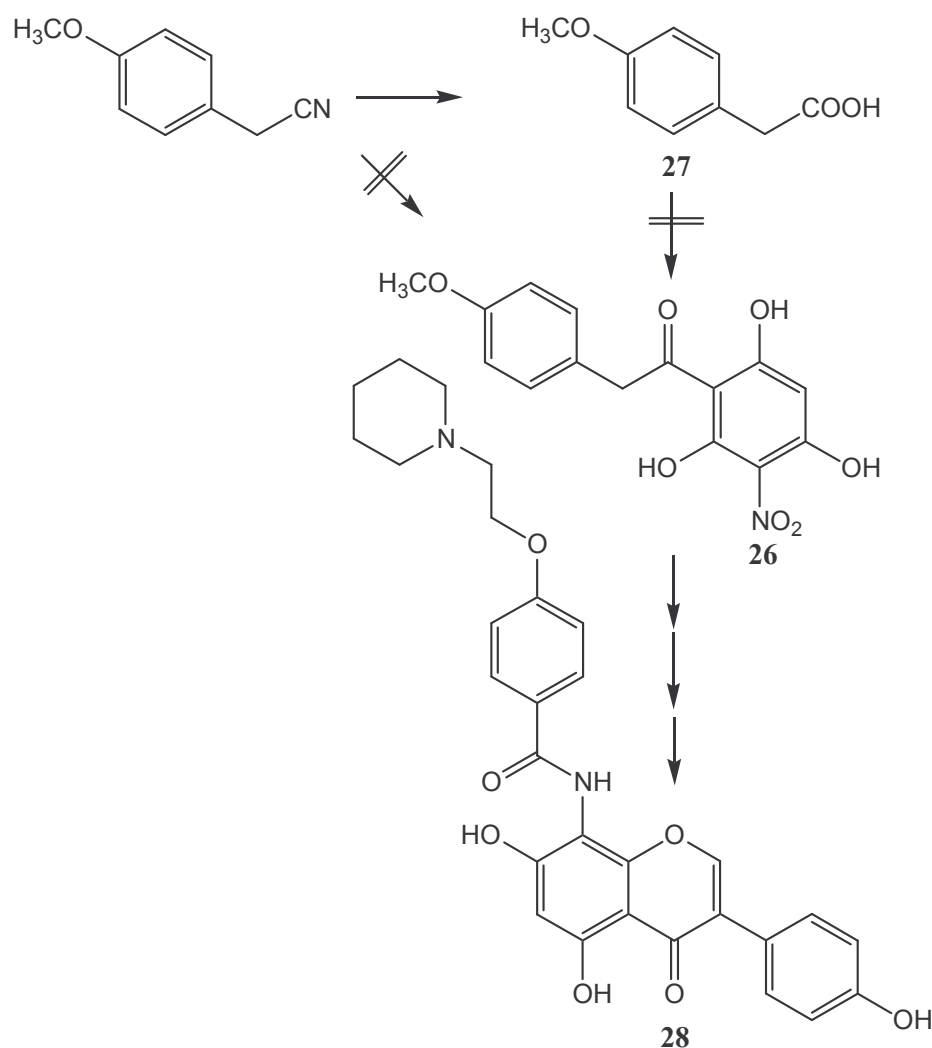


Abb. 6.4: Versuche zur Herstellung des 8-Aminogenisteinderivats **28**

Die Synthese der Verbindung **28** gelingt nicht, da das Ethanon **26** weder durch eine Houben-Hoesch-Reaktion noch durch eine Friedel-Crafts-Alkanoylierung hergestellt werden kann.

Im dritten Teil der Arbeit soll ein Genisteinderivat des Typs **29** hergestellt werden, bei dem die Seitenkette in Position 7 angelegt ist (Abb. 6.5). Bemerkenswert ist bei dieser Struktur, dass sich die komplette Piperidinoethoxybenzoylstruktur im Gesamtmolekül wieder findet.

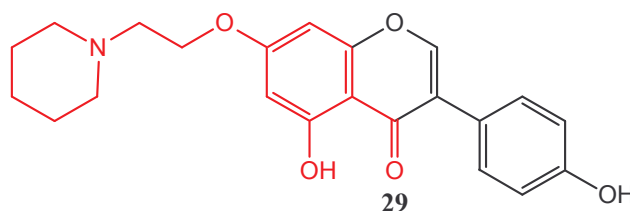


Abb. 6.5: Das Genisteinderivat **29**

Die Umsetzung von Genistein mit 1-(2-Chloroethyl)-piperidiniumchlorid führt neben dem monosubstituierten Derivat **29** auch zum disubstituierten Derivat **30**, das einen weiteren Piperidinoethoxy-Substituenten in Position 4' aufweist (Abb. 6.6).

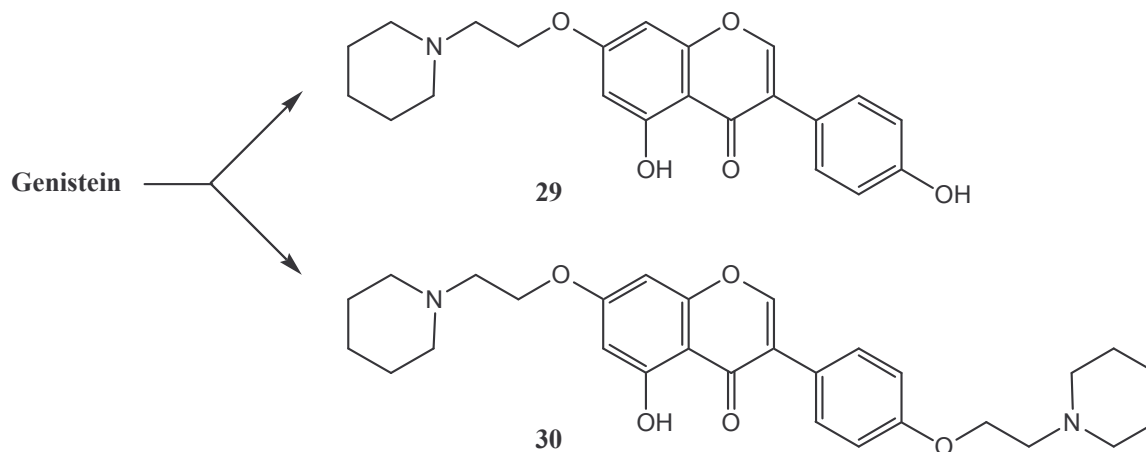


Abb. 6.6: Synthese der Genisteinderivate **29** und **30**

Die Trennung der beiden Reaktionsprodukte erweist sich als schwierig. Im Gegensatz zu der Verbindung **30** kann das monosubstituierte Derivat **29** trotz mehrfacher Reinigung durch SC nicht analysenrein erhalten werden. Die Verbindung **29** wird dennoch pharmakologischen Testungen zugeführt.

Ein vierter Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Versuch, aus 2'-Nitroisoflavonen durch die schon von *Löwe* und *Witzel* beobachtete Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation Salicyloylindole herzustellen.

Angestrebt werden dabei die Indole **31** und **47**, die sich von Daidzein- bzw. Genisteinderivaten ableiten (Abb. 6.7).

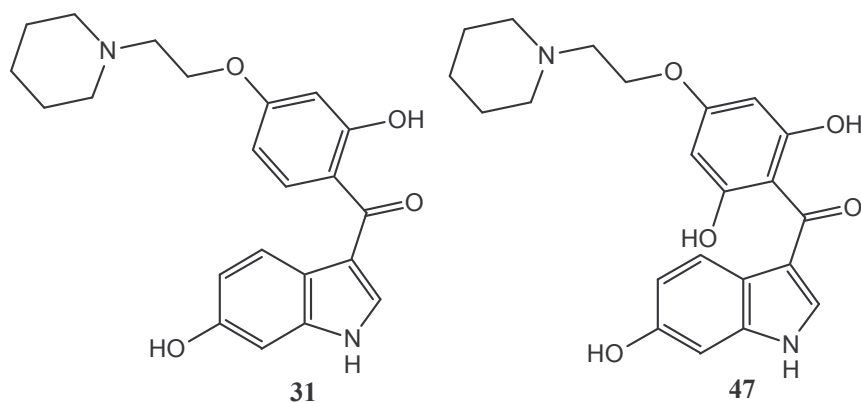


Abb. 6.7: Die Salicyloylindole **31** und **47**

Zuerst wird versucht, das Salicyloylindol **31** aus dem 2'-Nitroisoflavon **33**, das bereits in Position 7 Piperidinoethoxy-substituiert ist, herzustellen (Abb. 6.8). Nach Reduktion der Nitro-Gruppe von Verbindung **33** tritt eine Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation auf.

Im Verlauf dieser Reaktion addiert das intermediär gebildete 2'-Aminoisoflavon Michael-analog an das elektrophile C2 des Chromons. Ein energetisch ungünstiges tetrazyklisches Zwischenprodukt lagert sich dabei nach Ringöffnung in das energieärmere Salicyloylindol **31** um, das durch WBB stabilisiert ist.

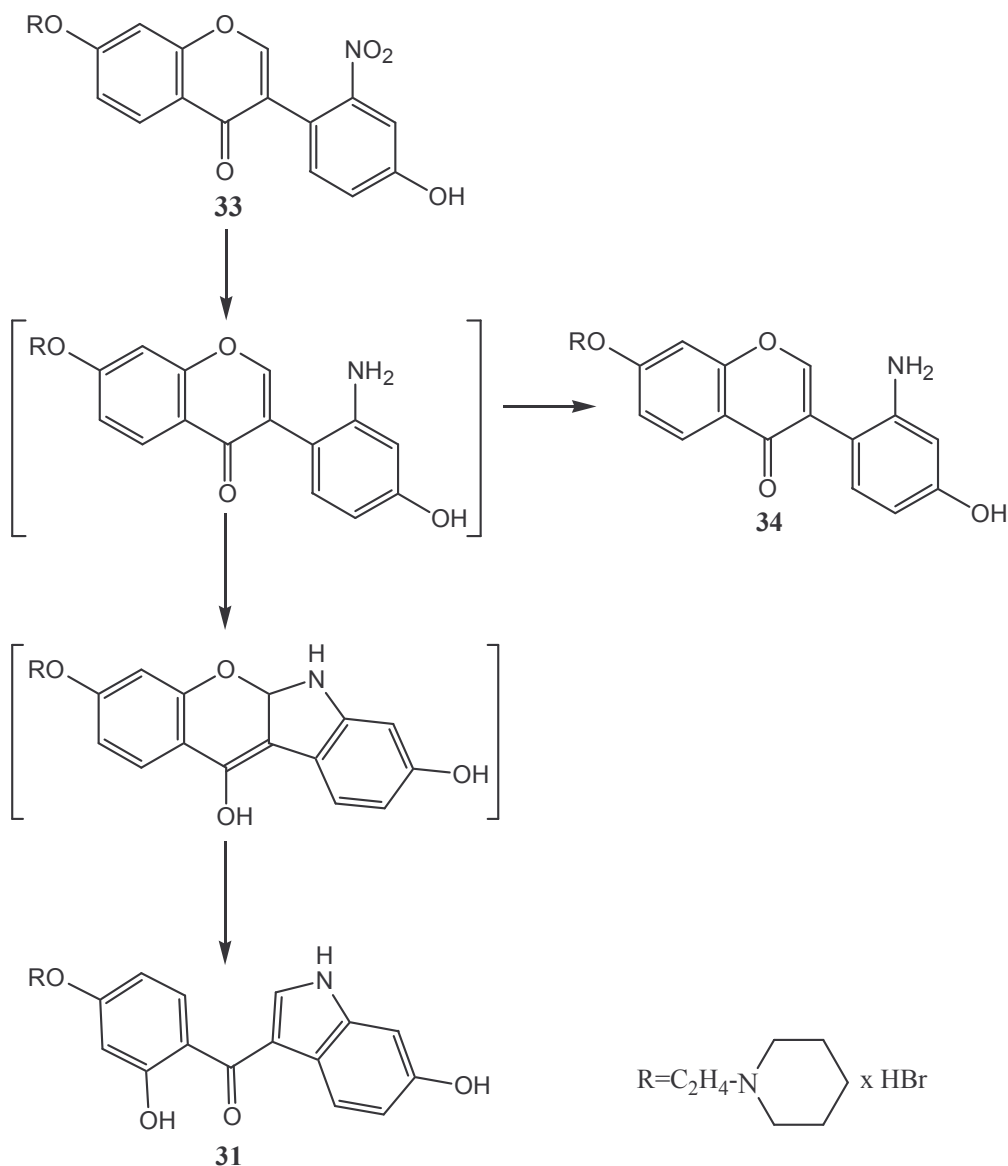


Abb. 6.8: Reduktion des Isoflavons 33

Als Nebenprodukt tritt dabei das 2'-Aminoisoflavon 34 auf. Da die Verbindungen 31 und 34 auf Grund ähnlichen Fließverhaltens nicht aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden konnten, gelang deren Charakterisierung nur mit Hilfe der Protonenresonanzspektroskopie.

Deshalb wird die Reduktion des 2'-Nitrobiochanin A-Derivats 32, das sich von dem Isoflavon 33 nur durch eine zusätzliche 4'-Methoxy-Gruppe unterscheidet, mit Zinkstaub in Essigsäure durchgeführt (Abb. 6.9).

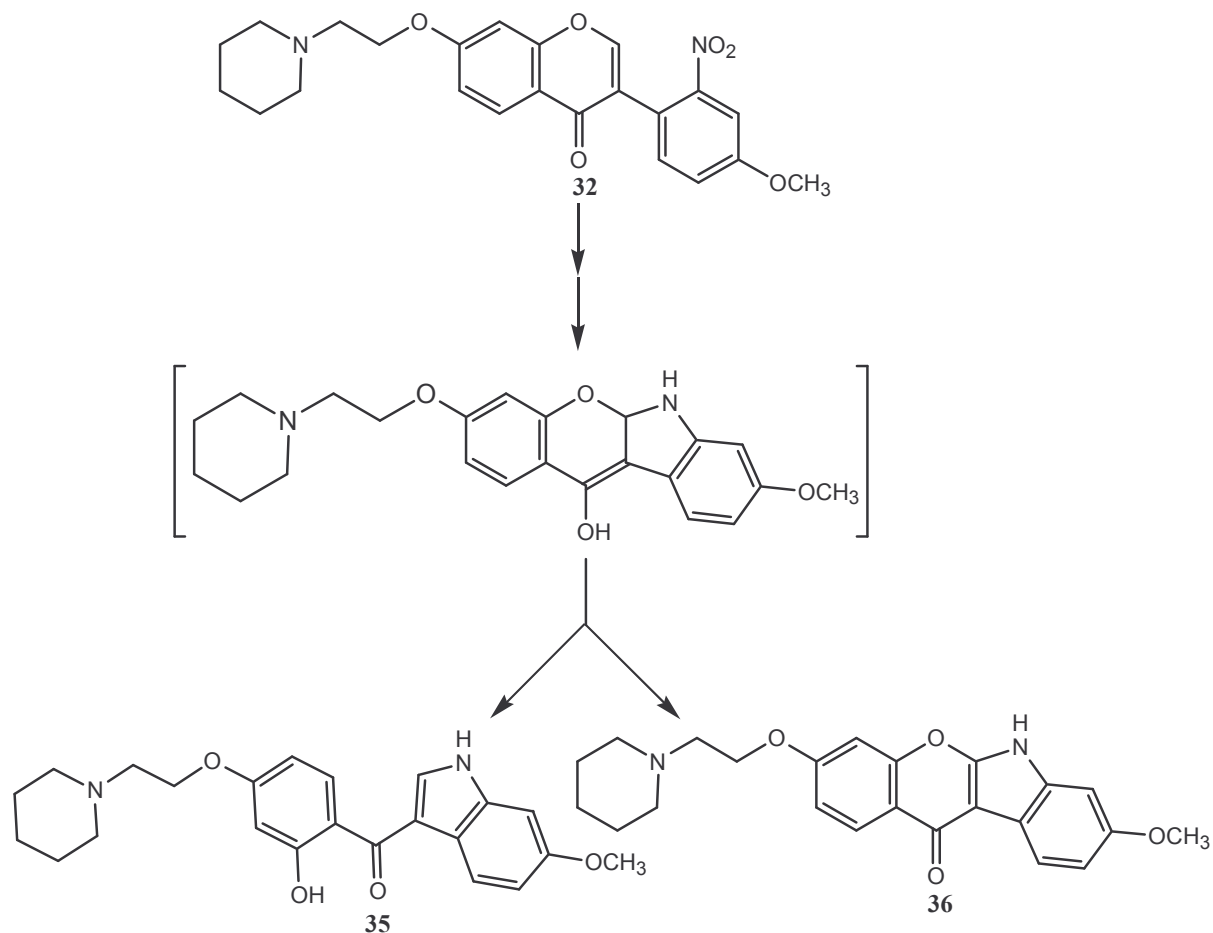


Abb. 6.9: Reduktion des Isoflavons **32**

Die Reduktion von **32** führt zu dem Salicyloylindol **35** und überraschenderweise zu dem Benzopyrano[2,3-b]indol **36**. Die Entstehung eines Aminoisoflavons wurde nicht beobachtet. Die Verbindung **36** entsteht wahrscheinlich während der Aufarbeitung durch Oxidation aus dem nicht fassbaren tetrazyklischen Zwischenprodukt der Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation. Methoxy- und Piperidinoethoxy-Substituenten scheinen das tetrazyklische Zwischenprodukt zu stabilisieren und eine Umlagerung zu dem Salicyloylindol zu erschweren. Das Benzopyrano[2,3-b]indol **36** kann vollständig charakterisiert werden, jedoch sind die Ausbeuten der Reaktion äußerst gering. Das Salicyloylindol **35** kann nur mit Hilfe der Protonenresonanzspektroskopie nachgewiesen werden.

Weitere Versuche, die oben erwähnten Salicyloylindole **31** und **47** aus 2'-Nitroisoflavonen herzustellen, scheitern.

Auch die Versuche, das Salicyloylindol **31** durch Umsetzung des Diacetoxybenzoesäurechlorids und eines Alkyloxyacetoxybenzoesäurechlorids mit 6-Methoxyindol mit Hilfe einer Grignard-Reaktion herzustellen, gelingen nicht.

In einem fünften Teil der Arbeit werden Versuche zur Herstellung der substituierten 3-Phenylchinoline **62** bzw. **63** (Abb. 6.10) beschrieben.

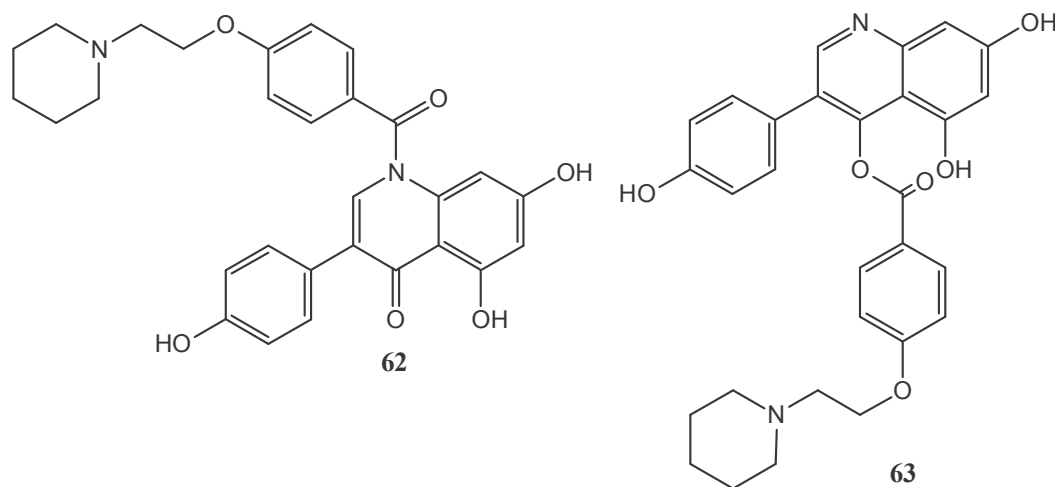


Abb. 6.10: Die Chinoline **62** und **63**

Die Synthese der Chinolongrundkörper nach *Wislicenus* geht vom Acrylat **55** aus, das aus Ethylformiat und Ethyl (4-methoxyphenyl)-essigsäureester **54** in einer Claisen-Esterkondensation zugänglich ist (Abb. 6.11). Die Verbindung **55** wird mit 3,5-Dimethoxyanilin geschmolzen. Dabei entsteht überraschenderweise das 2-Chinolon **56** und nicht das isomere 4-Chinolon **53**.

Eine Erklärung für die Entstehung des 2-Chinolons **56** folgt der Interpretation *Croisys*, die von einer Substitution des Acrylats **55** mit einem zweiten Molekül 3,5-Dimethoxyanilin ausgeht. Dabei zyklisiert das Zwischenprodukt und lagert sich unter thermischer Eliminierung des zweiten Moleküls 3,5-Dimethoxyanilin zu dem 2-Chinolon **56** um.

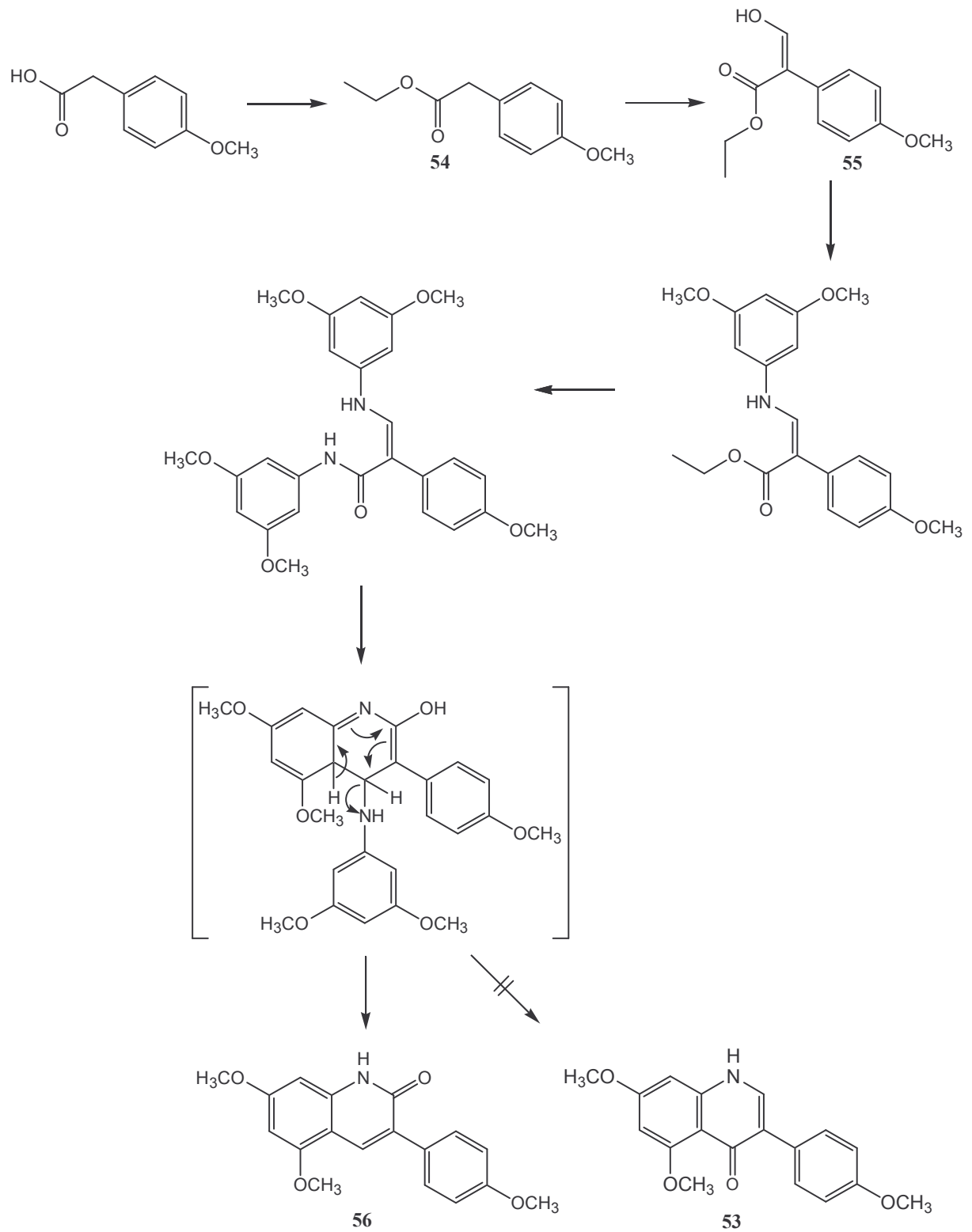


Abb. 6.11: Möglicher Mechanismus der Entstehung des 2-Chinolons **56** nach *Croisy*

Die Herstellung des gewünschten 4-Chinolons **53** gelingt schließlich nach einer Vorschrift von *Croisy*, die eng an das Verfahren nach *Wislicenus* angelehnt ist (Abb. 6.12). Diese Synthese geht auch von dem Acrylat **55** aus, das mit 3,5-Dimethoxyanilin zu einem Enaminoester umgesetzt wird, der als E-Isomer **57** und Z-Isomer **58** vorliegt. Der Ringschluss des Z-Isomers **58** zu dem 4-Chinolon **54** erfolgt mit Dowtherm A. Die Spaltung der drei Methoxy-Gruppen zu dem Chinolon **59** wird mit Pyridinhydrochlorid durchgeführt.

Die weitere Umsetzung des Chinolons **59** mit 4-(Piperidinoethoxy)-benzoesäurechlorid zu dem *N*-substituierten Chinolon **62** bzw. dem *O*-substituierten Chinolin **63** bleibt jedoch erfolglos. Es gelingt nicht, die basische Seitenkette in das Chinolon einzufügen.

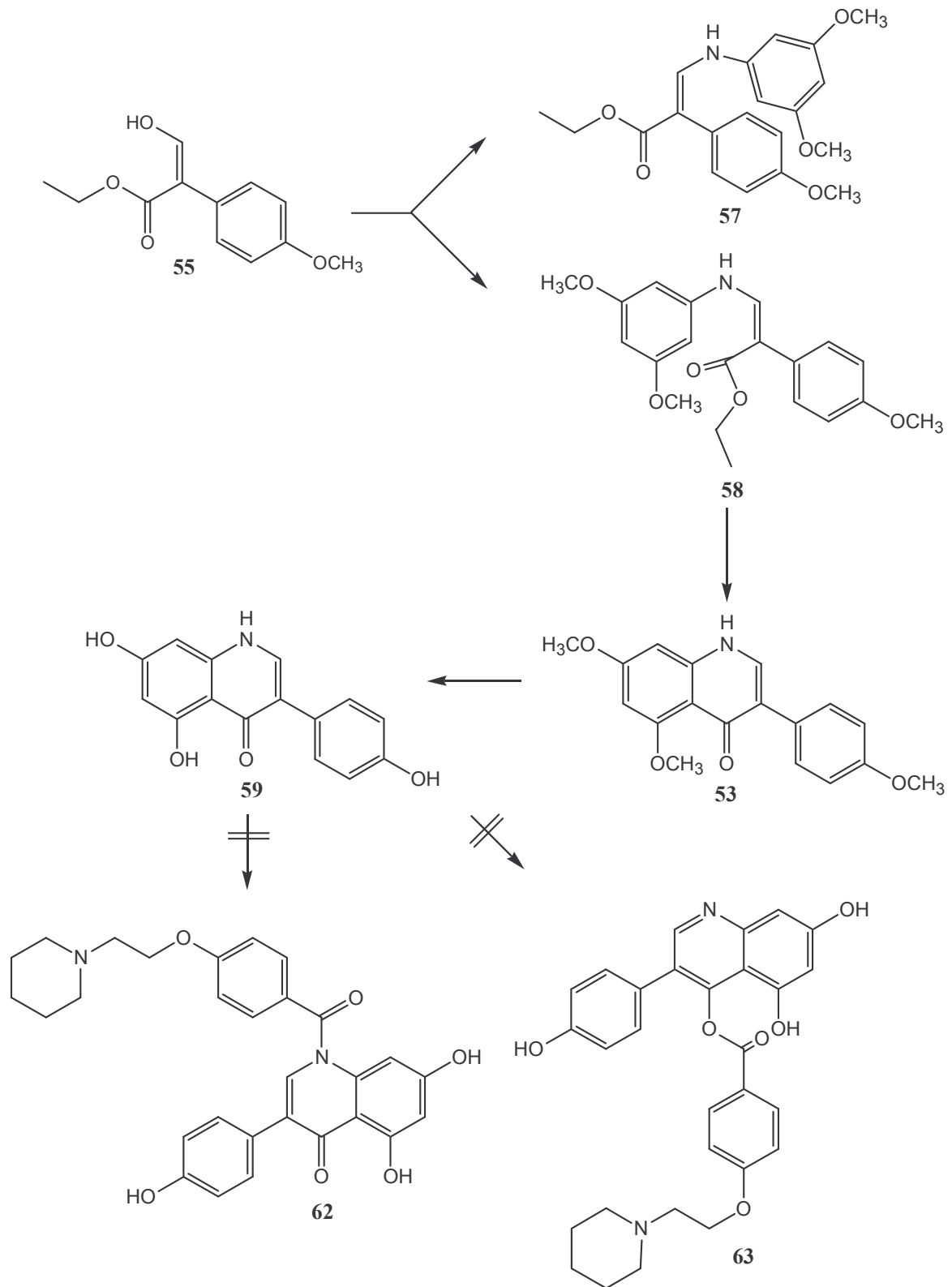


Abb. 6.12: Versuch der Herstellung der Chinolone 62 und 63

Ausgewählte Verbindungen wurden auf ihre Zytotoxizität, ihre Affinität zu den Estrogenrezeptoren und ihre estrogenen bzw. antiestrogenen Wirkungen untersucht. Im Nachfolgenden werden die sehr interessanten Ergebnisse dargestellt.

Das Phytoestrogen Genistein besitzt in Konzentrationen über 10 μM antiproliferative Eigenschaften, wohingegen es in niedrigeren Konzentrationen das Zellwachstum stimuliert. Durch die Einführung einer basischen Seitenkette in Position 2' der Isoflavonstruktur von **9** und **24** ist es gelungen, die proliferativen Eigenschaften des Genisteins zu verringern bzw. zu eliminieren. Die Benzamide **9** und **24** zeigten ebenso wie das 2'-Aminogenistein **25** weder zytotoxische noch proliferative Eigenschaften im Kristallviolett-Assay. Interessanterweise führte das Biochanin A-Derivat **23** in einer Konzentration von 5 μM zu einer anfänglichen Wachstumshemmung, wohingegen eine Konzentration von 1 μM zu einer Stimulation des Zellwachstums führte. Im weiteren Testverlauf ging das Zellwachstum jeweils wieder auf den Ausgangswert zurück.

Die Radioligandbindungsstudien an ER- α und ER- β zeigten, dass durch die Substitution mit einer basischen Seitenkette die Affinität zu ER- α zunimmt. Die Phytoestrogene Daidzein, Biochanin A und Genistein haben eine höhere Affinität zu ER- β , wohingegen das Daidzeinderivat **9** und das Biochanin A-Derivat **23** eine vierfach höhere Affinität zu ER- α aufweisen. Nur das Genisteinderivat **24** hat eine vergleichbare Affinität zu beiden ER, jedoch ist auch hier die Affinität zu ER- α geringfügig höher. Sowohl das 2'-Aminogenistein **25** als auch das 7-(Piperidinoethoxy)-genistein **29** besitzen eine höhere Affinität zu ER- β . Bei **29** ist die Präferenz für ER- β sogar siebenfach höher als die für ER- α . Es verdrängt nur 9 % des Radioliganden an ER- α , wohingegen es 66 % an ER- β verdrängt. Mit der Verbindung **29** ist es gelungen, eine deutlich β -selektive Substanz herzustellen.

Die überraschenden Ergebnisse des Luciferase-Assays zeigen, dass das Daidzeinderivat **9** keine estrogenen Eigenschaften besitzt, wohingegen das Genisteinderivat **24** estrogen wirkt. Die beiden Verbindungen unterscheiden sich nur in einer Hydroxy-Gruppe. Inwieweit diese zusätzliche Hydroxy-Gruppe der Verbindung **24** in Position **5** für die estrogenen Aktivität wichtig ist, kann bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Die ersten pharmakologischen Testungen sind trotz der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse sehr viel versprechend. Es ist überraschend, dass außer der Abwandlung des Coumestrols durch *Grese* bisher kaum Versuche unternommen wurden, die Phytoestrogene Daidzein, Genistein und andere Isoflavone strukturell abzuwandeln und ihre einzigartige Pharmakologie zu untersuchen.

6.2 Englische Zusammenfassung

For figures and schemes, please see chapter 6.1.

The aim of the present thesis was the development of selective estrogen receptor modulators based on an isoflavone or a quinolin-4-one scaffold.

The first part of this thesis deals with the synthesis of the isoflavone derivatives **9** and **24**, whose basic structures are derived from daidzein or genistein (figure 6.1).

Both syntheses start with the nitrile **1**, which can be gained from the commercially available 4-chloro-3-nitroanisole (scheme 6.2). Hydrolysis of **1** gives the corresponding phenyl acetic acid **2**. The deoxybenzoin **3** can be obtained via a Friedl-Crafts alkanoylation of **2**. Heating of **3** in the presence of *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetale gives the isoflavone **4**. Reduction of **4** affords the aminoisoflavone **12**, which is easily converted to **11** by reaction with iodo methane. Aroylation of **11** with the acid chloride of compound **8** affords compound **15**. Removal of the methyl ether protecting groups gives the desired compound **9**.

The synthesis of the genistein derivative **24** starts with nitrile **1**. The deoxybenzoin **16** is prepared by condensation of phloroglucinol and **1** via a Houben-Hoesch reaction (scheme 6.3). Treatment of **16** with methanesulphonyl chloride in DMF affords the isoflavone **17**. Reduction of **17** gives the isoflavone **19**. Aroylation of the **19** with the acid chloride of compound **8** affords compound **23**, whose methyl ether protecting group is removed by boron tribromide to afford **24**, which is taken on to the corresponding HCl salt.

The effort to gain **24** via the dimethoxy-derivative **21** failed. The isoflavone **19** is easily converted to the isoflavone **20** with iodo methane. Aroylation of **20** with the acid chloride of compound **8** affords **21**. Removal of the methyl ether protecting groups fails to some extent; the desired compound **21** can only be obtained in low amounts. The main product is the prunetin derivative **22** with one methyl ether protecting group left. The removal of the remaining protecting group with boron tribromide fails completely.

The second section of this thesis describes the synthesis of genistein derivatives which are substituted with the basic side chain in position 8. The desired compound **28** is shown in scheme 6.4.

Unfortunately, the deoxybenzoin **26** cannot be obtained via a Houben-Hoesch reaction or a Friedl-Crafts alkanoylation. Therefore the desired compound **28** cannot be gained.

The third part of the thesis deals with the synthesis of the genistein derivative **29**, bearing a (2-piperidin-1-yl)ethyl substituent in position 7 (figure 6.5). The isoflavone **29** resembles the basic side chain of selective estrogen receptor modulators.

Alkylation of genistein with 1-(2-chloroethyl)piperidine hydrochloride leads to the desired isoflavone **29** and the derivative **30**, containing two substituents in position 7 and 4' (scheme 6.6). In contrast to **30**, purification via column chromatography does not give compound **29** with acceptable purity. Nevertheless, **29** was tested for estrogen receptor binding affinity.

The aim of the next section was to obtain 3-salicyloylindoles via the aminoisoflavone-salicyloylindole ring transformation first described by Löwe and Witzel. It is planned to gain the desired compounds **31** and **47** from 2'-nitrodaidzein and 2'-nitrogenistein derivatives (figure 6.7).

In a first attempt we tried to gain the salicyloylindole **31** by reduction of the 2'-nitroisoflavone **33** containing a basic side chain in position 7 (scheme 6.8). Reduction of **33** afforded the corresponding aminoisoflavone.

The first step of the ring transformation is an intramolecular Michael-type reaction between the aromatic amino function of the intermediate 2'-aminoisoflavone and the electrophilic C2-position of the 4*H*-chromone system. The postulated tetracyclic intermediate undergoes the ring opening to the energetic more convenient 3-salicyloylindole, which is additionally stabilized by the intramolecular hydrogen bond of the salicylic moiety.

The 2'-aminoisoflavone **34** can be obtained as a side product. Unfortunately, the compounds **31** and **34** cannot be purified via column chromatography, but it is possible to prove their existence with ¹H-NMR spectroscopy.

Instead the 2'-nitrobiochanin A derivative **32** is reduced using zinc dust in acetic acid (scheme 6.9). Compared with compound **33**, the isoflavone **32** contains an extra methoxy group in position 4'. Surprisingly, reduction of **32** leads to the salicyloylindole **35** as well as to compound **36**, a benzopyranoindole. The corresponding aminoisoflavone cannot be obtained. Oxidation of the postulated tetracyclic intermediate compound of the aminoisoflavone-salicyloylindole ring transformation leads to compound **36**. The intermediate compound seems to be stabilized by the methoxy- and the (1-piperidinyl)ethoxy group. This substitution pattern prevents the ring opening of the tetracyclic intermediate to an energetic more convenient 3-salicyloylindole. The amounts of **36** and **35** are rather low, and though **36** can be fully described, the existence of **35** can only be proved by ¹HNMR spectroscopy. Further attempts to gain the salicyloylindoles **31** and **47** via ring transformation fail.

The effort to prepare compound **31** by reaction of diacetoxy benzoyl chloride or alkoxy acetoxy benzoyl chloride and 6-methoxyindole via Grignard reaction fails.

The aim of the fifth section was to obtain the quinolin-4-one derivatives **62** and **63** (figure 6.10).

The synthesis of the quinolin-4-one according to *Wislicenus* starts with compound **55** which can be obtained from ethyl formic acid and (4-methoxyphenyl) acetic acid ethyl ester **54** via Claisen reaction (scheme 6.11). One pot reaction of **55** with 3,5-dimethoxyaniline and thermal cyclization unexpectedly gives the quinolin-2-one **56**; the desired quinolin-4-one **53** cannot be obtained. According to *Croisy*, this can be explained by amidation of the ester function which results from the substitution of a second molecule 3,5-dimethoxyaniline to give an amide whose aniline group is thermally eliminated.

The desired quinolin-4-one **53** can finally be obtained via a reaction similar to the *Wislicenus* synthesis. Substitution of **55** with one molecule 3,5-dimethoxyaniline gives a mixture of the Z-acrylate **57** and the E-acrylate **58** (scheme 6.12). Thermal cyclization of **58** in boiling dowerm A leads to **53**, whose methyl ether protecting groups are removed by pyridine hydrochloride to give the quinolin-4-one **59**. Unfortunately, arylation of **59** with 4-(1-piperidinyl)ethoxy benzoyl chloride fails. It is not possible to gain neither the quinolin-4-one **62** nor the quinoline **63**.

Several compounds were tested for their cytotoxicity, their affinity to the estrogen receptor- α and - β and their estrogenic or antiestrogenic activity. The highly interesting results are shown below.

The phytoestrogen genistein displays antiproliferative activities in a concentration $> 10 \mu\text{M}$. In lower concentrations ($< 10 \mu\text{M}$) it is able to simulate cell growth. Substitution with a basic side chain in position 2' of the isoflavone derivatives **9** and **24** causes diminution of the proliferative activities, as shown in the cytotoxicity test in MCF-7 cells. The compounds **9**, **24** and the 2'-aminogenistein **25** have neither cytotoxic nor proliferative effects. Interestingly, the biochanin A derivative **23** first inhibits cell growth in a concentration of $5 \mu\text{M}$, but in lower concentrations ($< 1 \mu\text{M}$) it stimulates cell growth. In both cases cell growth rates get back to their starting-points.

Radioligand binding studies on ER- α and ER- β show the increase in affinity for ER- α by substitution with a basic side chain in position 2' of the isoflavones. The phytoestrogens daidzein, genistein and biochanin A show a higher affinity for ER- β , but their derivatives **9**

and **23** have a fourfold higher affinity for ER- α . Only the genistein derivative **24** shows a similar affinity for both ER, but even here the affinity for ER- α is slightly higher.

Interestingly, the small 2'-aminogenistein **25** and the 7-(2-piperidin-1-yl)ethoxy genistein **29** show a higher affinity for ER- β , even sevenfold higher in case of compound **29**. It replaces only 9 % of the radioligand at ER- α , but 66 % at ER- β . The isoflavone derivative **29** is an ER- β selective compound.

The surprising outcome of the luciferase assay is that the genistein derivative **24** shows estrogenic activity whereas the daidzein derivative **9** does not. The only structural difference between both compounds is the additional hydroxyl group of the genistein derivative **24**. How far this group is important for the estrogenic activity could not be determined yet.

The first pharmacological results are promising. It is surprising that –besides *Grese* and his coumestrol derivatives- no further attempts were undertaken to synthesize daidzein, genistein or different isoflavone derivatives to learn more about their fascinating pharmacology.