

**Tetramethyltetrahydro-1,4-anthrachinonazobenzoesäure,
ein 5-Lipoxygenase-Inhibitor mit zelldifferenzierender Aktivität.
Untersuchungen an 1,4-Naphthochinonen, 28. Mitt. ¹⁾**

G. Wurm, R. Probst und S. Schwandt

Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin,
Königin-Luise-Str. 2+4, D-14195 Berlin-Dahlem

**Tetramethyltetrahydro-1,4-anthraquinonebenzoic Acid,
a 5-Lipoxygenase-Inhibitor with Cell Differentiating Activity.
1,4-Naphthoquinones, XXVIII ¹⁾**

The combination of 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition and retinoid activity in one molecule could be a suitable tool for the topical psoriasis therapy. The anellation of the 5-LOX inhibitor **1** with the tetramethylcyclohexane moiety to the arotinoid structure **2** does not fulfil this expectation. This compound was not able to differentiate HL-60 cells to granulocytes. The exchange of the 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl substituent by benzoic acid and the synthesis of **8** resulted in the loss of 5-LOX inhibition also. The construction of **10** by the introduction of an azo spacer between the anthraquinone moiety and benzoic acid of **8** finally led to the expected compound: **10** was potent 5-LOX inhibitor and concomitant differentiated HL-60 cells as measured by the NBT test.

Keywords: 5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthraquinone Derivatives. Arotinoid Structure, 5-Lipoxygenase, HL-60 Differentiation

Einleitung

Die Psoriasis in ihren verschiedenen Formen ist eine multifaktorielle Hauterkrankung, gekennzeichnet durch Störungen der Keratinozyten-Differenzierung, Hyperproliferation und Entzündung. 5-Lipoxygenase (LOX)-Inhibitoren zeichnen sich durch Hemmung von Zellproliferation und Entzündung aus. Mit dem 2-Aryl-1,4-naphthochinon **1** (Abb. 1) gelang uns die Entwicklung eines lipophilen, potenten 5-LOX Hemmers.¹⁾ Die Kombination von 5-LOX Inhibition und zelldifferenzierender Aktivität in einer Verbindung erschien uns als interessantes Pharmakamodell für die topische Psoriasis-therapie. Zell-differenzierend durch Aktivierung von Retinoidrezeptoren (RAR) wirken Vitamin-A Säure und Arotinoide wie Am 580²⁾ (Abb. 2) als aromatisch zyklisierte Analoga.

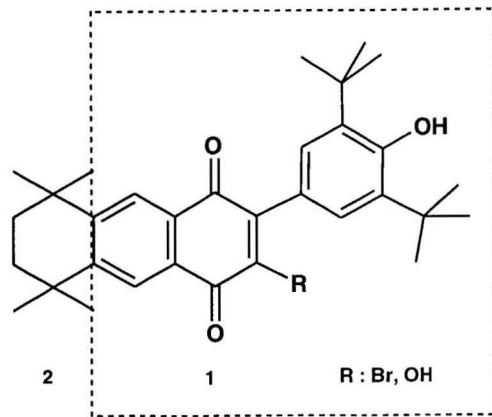


Abb. 1: Anellierung des 5-LOX Inhibitors **1** zu **2** mit Arotinoid-Struktur

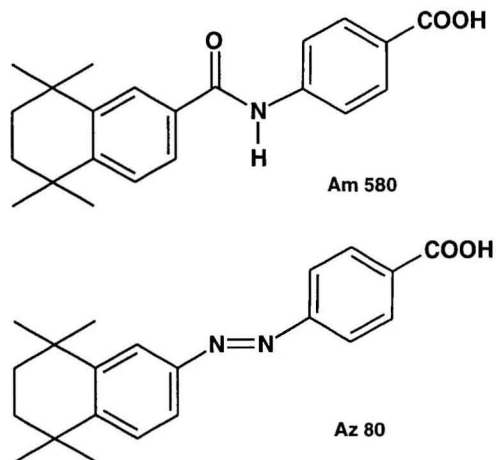


Abb. 2: Modell-Arotinoide mit Retinoid-Aktivität

Durch Anellierung des 5-LOX Inhibitors **1** mit Tetramethylcyclohexen und der Synthese des partiell hydrierten 1,4-Anthrachinons **2** (Abb. 1) unternahmen wir einen ersten Versuch zur Realisierung des Konzepts. Da 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon- und -anthrachinonderivate als vinyloge Carbonsäuren die Acidität der Benzoesäure besitzen, verzichteten wir zunächst auf die Einführung der bis auf wenige Gegenbeispiele^{3a,b)} für Retinoide und Arotinoide charakteristischen Carboxylgruppe.

Ergebnisse und Diskussion

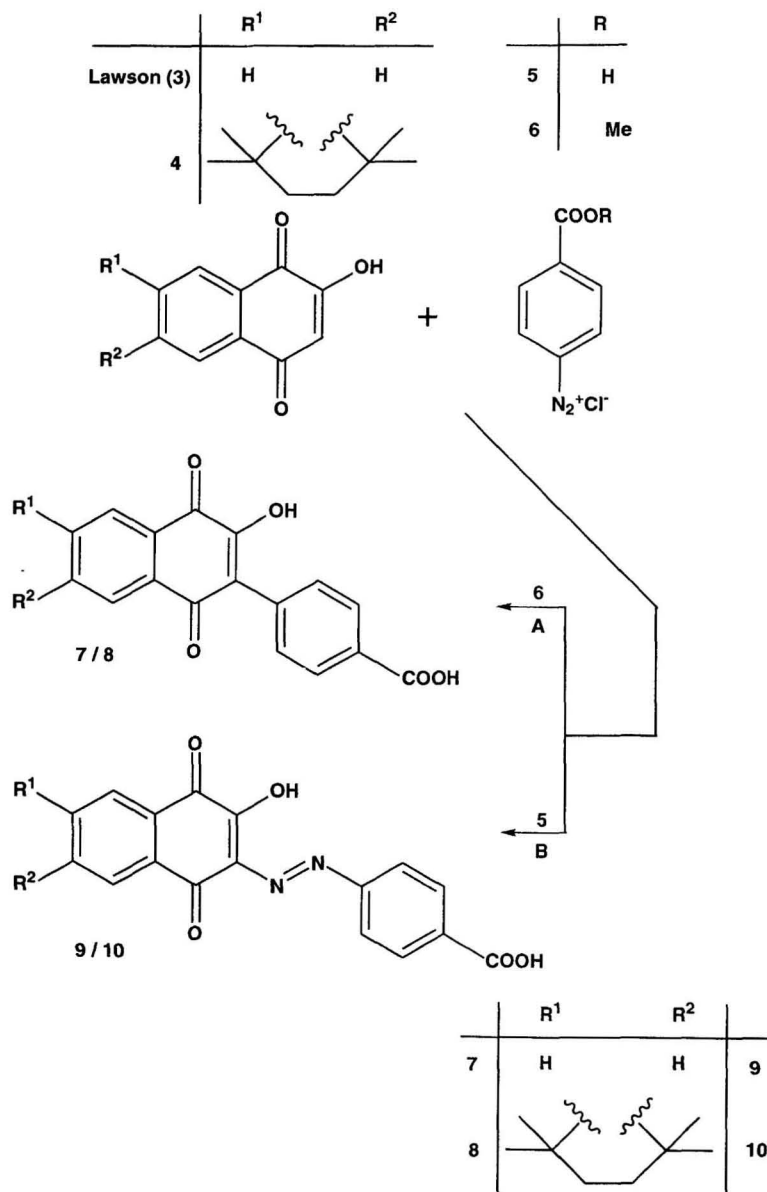
Das Tetramethylcyclohexenderivat **2** war wie **1** ein 5-LOX Inhibitor im mikromolaren Bereich, gegenüber **1** aber mit abgeschwächter Aktivität wegen der erheblichen Lipophilieerhöhung⁴⁾ (Tab. 1). Im Test an HL-60 Zellen im Vergleich mit Tretinoin zeigte die Verbindung jedoch keine differenzierenden Eigenschaften. Deshalb wurde im nächsten Schritt der Di-tert-butylhydroxyphenylrest durch Benzoessäure ersetzt (**7/8**, Schema 1) und auf diesem Weg mit **8** eine charakteristische Arotinoidstruktur generiert. (Schema 1).

Tab. 1: 5-LOX Hemmung, HL-60 Differenzierung und logP-Werte der Naphthochinon- und Anthrachinonbenzoessäuren **7 – 10** mit den 2,6-Di-tert-butylphenyl-Analoga **1** und **2**

Verbindung	logP	5-LOX Hemmung	5-LOX	NBT-Test
		IC ₅₀ (µM) [%-Hemmung: c = 10 µM]	%-Aktivierung: c = 10 µM	%-Differenzierung(HL-60): c = 1 µM
1	4.3	3.9	—	inaktiv
2	6.2	4.8	—	inaktiv
7	0.9	inaktiv	25 ± 3	inaktiv
8	1.3	[22 ± 4]	—	inaktiv
9	0.9	[36 ± 4]	—	inaktiv
10	3.9	1.4	—	125 ± 6
Tretinoin	6.4	[55 ± 3]	—	100

Die Synthese dieser Zielverbindungen erfolgte entsprechend Schema 1 durch Reaktion von Lawson (**3**) bzw. dem kondensierten Lawsonderivat **4** mit den Carboxybenzoldiazoniumchloriden **5** und **6**. Reaktion in stark alkalischer Lösung (Weg A) führt unter Arylierung⁵⁾ zu den substituierten Benzoessäuren **7** und **8**, Umsetzung in schwach alkalischem Milieu (Weg B) liefert durch Azokupplung die Azobenzoessäurederivate⁶⁾ **9** und **10**.

Auch **8** differenziert HL-60 Zellen nicht zu Granulozyten, außerdem besitzt die Verbindung keine 5-LOX hemmenden Eigenschaften mehr. Das nicht anellierte Derivat **7** erhöht sogar die Enzymaktivität. Stimulierung der humanen 5-Lipoxygenase haben wir bei unseren Arbeiten bisher noch nicht beobachtet.



Schema 1: A: H₂O-KOH (30 %) / 45°C. B: NaOAc-EtOH

Das chinoide Derivat **10** des aktiven Arotinoids Az 80⁷⁾ (Abb. 2) führte im Vergleich mit Tretinoin im NBT-Test⁸⁾ schließlich zu stärkerer Zelldifferenzierung als das Standard-Retinoid und ist überraschend der potenteste von uns bisher hergestellte 5-LOX inhibitor (Tab. 1), wodurch wir das Untersuchungsziel erreicht haben. Im Gegensatz hierzu sind bei dem nicht anellierten Naphthochinon **9** beide Aktivitäten nicht mehr nachweisbar. Von wesentlicher Bedeutung hierfür ist sicherlich der extreme Lipophilieunterschied von **9** ($\log P = 0.9$) und **10** ($\log P = 3.9$). In einer früheren Untersuchung⁴⁾ an zahlreichen analogen Verbindungen konnten wir zeigen, dass in der Reihe der substituierten Phenyl-naphthochinone der Lipophilieparameter $\log P$ für die 5-LOX Hemmung von wesentlicher Bedeutung ist, die $\log P$ -Werte potenter 5-LOX Inhibitoren dieser Verbindungsklasse liegen zwischen **4** und **5**. Durch Überführung des Naphthochinons **9** in das partiell hydrierte Anthrachinon **10** erreicht $\log P$ diesen Schwellenwert.

Während Tretinoin bei Absenkung der Konzentration um eine Größenordnung im NBT-Test immer noch Aktivität zeigt, ist diese für **10** nicht mehr nachweisbar. Wir schließen daraus, dass diese Verbindung ihre zell-differenzierende Aktivität nicht durch Aktivierung von Retinoidrezeptoren sondern über einen anderen Mechanismus bewirkt.

Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben

Schmp.: Linström-Gerät, nicht korrigiert. Elementaranalysen: Elemental Analyzer 140 B, Perkin-Elmer. Die Ergebnisse der C-H-N-Werte entsprachen in den Grenzen von $\pm 0.4 \%$ absolut den berechneten Werten. MS: Finnigan MAT CH 7A. EI-MS: Ionisierungsenergie 70 eV. IR-Spektren: Gitter-Spektralphotometer 421, Perkin-Elmer. ¹H-NMR-Spektren: Bruker AC 300 (300 MHz, TMS als innerer Standard). Die Auswertung der Spektren erfolgte nach den Regeln 1. Ordnung, hieraus resultieren die teilweise nicht identischen J-Werte. SC: Kieselgel 60 Merck, 0.063-0.2 mm. HPLC: Merck Hitachi (L-6200 Intelligent Pump, D-4250 UV-VIS Detector, D-2500 Chromato-Integrator), Säule (Et 250/4 Nucleosil 100-5 C₁₈, Machery-Nagel). Festphasenextraktion: RP-18 Säulen (Baker), Zellisolierung: Polymorphprep Nycomed (Lieferfirma Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe). Kulturmedium für HL-60 Zellen: RPMI 1640-Medium ohne Phenolrot (Fa. Biochrom, Berlin). Mikrotiterplatten – 96 Kavitäten – (Becton Dickinson Labware, N.J. USA).

Arylierung von 2-Hydroxy-1,4-naphthochinonderivaten mit Benzoessäure

1 mmol 4-Aminobenzoessäuremethylester (**6**) suspensiert in 2 mL 6N HCl wird bei 0°C unter Rühren durch Zutropfen der Lösung von 1 mmol NaNO₂ in 5 mL H₂O diazotiert. Diese Lösung wird unter Rühren langsam zur Lösung von 1 mmol der 2-Hydroxy-1,4-naphthochinonderivate **3** bzw. **4** in 30 mL KOH (30 %) getropft. Die Ansätze werden auf 45 °C erwärmt und nach 15 min und Abkühlen auf RT in 30 mL H₂O gegossen, mit HCl angesäuert und mit weiteren 50 mL H₂O verdünnt. Die abfiltrierten und getrockneten Ausfällungen werden aus AcOH kristallisiert.

4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure (7)

Aus **3** (Lawson), gelbe feinkristalline Substanz, Ausbeute 60 %, Schmp. 290 °C. (Zers.). $C_{17}H_{10}O_5$ (294.3). MS: m/z (%) = 294 (M^+ , 100), 249 [(M-COOH)⁺, 71]. IR (KBr): 1656, 1687 (CO), 3357 (OH) cm^{-1} . ¹H-NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.50 (s, breit, 1H, COOH), 10.90 (s, 1H, OH), 8.06 (m, 2H), 7.98 (m, 2H), 7.90 (m, 2H), 7.83 (m, 2H).

4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure (8)

Aus **4**⁴⁾, das Rohprodukt wurde vor der Kristallisation aus AcOH sc mit CH_2Cl_2 -Dioxan (9 + 1) gereinigt. Gelbe feinkristalline Substanz, Ausbeute 17 %, Schmp. 230°C (Zers.). $C_{25}H_{24}O_5$ (404.5). MS: m/z (%) = 404 (M^+ , 18), 359 [(M-COOH)⁺, 11]. IR (KBr): 1699 (CO), 3440 (OH) cm^{-1} . ¹H-NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.9 (s, breit, 1H, COOH), 11.3 (s, breit, 1H, OH), 7.9 (m, 4H), 7.52/7.50 (2s, 2H, 9-H/10-H), 1.69 (s, 4H, 6-H₂/7-H₂), 1,31/1.30 (2s, 12H, 5-Me₂/8-Me₂).

Arylazoderivate aus 2-Hydroxynaphthochinonen

1.5 mmol 4-Aminobenzoesäure (**5**) in 1.5 mL 6N HCl werden mit 1.5 mmol NaNO₂ in 7.5 mL H₂O wie unter 3.2 beschrieben diazotiert. Diese Lösung wird zu den Mischungen aus 1 mmol der 2-Hydroxynaphthochinone **3** bzw. **4** in 36 mL EtOH und 1.7 mmol NaOAc in 3 mL H₂O getropft. Die Ansätze werden 12 h bei RT gerührt. Danach wird EtOH im Vakuum abdestilliert, die abgesaugten und getrockneten Präzipitate werden sc mit CH_2Cl_2 /Dioxan (9 + 1) gereinigt. Die eingeeengten Hauptfraktionen werden aus AcOH kristallisiert.

4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-azo)-benzoesäure (9)⁹⁾4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-5,5,8,8-tetramethyl-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure (10)

Aus **4**, Ausbeute 90 %, orangefarbene Kristalle, Schmp. 278 °C. (Zers.). $C_{25}H_{24}O_5N_2$ (432.5). MS: m/z (%) = 432 (M^+ , 33), 404 [(M-CO)⁺, 21]. IR (KBr): 1696 (CO), 2965 (CH), 3433 (OH) cm^{-1} . ¹H-NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) = 15.0 (s, 0.5 H, OH), 14.7 (s, 0.5 H, OH): Bei > 100°C fließen die beiden Singulets zu einem breiten Signal zusammen¹⁰⁾ 13.2 (s, 1H, COOH), 8.16 – 8.03 (m, 4H ar.), 7.76/7.74 (2s, 2H, 9-H/10-H), 1.74 (s, 4H, 6-H₂/7-H₂), 1.35/1.34 (2s, 12H, 5-Me₂/8-Me₂).

Bestimmung der 5-Lipoxygenase-Hemmung

Das Literaturverfahren¹¹⁾ wurde in folgender Weise modifiziert: Die Isolierung der humanen Granulozyten erfolgte aus Citratvollblut mittels Polymorphprep®. Die in DMSO gelösten Testsubstanzen wurden mit den in PBS suspendierten Granulozyten versetzt und nach 10 min weitere 5 min lang mit CaCl₂ vorinkubiert. Danach wurde die Enzymreaktion mit Calciumionophor A 23187 gestartet und nach 5 min mit Nordihydroguajaretsäure (gelöst in MeOH/CH₃CN) abgebrochen. Nach Festphasenextraktion wurde der Entzündungsmediator LTB₄ mittels HPLC quantifiziert. Zur Bestimmung der Enzymhemmung wurden die Mittelwerte der LTB₄-Produktion in Anwesenheit (n =

4) und Abwesenheit (n = 4) der Testsubstanzen ins Verhältnis gesetzt. Die Hemmung war statistisch signifikant verglichen mit den Kontrollwerten (Student t-Test, P < 0.05).

Bestimmung der Lipophilie (logP)

Die Methode¹²⁾ beruht auf dem linearen Zusammenhang zwischen der logarithmierten sc Kenngröße „Kapazitätsfaktor“ (logK) einer Verbindung und ihrem ebenfalls logarithmierten Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logP). Dazu werden die logK'-Werte von vier Vergleichsverbindungen (Anisol, Toluol, Naphthalin und Anthracen) mit literaturbekannten logP-Werten (2.11, 2.69, 3.44 und 4.49) über RP-HPLC ermittelt und daraus eine Kalibriergerade erstellt (Korrelationskoeffizient > 0.99; n = 3). Für die Bestimmung der Lipophilie unbekannter Substanzen werden nach Messung ihrer logK'-Werte die logP-Parameter berechnet.

Beeinflussung der Zelldifferenzierung, NBT-Test

Die potentiell zelldifferenzierende Aktivität der neuen Verbindungen wurde an Human-Leukämiezellen (HL-60) mit der NBT-Reaktion⁸⁾ geprüft. Die NBT-Reaktion weist photometrisch die Zunahme von Superoxid-Anionen in stimulierten Phagozyten nach. Dieser Vorgang wird mittels Reduktion des 4-Nitroblautetrazoliumchlorid zu einem violetten Formazan quantifiziert.

Als Vergleichssubstanz wurde Vitamin-A-Säure (Tretinoin) herangezogen. Die HL-60 Zellen wurden in Suspensionskulturen in RPMI-Medium herangezogen.

Zur Prüfung der Testsubstanzen (Konzentration: 10^{-6} M) auf Zytotoxizität wurde der MTT-Test¹³⁾ genutzt. Dabei erwiesen sich die HL-60 Zellen auch nach fünftägiger Inkubation als überlebensfähig im Vergleich zur Kontrolle.

Literatur

- 1 27. Mitt.: Wurm G., Schwandt S. (1999), Pharmazie 54: 7.
- 2 Kagechika H., Kawachi E., Hashimoto Y., Shudo K. (1999), J. Med. Chem. 32: 834.
- 3 a) Klaus M., Mohr P., Weiss E., Eur. Pat. Appl. EP 331,981 ref. CA 112, 118441d.
b) Hoffmann-La Roche F., Austrien, Co.A.-S., AT 388,728 ref. CA 112,98391g.
- 4 Wurm G., Probst R., Schwandt S. (2001), Pharmazie, im Druck.
- 5 Neuhoeffer O., Weise J. (1938), Ber. Dtsch. Chem. Ges. 71: 2703.
- 6 Kvalnes D.E. (1934), J. Am. Chem. Soc. 56: 2478.

- 7 Shudo K., Kagechika H., Himi T., Namikava K., Hashimoto Y. (1989), J. Med. Chem. 32: 1098.
- 8 Gallagher R.E., Gallo R.C. (1979), J. Exp. Med. 149: 969.
- 9 Grinev A.N., Arkhangel'skaya N.V., Uretskaya G.Y. (1969), Zh. Org. Khim. 5: 1472.
- 10 Probst R. (1999), Dissertation Freie Universität Berlin.
- 11 Dannhardt G., Lehr M. (1992), J. Pharm. Pharmacol. 44: 419.
- 12 Unger G.H., Cook J.R., Hollenberg J.S. (1978), J. Pharm. Sci. 67: 1364.
- 13 Mosmann T. (1983), J. Immunol. Methods 65: 55.

*Eingelangt am 16. Juli 2001
Angenommen am 24. August 2001*