

Pharmakologische Untersuchungen  
am Estrogenrezeptor

## 5 Pharmakologische Untersuchungen am Estrogenrezeptor

Die synthetisierten Verbindungen wurden auf ihre pharmakologische Wirkung an verschiedenen, in der Arbeitsgruppe Gust etablierten, Testsystemen untersucht. Dabei wurden Untersuchungen am Estrogenrezeptor (ER) und an der TGF- $\beta$ -Signalkaskade (Kapitel 6, Seite 122) durchgeführt.

### 5.1 Testsysteme

Mit einem Konkurrenzexperiment (RBA-Test) am isolierten ER wurde die Fähigkeit der Verbindungen untersucht, gebundenes Estradiol aus der Bindungsstelle in der Ligandenbindungsdomäne des ER zu verdrängen. Das hierbei verwendete Kalbsuteruscytosol enthält die beiden Subtypen  $\alpha$  und  $\beta$  des Estrogenrezeptors; es ist aber deutlich mehr ER $\alpha$  enthalten [Kuiper, 106]. Da es sich beim RBA-Test um ein reines Verdrängungsexperiment handelt, ist es mit diesem Test nicht möglich Aussagen über die agonistischen bzw. die antagonistischen Eigenschaften der Verbindungen zu machen. Das wichtigere Testsystem ist daher ein Luciferase-Assay, mit dem die agonistische bzw. die antagonistische Wirkung *in vitro* untersucht werden kann. Die dabei eingesetzte MCF-7-2a Zelllinie, die durch stabile Transfektion aus der Brustkrebszelllinie MCF-7 erhalten wurden [Meyer, 175; Koop, 176], enthält fast nur ER $\alpha$ . Das Vorhandensein von ER $\beta$  konnte in MCF-7 Zellen nicht nachgewiesen werden [Watanabe, 6].

Testsysteme zur Untersuchung der selektiven Wirkung an ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  werden derzeit in der Arbeitsgruppe Gust etabliert, standen aber für diese Arbeit noch nicht zur Verfügung.

### 5.1.1 Relativen Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor

Zur Bestimmung der relativen Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor (RBA-Wert) bedient man sich des von der European Organization for Research on Treatment of Cancer vorgeschlagenen "Dextran Coated Charcoal Verfahrens" [EORTC, 177, Korenman, 178]. Dabei wird ein radioaktiv markierter, möglichst spezifischer Ligand ( $[^3\text{H}]$ -Estradiol) durch den zu testenden Wirkstoff kompetitiv vom Rezeptor geeigneter Gewebeproben verdrängt. Zur Bestimmung der RBA-Werte werden die Testsubstanzen bzw. unmarkiertes Estradiol in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Der nichtgebundene Anteil an  $[^3\text{H}]$ -Estradiol wird anschließend an dextranbeschichtete Aktivkohle gebunden und entfernt. Mit Hilfe der verbliebenen Radioaktivität ( $\beta$ -Strahlung) lässt sich der RBA-Wert bestimmen (Kapitel 8.4.1, Seite 197).

Als Quelle für den Estrogenrezeptor dienen die Uteri frisch geschlachteter Kälber, aus denen sich estrogenrezeptorhaltiges Cytosol gewinnen lässt. Auch aus den Uteri anderer Tiere (z. B. Lamm, Kaninchen, Ratte oder Maus) gewonnenes Cytosol kann verwendet werden [Maass, 179].

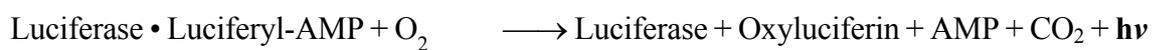
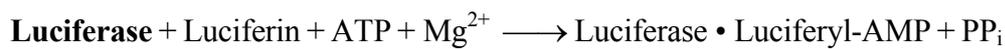
Naturgemäß kann aus den Ergebnissen dieses Tests nicht zwischen Agonisten und Antagonisten unterschieden werden. Außerdem trifft er keine Aussage über die Metabolisierung der Testsubstanzen und dessen Folgen. Außerdem Aussagen lassen sich nur aufgrund weiterer *in vitro*- und *in vivo*- Versuche treffen.

### 5.1.2 Testung der agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung im Luciferase-Assay

#### 5.1.2.1 Allgemeines

Mit Hilfe eines Luciferase-Assays kann die agonistische bzw. die antagonistische Wirkung der Verbindungen *in vitro* bestimmt werden. Dazu wurde die MCF-7-2a Zelllinie eingesetzt, die mit dem Plasmid  $\text{ERE}_{wtc} luc$  stabil transfiziert ist. Dieses Plasmid enthält das estrogen response element der DNA als Enhancersequenz und das Reporterogen *luc* aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*, das für das Enzym Luciferase codiert. Auf die Bindung von Wirkstoffen an die LBD des ER folgt eine Dimerisierung des ER und die Bindung an die EREs des Plasmids. Dies führt zur Luciferase-Exprimierung, die gut mit der estrogenen Wirkung der Verbindungen korreliert. [Hafner, 180, von Angerer, 181].

Nach Inkubation mit den Testverbindungen werden die Zellen mit Hilfe eines „cell lysis“ Puffers zerstört. Das Lysat wird zentrifugiert um größere Zellbruchstücke zu entfernen und der Überstand, ein Proteinextrakt, vermessen (Kapitel 8.4.2, Seite 199). Die Detektion der vorhandenen Luciferasemenge im Extrakt erfolgt durch Zugabe des Luciferase-Assay-Reagenzes, das im Luciferase-Assay-Kit der Fa. Promega enthalten ist. Hierbei katalysiert die Luciferase folgende Schritte einer Chemolumineszenz-Reaktion [de Wet, 182]:



Die Lichtemission, die mit einem Luminometer mit automatischer Substratinjektion gemessen wird, setzt unmittelbar bei Reaktionsbeginn ein und klingt sehr schnell ab. Nach einer Minute verbleiben nur noch etwa 10 % der Spitzenaktivität. Im Substrat enthaltenes Coenzym A steigert die gesamte Lichtausbeute um ein Vielfaches [Wood, 183]. Der Wellenlängenbereich des emittierten Lichtes erstreckt sich von 490 - 630 nm [Hoffmann, 184]. Die Messung der relativen Lichtausbeute (Einheit: relative light units: RLU) erfolgt über den gesamten Empfindlichkeitsbereich des Luminometers (390 - 520 nm) und eine Periode von 10 s.

### 5.1.2.2 Ermittlung der agonistischen Wirkung

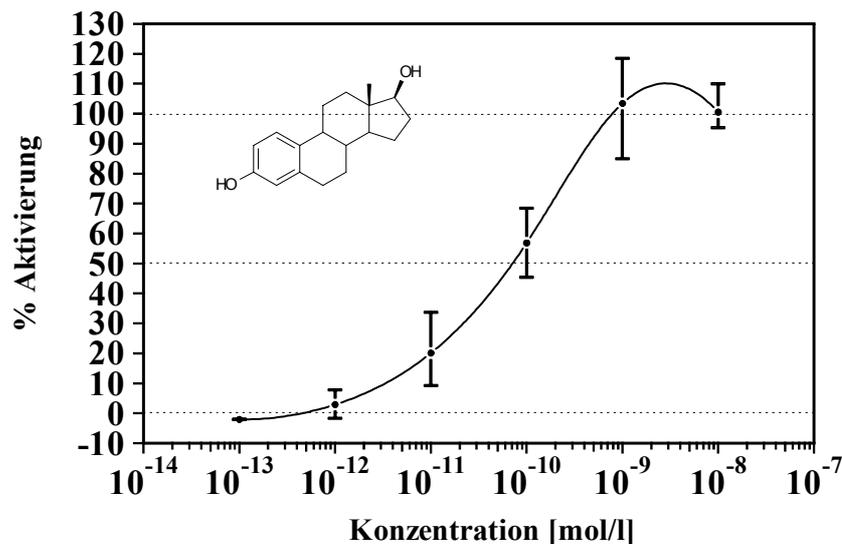
Um Kenntnis über die estrogene Wirkung einer Verbindung zu erhalten, bestimmt man die Konzentrationsabhängigkeit der Stimulierung einer substanzbedingten Luciferase-expression (Konzentrations-Wirkungs-Kurve, z. B. E2, Abb. 5.1).

MCF-7-2a-Zellen werden hierfür mit verschiedenen Konzentrationen des Agonisten inkubiert. Zur Kontrolle inkubiert man auch Zellen mit dem Lösungsmittel (Background) sowie mit einer festen Estradiolkonzentration (Kontrolle,  $10^{-8}$  M). Nach 50 h beendet man den Versuch und bestimmt die Luciferase-Aktivität ( $\text{RLU}_{10\text{s}}$ ).

Die gemessene Luciferase-Aktivität ( $\text{RLU}_{10\text{s}}$ ) kann mit Hilfe einer Eichgeraden in die gebildete Menge an Luciferase umgerechnet werden (Kapitel 8.4.2.2.5, Seite 202).

Um Schwankungen der Luciferasemenge, die auf unterschiedlicher Zellmenge beruhen, zu berücksichtigen, wird zusätzlich eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Kapitel 8.4.2.2.6, Seite 203).

Um verschiedene Testergebnisse miteinander vergleichen zu können, bezieht man die Aktivität der Verbindungen auf die Aktivität der  $10^{-8}$  M Estradiollösung. Alle Ergebnisse lassen sich nun bezogen auf die Stimulierung durch Estradiol in % Aktivierung ausdrücken (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1:** Konzentrationsabhängige Luciferase-Expriemierung durch 17 $\beta$ -Estradiol.

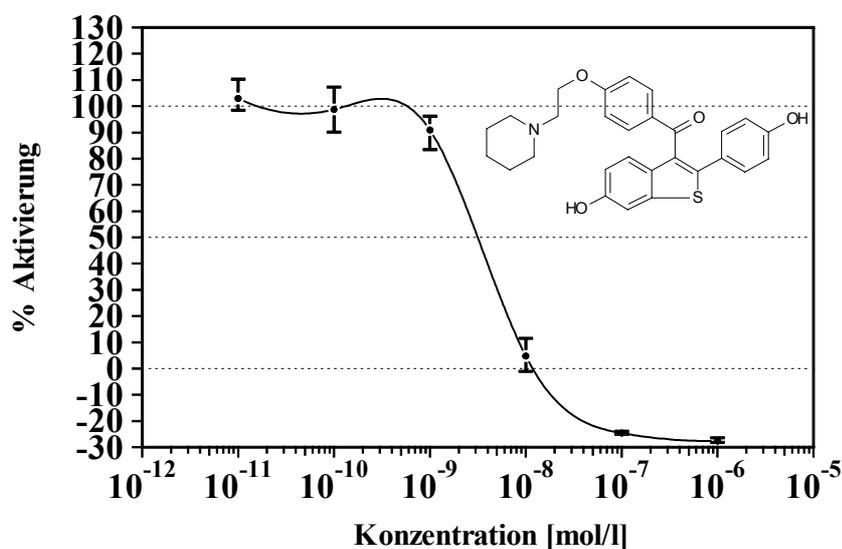
Aus den Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen kann der  $EC_{50}$ -Wert bestimmt werden. Dabei handelt es sich um die Konzentration der Testsubstanz, die benötigt wird, um 50 Prozent Luciferase-Aktivierung einer Estradiollösung zu erzielen. Mit Hilfe des  $EC_{50}$ -Werts von Estradiol ( $EC_{50} = 8 \cdot 10^{-11}$  M, Abb. 5.1) kann der RTP-Wert anderer Verbindungen berechnet werden:

$$RTP = \frac{EC_{50}(\text{Estradiol})}{EC_{50}(\text{Testverbindung})} \cdot 100\%$$

Bei dieser relativen Transkriptionspotenz (RTP) handelt es sich um eine analog dem RBA-Wert berechnete Größe, die ein Maß für die agonistische Aktivität der Verbindungen bezogen auf Estradiol darstellt.

### 5.1.2.3 Ermittlung der antagonistischen Wirkung

Die antagonistischen Eigenschaften der Verbindungen werden im selben Testmodell bestimmt. Hierzu werden die MCF-7-2a Zellen zusätzlich zu den verschiedenen Konzentrationen der Verbindungen mit einer festen Estradiolkonzentration ( $10^{-9}$  M) inkubiert, um die mit E2 maximal mögliche Luciferaseexpression zu stimulieren. Antagonistisch wirksame Verbindungen sind hierbei in der Lage, die durch den Estradiolzusatz verursachte Aktivierung der Luciferaseexpression abzuschwächen (z. B. Abb. 5.2).



**Abb. 5.2:** Konzentrationsabhängige Abschwächung der durch  $10^{-9}$  M Estradiollösung vermittelten Luciferase-Exprimierung durch Raloxifen.

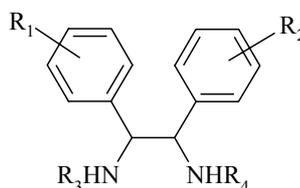
Analog dem  $EC_{50}$ -Wert der agonistisch aktiven Verbindungen lässt sich für antagonistisch wirksamen Verbindungen der  $IC_{50}$  bestimmen. Dabei handelt es sich um die Konzentration eines Antagonisten, bei der die Luciferase-Aktivierung auf 50 % des E2-Werts reduziert ist. Für Raloxifen beträgt der  $IC_{50}$ -Wert  $3 \cdot 10^{-9}$  M (Abb. 5.2).

## 5.2 Testergebnisse

### 5.2.1 Relative Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor

#### 5.2.1.1 1,2-Diamino-1,2-diarylethane

Die Diaminodiarylethane wurden ausgehend vom Estrogen Hexestrol entwickelt (Kapitel 1.3, Seite 20). Die mit dem Austausch der beiden Ethylseitenketten durch Aminogruppen verbundene Steigerung der Hydrophilie führt zu einem Verlust der Bindungsaffinität zum ER (**64**, Tab. 5.1). Durch Halogenierung der beiden Aromaten und durch Alkylierung der Aminofunktionen können die hydrophilen Eigenschaften reduziert werden und somit die RBA-Werte gesteigert werden.



Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Konfiguration	RBA [%]
Hexestrol						<b>27.04</b>
<b>64</b>	4-OH	4-OH	H	H	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )	< <b>0.001</b> <sup>a</sup>
<b>101</b>	2-F,4-OH	2-F,4-OH	H	H	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )	< <b>0.01</b> <sup>b</sup>
<b>66</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	H	H	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )	<b>0.07</b> <sup>b</sup>
<b>102</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2-Cl,4-OH	H	H	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )	<b>1.50</b> <sup>c</sup>
<b>103</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	H	H	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )	<b>0.45</b> <sup>d</sup>
<b>104</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	Ethyl	H	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )	<b>16.83</b> <sup>d</sup>
<b>105</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	Ethyl	Ethyl	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )	<b>20.88</b> <sup>d</sup>
<b>100</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	Formyl	H	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )	<b>1.75</b>
<b>106</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2-Cl,4-OH	H	H	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )/(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )	<b>0.50</b> <sup>c</sup>

Tab. 5.1: RBA-Werte von 1,2-Diamino-1,2-diarylethanen (<sup>a</sup> Keilitz [149], <sup>b</sup> Karl [185], <sup>c</sup> Gust [134], <sup>d</sup> Gust [136]).

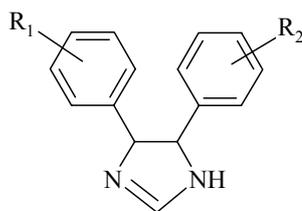
Mit steigender Zahl und Größe der lipophilen Substituenten in den Aromaten und damit verbundener Erhöhung der Lipophilie steigt der RBA-Wert an (**64** < **101** < **66** < **102**). Nur das mit vier Chloratomen substituierte (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethan **103** (RBA = 0.45 %) fällt aus der Reihe, da es einen niedrigeren RBA-Wert besitzt als das entsprechende mit insgesamt drei Chloratomen substituierte Diaminoethan **102** (RBA = 1.50 %).

Durch Alkylierung der Aminogruppen einiger  $(1R,2S)/(1S,2R)$ -konfigurierten Verbindungen ist ebenfalls eine Steigerung des RBA-Wertes zu verzeichnen ( $103 < 104 < 105$ ), wobei das  $N,N'$ -diethylierte Diamin **105** mit einem RBA von 20.88 % herausragt.  $(1R,2S)/(1S,2R)$ -konfigurierte Verbindungen haben höhere RBA-Werte als  $(1R,2S)/(1S,2R)$ -konfigurierte Diaminoethane (**102**: RBA = 1.50 %, **106**: RBA = 0.50 %).

Beim Hydrolyseprodukt **100** des Imidazolins **70** kann es, wie bei den Diaminoethanen, zu synklinalen und antiperiplanaren Anordnungen der Aromaten kommen (Kapitel 4.2.1.2, Seite 78), daher sollte es im ER zu ähnlichen Wechselwirkungen kommen. Interessanterweise zeigt das  $N$ -Formyl-Derivat **100** mit einem RBA von 1.75 eine höhere Affinität zum ER als das entsprechende Diaminoethan **66** (Tab. 5.1).

### 5.2.1.2 4,5-Diaryl-2-imidazoline und 1,3-Dialkyl-4,5-diarylimidazoliniumbromid

Der Ringschluss der 1,2-Diamino-1,2-diarylethane zu den 4,5-Diarylimidazolininen führt zu deutlich reduzierten RBA-Werten (z. B. **72**: RBA = 0.08 % bzw. **102**: RBA = 1.50 %). Bis auf **72** haben alle Imidazoline keinen zahlenmäßig erfassbaren RBA-Wert (Tab. 5.2).

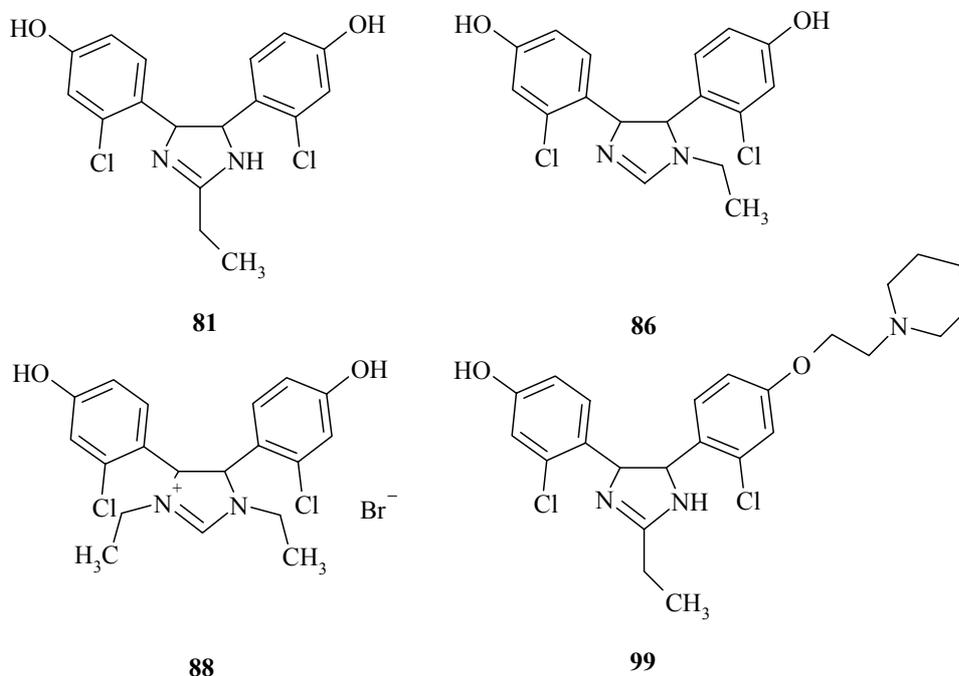


Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Konfiguration	RBA [%]
<b>68</b>	4-OH	4-OH	$(4R,5S)/(4S,5R)$	<0.02 <sup>a</sup>
<b>107</b>	2-F,4-OH	2-F,4-OH	$(4R,5S)/(4S,5R)$	<0.02 <sup>a</sup>
<b>70</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	$(4R,5S)/(4S,5R)$	<0.02 <sup>a</sup>
<b>72</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2-Cl,4-OH	$(4R,5S)/(4S,5R)$	<b>0.08<sup>a</sup></b>

Tab. 5.2: RBA-Werte von 4,5-Diaryl-2-imidazolininen (<sup>a</sup> Gust [186]).

Weitere ausgewählte Strukturen dieser Arbeit zeigen ebenfalls sehr niedrige RBA-Werte (Tab. 5.3). Weder  $C$ -Alkylierung (**81**),  $N$ -Alkylierung (**86**),  $N,N'$ -Dialkylierung (**88**) des Imidazolinrings noch die Einführung basischer Seitenketten in einen Aromaten

der 2-Imidazoline (**99**) führt zu RBA-Werten über 0.02 %. Daher wurde auf die Bestimmung der RBA-Werte der restlichen Verbindungen auf Grund der geringen Aussagekraft der RBA-Werte für 2-Imidazoline verzichtet.



Verbindung	RBA [%]
<b>81</b>	<0.02
<b>86</b>	<0.02
<b>88</b>	<0.02
<b>99</b>	<0.02

Tab. 5.3: RBA-Werte von alkylierten 4,5-Diaryl-2-imidazolinen.

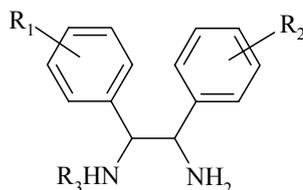
### 5.2.2 Agonistische Wirkung

Die agonistische Wirkung aller Verbindungen wurde im Luciferase-Assay bestimmt. Dabei wurden sechs Konzentrationen im Bereich von  $10^{-10}$  M bis  $10^{-5}$  M eingesetzt. Diese Kurven sind im Anhang abgebildet (Kapitel 9.2, Seite 212). In den folgenden Tabellen sind für alle Verbindungen die relative Aktivierung einer  $10^{-6}$  M Lösung in Prozent angegeben. Für Verbindungen, die im gemessenen Konzentrationsbereich einen  $EC_{50}$ -Wert aufweisen, ist dieser zusammen mit dem RTP-Wert dargestellt.

### 5.2.2.1 1,2-Diamino-1,2-diarylethane

Aus den Ergebnissen in Tab. 5.4 geht hervor, dass die Erhöhung der Lipophilie durch Einführung von Halogenen in *ortho*-Position der Aromaten zu einer verstärkten agonistischen Aktivität der Verbindungen führt (z. B. **64** < **66** < **102** < **104**). Dabei lassen sich die bei den RBA-Werten gemachten Beobachtungen übertragen. Das mit vier Chloratomen substituierte Diamin **103** zeigt mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 10<sup>-9</sup> M die stärkste Wirkung der im Luciferase-Assay getesteten Ethylendiamine und ist stärker wirksam als **102**, das einen höheren RBA-Wert aufweist.

Auch der Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung verläuft wie bei den RBA-Werten: alle (*1R,2S*)/(*1S,2R*)-konfigurierten Verbindungen sind stärker wirksam als ihre Diastereomere (z. B. **64** > **65**, **66** > **67**, **102** > **106**).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Konfiguration	rel. Akti- vierung bei 10 <sup>-6</sup> M [%]	EC <sub>50</sub> [10 <sup>-9</sup> M]	RTP [%]
<b>64</b>	4-OH	4-OH	H	( <i>1R,2S</i> )/( <i>1S,2R</i> )	<b>9</b>		
<b>66</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	H	( <i>1R,2S</i> )/( <i>1S,2R</i> )	<b>44</b>	<b>1500</b>	<b>0.005</b>
<b>102</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2-Cl,4-OH	H	( <i>1R,2S</i> )/( <i>1S,2R</i> )	<b>115<sup>a</sup></b>	<b>15</b>	<b>0.533</b>
<b>103</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	H	( <i>1R,2S</i> )/( <i>1S,2R</i> )	<b>105<sup>a</sup></b>	<b>1</b>	<b>8.000</b>
<b>100</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	Formyl	( <i>1R,2R</i> )/( <i>1S,2S</i> )	<b>21</b>	<b>3000</b>	<b>0.003</b>
<b>65</b>	4-OH	4-OH	H	( <i>1R,2R</i> )/( <i>1S,2S</i> )	<b>0</b>		
<b>67</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	H	( <i>1R,2R</i> )/( <i>1S,2S</i> )	<b>15</b>	<b>6000</b>	<b>0.001</b>
<b>106</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2-Cl,4-OH	H	( <i>1R,2R</i> )/( <i>1S,2S</i> )	<b>78<sup>a</sup></b>	<b>200</b>	<b>0.040</b>

**Tab. 5.4:** Agonistische Wirkung von 1,2-Diamino-1,2-diarylethanen im Luciferase-Assay (<sup>a</sup> Schmidt, [189]).

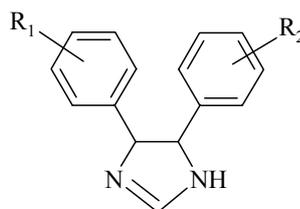
Zu *N*-ethylierten Diaminoethanen gibt es keine Ergebnisse im Luciferase-Assay an der MCF-7-2a Zelllinie, die Luciferase-Aktivierung wurde aber mit einer transienten Transfektion an MCF-7-Zellen bestimmt. Ein Anstieg der estrogenen Wirkung durch Einführung von Ethylresten an die Aminofunktionen konnte beobachtet werden, wobei das an beiden *N*-Atomen ethylierte Diaminoethan **105** (Tab. 5.1) einen im Vergleich zu **103** um Faktor 10 niedrigeren EC<sub>50</sub>-Wert aufweist [Bogner, 187].

Das *N*-Formyl-Derivat **100** zeigt estrogene Aktivität (Tab. 5.4). Mit einem  $EC_{50}$  von  $3000 \cdot 10^{-9}$  M ist es nur etwa halb so stark wirksam wie das entsprechende Diaminoethan **66**. Dies ist umso erstaunlicher, da **100** einen höheren RBA-Wert besitzt als **66**.

### 5.2.2.2 4,5 Diaryl-2-imidazoline und 1,3-Dialkyl-4,5-diarylimidazolinium-bromid

2-Imidazoline zeigen abhängig vom Substitutionsmuster in den Aromaten und den Substituenten am Heterozyklus agonistische Wirkung im Luciferase-Assay (Tab. 5.5 - Tab. 5.7). Die Erhöhung der Lipophilie durch Chloratome wirkt sich bei am Imidazolinring nicht substituierten (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-konfigurierten Imidazolinen positiv auf die agonistische Aktivität aus. Eine Einführung von Fluor ist nicht ausreichend, um Wirkung zu erzielen. Die Wirkung steigt mit der Anzahl der Chloratome (**68** < **70** < **72**), wobei **72** mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $70 \cdot 10^{-9}$  M das wirksamste der am Imidazolinring nicht substituierten 2-Imidazoline ist.

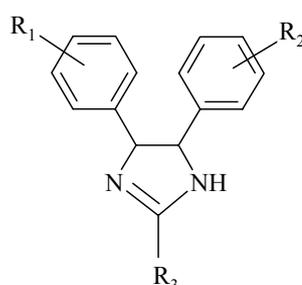
Der Einfluss der Konfiguration wurde anhand von **68-73** untersucht. Die (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-konfigurierten Imidazoline sind deutlich aktiver als die entsprechenden diastereomeren Verbindungen, die nur sehr schwache Wirkung zeigen (z. B. **70** > **71**; **72** > **73**): Keines der (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-4,5-Diarylimidazoline erreicht 50 Prozent Luciferase-Aktivierung (Tab. 5.5).



Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Konfiguration	rel. Aktivierung bei 10 <sup>-6</sup> M [%]	EC <sub>50</sub> [10 <sup>-9</sup> M]	RTP [%]
<b>68</b>	4-OH	4-OH	( <i>4R,5S</i> )/( <i>4S,5R</i> )	<b>0</b>		
<b>107</b>	2-F,4-OH	2-F,4-OH	( <i>4R,5S</i> )/( <i>4S,5R</i> )	<b>0<sup>a</sup></b>		
<b>70</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	( <i>4R,5S</i> )/( <i>4S,5R</i> )	<b>63</b>	<b>500</b>	<b>0.016</b>
<b>72</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2-Cl,4-OH	( <i>4R,5S</i> )/( <i>4S,5R</i> )	<b>112</b>	<b>70</b>	<b>0.114</b>
<b>69</b>	4-OH	4-OH	( <i>4R,5R</i> )/( <i>4S,5S</i> )	<b>12</b>		
<b>71</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	( <i>4R,5R</i> )/( <i>4S,5S</i> )	<b>15</b>		
<b>73</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2-Cl,4-OH	( <i>4R,5R</i> )/( <i>4S,5S</i> )	<b>6</b>		

Tab. 5.5: Agonistische Wirkung von 4,5 Diaryl-2-imidazolinen im Luciferase-Assay (<sup>a</sup> Gust, [186]).

Durch Einführung von Alkylresten an C2 steigt die Lipophilie der Verbindungen. Dennoch zeigen die 2-Alkyl-4,5-diarylimidazoline deutlich geringere agonistische Aktivität als die entsprechenden nicht alkylierten Imidazoline (Tab. 5.6). Zur Abschwächung der Wirkung kommt es unabhängig von der Länge bzw. Polarität der eingeführten Alkylreste (z. B. **70** > **76**, **81** und **83**).



Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	rel. Aktivierung bei 10 <sup>-6</sup> M [%]	EC <sub>50</sub> [10 <sup>-9</sup> M]	RTP [%]
<b>74</b>	4-OH	4-OH	Methyl	<b>2</b>		
<b>75</b>	2-F,4-OH	2-F,4-OH	Methyl	<b>12</b>		
<b>76</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	Methyl	<b>-5</b>		
<b>77</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2-Cl,4-OH	Methyl	<b>20</b>	<b>5000</b>	<b>0.002</b>
<b>78</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	Methyl	<b>24</b>		
<b>79</b>	4-OH	4-OH	Ethyl	<b>6</b>		
<b>80</b>	2-F,4-OH	2-F,4-OH	Ethyl	<b>0</b>		
<b>81</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	Ethyl	<b>6</b>		
<b>82</b>	4-OH	4-OH	Hydroxyethyl	<b>0</b>		
<b>83</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	Hydroxyethyl	<b>20</b>		

**Tab. 5.6:** Agonistische Wirkung von 2-Alkyl-4,5-diarylimidazolinen im Luciferase-Assay.

Innerhalb der 2-Methylimidazoline bleibt die Abhängigkeit der Wirkung von der Lipophilie der Verbindungen erhalten. Anders als bei unsubstituierten 2-Imidazolinen führt dabei die Einführung von zwei Chloratomen nicht zur Wirkung. Erst durch Einführung eines dritten Chloratoms erhält man die wirksame Verbindung **77** (Tab. 5.6). Dies ist auch die einzige C-alkylierte Verbindung, die im getesteten Konzentrationsbereich die 50 %ige Aktivität einer 10<sup>-8</sup> M Estradiollösung erreicht. Der EC<sub>50</sub>-Wert ist gegenüber der am Imidazolinring nicht alkylierten Verbindung **72** allerdings um Faktor 70 erhöht (EC<sub>50</sub>: **72**: 70 • 10<sup>-9</sup> M, **77**: 3500 • 10<sup>-9</sup> M). Die Wirkung von **77** lässt sich durch ein weiteres Chloratom nicht steigern. In einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M ist **78** etwa genau-

so stark wirksam wie **77**. **78** zeigt aber einen flacheren Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve und erreicht die 50%ige Aktivität im untersuchten Konzentrationsbereich nicht (Abb. 5.3).

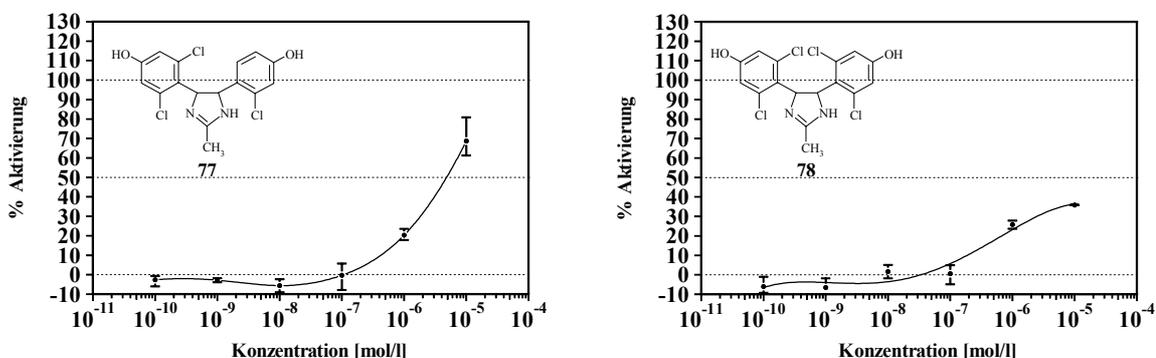
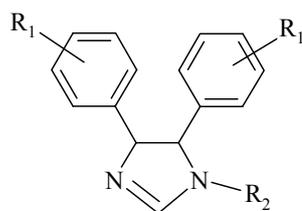


Abb. 5.3: Konzentrationsabhängige Luciferase-Exprimierung durch **77** (links) und **78** (rechts).

Die an C2 ethylierten Verbindungen **79-81** sind bis zu einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M nicht wirksam. Erst in einer Konzentration von 10<sup>-5</sup> M zeigt sich eine Abhängigkeit der Wirkung vom Vorhandensein von Halogenatomen. In dieser Konzentration ist **81** mit einer relativen Aktivierung von 25 % am stärksten wirksam.

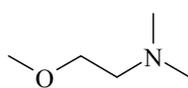
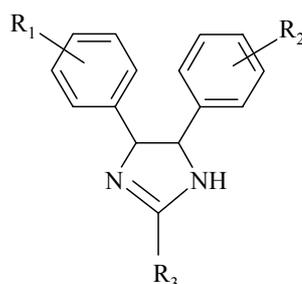
Bei den mit einer Hydroxyethylgruppe substituierten Imidazolinen **82** und **83** zeigt sich wiederum der positive Einfluss der Chloratome auf die agonistische Wirkung. **83** ist stärker wirksam als **82** (Tab. 5.6).

Im Gegensatz zur C-Alkylierungen wird die estrogenische Wirkung durch N-Alkylierungen deutlich gesteigert (Tab. 5.7). Agonistische Wirkung ist nach wie vor nur bei Verbindungen zu beobachten, die in den Aromaten mit Halogenen substituiert sind. Die Einführung einer Ethylgruppe in den Imidazolinring ohne Halogensubstituenten (**68** → **85**) führt nicht zu einer Aktivierung im Luciferase-Assay. Die Verbindungen **84**, **86** und **87** sind wirksamer als das entsprechende NH-Imidazolin **70**. Dabei zeigt sich eine Abhängigkeit der Wirkung von der Kettenlänge des Alkylrestes. Am wirksamsten ist die N-ethylierte Verbindung **86** mit einem EC<sub>50</sub> von 15 • 10<sup>-9</sup> M. Dieses Imidazolin ist damit auch die wirksamste aller in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen.

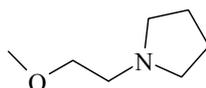


Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	rel. Aktivierung bei 10 <sup>-6</sup> M [%]	EC <sub>50</sub> [10 <sup>-9</sup> M]	RTP [%]
<b>84</b>	2-Cl, 4-OH	Methyl	<b>78</b>	<b>300</b>	<b>0.027</b>
<b>85</b>	4-OH	Ethyl	<b>-4</b>		
<b>86</b>	2-Cl, 4-OH	Ethyl	<b>103</b>	<b>15</b>	<b>0.533</b>
<b>87</b>	2-Cl, 4-OH	Propyl	<b>86</b>	<b>150</b>	<b>0.053</b>

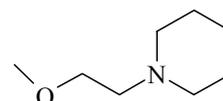
Tab. 5.7: Agonistische Wirkung von *N*-Alkyl-4,5-diarylimidazolinonen im Luciferase-Assay.



**SK1**



**SK2**



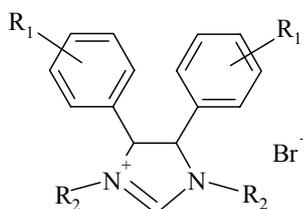
**SK3**

Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	rel. Aktivierung bei 10 <sup>-6</sup> M [%]
<b>92</b>	4-OH	4-SK1	H	<b>19</b>
<b>93</b>	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK1	H	<b>10</b>
<b>94</b>	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK2	H	<b>-5</b>
<b>95</b>	4-OH	4-SK3	H	<b>4</b>
<b>96</b>	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	<b>0</b>
<b>97</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> , 4-OH	2-Cl, 4-SK3	H	<b>4</b>
<b>98</b>	4-OH	4-SK3	Ethyl	<b>0</b>
<b>99</b>	2-Cl, 4-OH	2-Cl, 4-SK3	Ethyl	<b>0</b>

Tab. 5.8: Agonistische Wirkung von 4,5-Diaryl-2-imidazolinonen mit basischer Seitenkette im Luciferase-Assay.

Die Einführung basischer Seitenketten in *para*-Position eines der beiden Aromaten der Imidazoline führt zu inaktiven Verbindungen. Selbst bei der aus dem stark agonistisch wirksamen Imidazolin **72** hergestellten Verbindung **97** kommt es zum vollständigen Verlust der Aktivität (Tab. 5.8).

Trotz der ionischen Struktur ist 1,3-Diethyl-4,5-diarylimidazoliumbromid **88** in der Lage die Luciferaseexpression zu stimulieren (Tab. 5.9). Die Verbindung ist genauso stark wirksam wie das nicht alkylierte Imidazolin **70**.



Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	rel. Aktivierung bei 10 <sup>-6</sup> M [%]	EC <sub>50</sub> [10 <sup>-9</sup> M]	RTP [%]
<b>88</b>	2-Cl, 4-OH	Ethyl	<b>60</b>	<b>500</b>	<b>0.016</b>

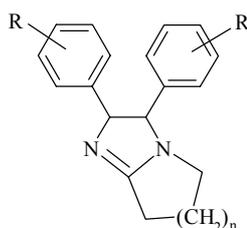
**Tab. 5.9:** Agonistische Wirkung von *N,N'*-Dialkyl-4,5-diarylimidazoliumbromid im Luciferase-Assay.

### 5.2.2.3 2,3-Diaryltetrahydropyrroloimidazole und 2,3-Diarylhexahydroimidazopyridine

Die Einbindung von *N1* mit *C2* in einen weiteren Ring führt trotz gesteigerter Lipophilie zu einer Abnahme der Wirkung (Tab. 5.10).

Verbindung **91** mit einem zusätzlichen Pyridinring ist dabei wirksamer als das entsprechende Tetrahydropyrroloimidazol **90**. Der EC<sub>50</sub>-Wert von **91** ist mit 2500 • 10<sup>-9</sup> M aber 50-mal so hoch wie der EC<sub>50</sub>-Wert der entsprechenden Verbindung **70** (EC<sub>50</sub> = 500 • 10<sup>-9</sup> M) ohne zusätzlichen Ring.

Bei den Tetrahydropyrroloimidazolen **89** und **90** zeigt sich erneut die Abhängigkeit der Wirkung von der Anwesenheit von Chloratomen.



Verbindung	R	n	rel. Aktivierung bei 10 <sup>-6</sup> M [%]	EC <sub>50</sub> [10 <sup>-9</sup> M]	RTP [%]
89	4-OH	1	0		
90	2-Cl, 4-OH	1	8		
91	2-Cl, 4-OH	2	34	2500	0.003

Tab. 5.10: Agonistische Wirkung von Diaryltetrahydropyrroloimidazolen und Diarylhexahydroimidazopyridinen im Luciferase-Assay.

### 5.2.3 Antagonistische Wirkung

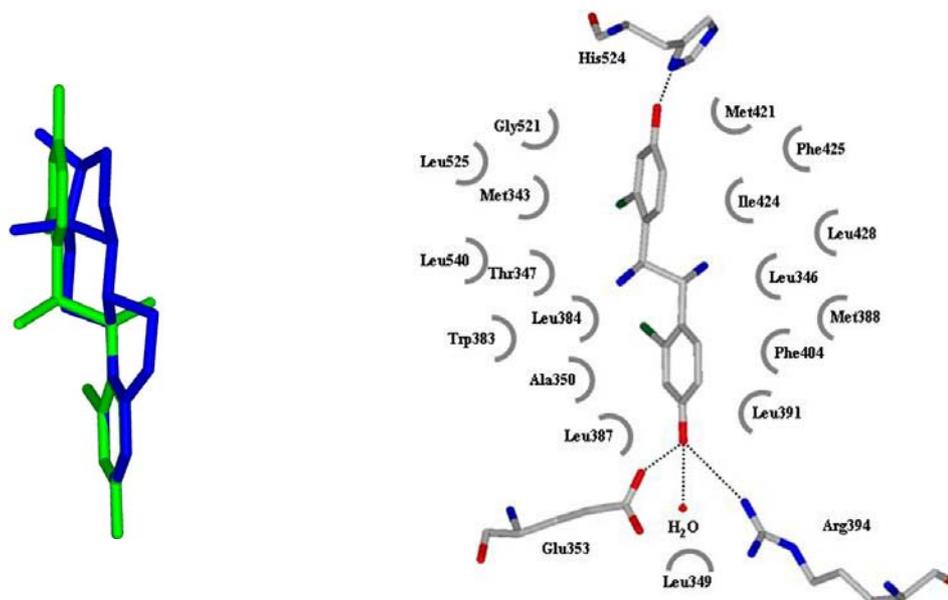
Die antagonistische Wirkung einiger Verbindungen wurde ebenfalls konzentrationsabhängig bestimmt. Von besonderem Interesse waren dabei die 2-Imidazoline mit basischer Seitenkette (**92-99**). Wie aus den Konzentrations-Aktivierungskurven-Kurven hervorgeht (Kapitel 9.2, Seite 212), zeigt keine der synthetisierten Verbindungen antagonistische Wirkung.

## 5.3 Diskussion der Testergebnisse

Von den in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen zeigen nur die 1,2-Diamino-1,2-diarylethan-Verbindungen messbare RBA-Werte (Tab. 5.1). Um einen hohen RBA-Wert zu besitzen, müssen Verbindungen in der Lage sein, gebundenes E2 von der Bindungsstelle im Rezeptor zu verdrängen. Dazu sind ähnliche Interaktionen mit dem ER erforderlich, wie sie für Estradiol beschrieben wurden (Kapitel 1.1.6, Seite 15). Dies ist immer dann möglich, wenn die Verbindungen eine ähnliche Raumstruktur wie E2 haben.

(*1R,2S*)/(*1S,2R*)-konfigurierte Diaminoethane können in Lösung eine Konformation mit antiperiplanaren Anordnung der Aromaten und der Aminogruppen einnehmen (Kapitel 4.2.1, Seite 75). Diese Konformation lässt sich gut mit E2 in Einklang bringen (Abb. 5.4). Der O-O-Abstand der beiden Hydroxygruppen beträgt 11.9 Å und ist damit 1 Å größer als bei E2 (10.9 Å) und etwas kleiner als bei DES (12.1 Å). Eine zu E2 bzw.

DES analoge Bindung an die LBD mit Wasserstoffbrücken zu Glu 353, Arg 394 und His 524 sollte daher möglich sein (Abb. 5.4). Auch die lipophilen Wechselwirkungen mit der LBD sind ähnlich. Die Steigerung der Lipophilie durch Halogene und Alkylreste verbessert diese Kontakte und führt zu höheren RBA-Werten. Die RBA-Werte korrelieren mit den Ergebnissen der Luciferase-Assays. An der MCF-7-2a Zelllinie zeigen die Diaminoethane ausschließlich agonistische Wirkung (Tab. 5.4).



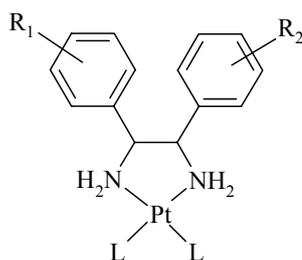
**Abb. 5.4:** Überlagerung des (*1R,2S*)/(*1S,2R*)-konfigurierten Diaryldiaminoethans (**66**) mit Estradiol (links), mögliche Wechselwirkungen von **66** mit der LBD des ER $\alpha$  (rechts).

Auch (*1R,2R*)/(*1S,2S*)-konfigurierte Diaminoethane zeigen gute Übereinstimmung mit E<sub>2</sub>, wenn die Aromaten antiperiplanar angeordnet sind. Der O-O-Abstand beträgt dann 11.8 Å, wobei die beiden polaren Aminogruppen auf der gleichen Seite stehen (Abb. 4.1, Seite 75). Dadurch sind die Verbindungen hydrophiler als die (*1R,2S*)/(*1S,2R*)-konfigurierten Diaminoethane und die lipophilen Interaktionen mit der LBD können nicht so gut ausgebildet werden. Daher sind alle (*1R,2R*)/(*1S,2S*)-konfigurierten Diaminoethane sowohl im RBA-Test als auch im Luciferase-Assay weniger aktiv als die entsprechenden Diastereomere.

Unabhängig von ihrer Konfiguration sind somit alle Verbindungen mit 1,2-Diaryldiaminoethanstruktur in der Lage ähnliche Wechselwirkungen mit dem ER einzugehen. Sie stellen Typ-I-Estrogene (Kapitel 1.3, Seite 20) dar.

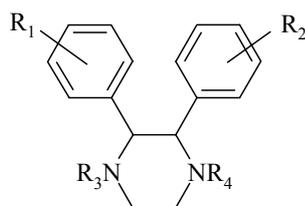
(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-Diaryl-2-imidazoline sind dagegen, wie im Folgenden gezeigt, Typ-II-Estrogene. Der RBA-Wert ist äußerst gering, d.h. sie sind nicht in der Lage gebundenes Estradiol aus der LBD zu verdrängen. Dies lässt sich mit der räumlichen Struktur der 2-Imidazoline erklären, die kaum Übereinstimmung mit E2 zeigt. Überlagert man einen der beiden Aromaten mit dem A-Ring des E2, zeigt sich, dass die Lage der Hydroxygruppe des zweiten Aromaten nicht mit der 17 $\beta$ -Hydroxygruppe des Steroids übereinstimmt (Abb. 5.5). Der Abstand der beiden Sauerstoffatome ist deutlich kleiner als bei E2 und beträgt ca. 6.3 Å (Kapitel 4.2.2, Seite 80). Analoge Wechselwirkungen mit dem Rezeptor wie bei Estradiol sind daher nicht möglich. Trotzdem zeigen einige 2-Imidazoline estrogene Aktivität im Luciferase-Assay.

Eine derartige Abnahme des RBA-Wertes ohne Verlust der agonistischen Eigenschaften durch die Zyklisierung von 1,2-Diaminodiarylethanen wurde auch bei anderen Verbindungsklassen beobachtet. Sowohl (*1*R*,2*S**)/(1*S*,2*R*)-konfigurierten Platinkomplexe (Tab. 5.11; z.B. **109** < **102**) als auch (*2*R*,3*S**)/(2*S*,3*R*)-konfigurierten Piperazine (Tab. 5.12; z.B. **113** < **102**) zeigen deutlich geringere RBA-Werte als die entsprechenden Diaryldiaminoethane. Die agonistische Wirkung steigt auch hier durch die Einführung von Halogenen (z. B. **108** < **109** bzw. **113** < **114**). *N*-Alkylierung führt bei Piperazinen wie auch bei Diaminoethanen und 2-Imidazolinen zu einer Steigerung der agonistischen Wirkung (**112** < **115**).



Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	L	RBA [%]	rel. Aktivierung bei 10 <sup>-6</sup> M [%]	EC <sub>50</sub> [10 <sup>-9</sup> M]	RTP [%]
<b>108</b>	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	Cl <sub>2</sub>	<0.01 <sup>a</sup>	28 <sup>d</sup>		
<b>109</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2-Cl,4-OH	I <sub>2</sub>	0.43 <sup>b</sup>	81 <sup>d</sup>	110	0.073
<b>110</b>	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	Cl <sub>2</sub>	0.30 <sup>c</sup>	92 <sup>e</sup>	6	1.333

**Tab. 5.11:** RBA-Werte und agonistische Wirkung (*1*R*,2*S**)/(1*S*,2*R*)-[1,2-Diaryletylendiamin]platin(II)-Komplexen im Luciferase-Assay (<sup>a</sup> Karl [185], <sup>b</sup> Gust [188], <sup>c</sup> Gust [136], <sup>d</sup> Keilitz [149], <sup>e</sup> Schmidt [189]).

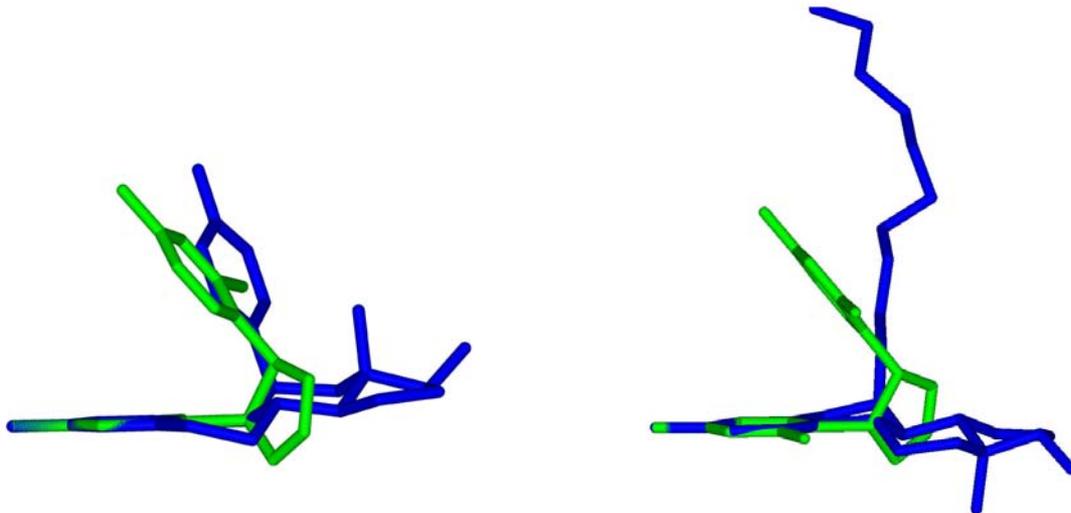


Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	RBA [%]	rel. Aktivierung bei 10 <sup>-6</sup> M [%]	EC <sub>50</sub> [10 <sup>-9</sup> M]	RTP [%]
111	4-OH	4-OH	H	H	<0.02 <sup>a</sup>	-1 <sup>a</sup>		
112	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	H	H	<0.02 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>		
113	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2-Cl,4-OH	H	H	<0.02 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>		
114	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	2,6-Cl <sub>2</sub> ,4-OH	H	H	0.05 <sup>a</sup>	73 <sup>a</sup>	200	0.040
115	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	Ethyl	H	0.42 <sup>a</sup>	74 <sup>a</sup>	200	0.040
116	2-Cl,4-OH	2-Cl,4-OH	Ethyl	Ethyl	0.17 <sup>a</sup>	37 <sup>a</sup>		

Tab. 5.12: RBA-Werte und agonistische Wirkung von (2*R*,3*S*)/(2*S*,3*R*)-2,3-Diarylpiperazinen (<sup>a</sup> Gust [138]).

Aufgrund der beobachteten raschen Hydrolyse der 2-Imidazoline zu Formamiden (Kapitel 3.3.1, Seite 57) ist es denkbar, dass die beobachtete estrogene Wirkung nicht von den Imidazolinolen an sich, sondern von im Testmedium entstandenen Verbindungen mit Diaminodiarylethanstruktur hervorgerufen wird. Innerhalb des 50 Stunden dauernden Luciferase-Assays hydrolysieren ca. 90 Prozent des Imidazolins **70**, wobei Formamid **100** entsteht. Da Imidazolin **70** zusammen mit seinem möglicherweise während des Tests gebildeten Hydrolyseprodukts im Luciferase-Assay ca. sechsmal stärker wirksam ist, als das reine Hydrolyseprodukt **100**, muss das intakte Imidazolin **70** stärker wirksam sein als **100** und zumindest einen Teil der Wirkung verursachen (Tab. 5.4, Tab. 5.5). Fraglich ist dabei, ob die Imidazoline während des Tests mit der gleichen Geschwindigkeitskonstante hydrolysieren wie während der HPLC-Untersuchungen. Möglicherweise werden sie durch eine schnelle Bindung an den ER vor Hydrolysereaktionen geschützt. Eine Veränderung der Hydrolyseraten der 2-Imidazoline im Luciferase-Assay wurde nicht näher untersucht, da die HPLC-Messungen dieser mit Zellen und Zellmedien versetzten Lösungen viel aufwendiger ist, als die Messung in einer wässrigen PBS-Lösung. Aus *N*-Ethyl-2-imidazolin **86** entstehen innerhalb von 50 h nur ca. 10 Prozent des Formamids, weshalb die gemessene Aktivität im Luciferase-Assay nahezu ausschließlich der intakten Verbindungen zuzuordnen ist. Dies stellt einen weiteren Beweis der agonistischen Wirkung der 2-Imidazoline dar.

Eine zu E2 analoge Bindung an den ER kann für die Imidazoline auf Grund der unterschiedlichen Raumstruktur ausgeschlossen werden. Es müssen daher andere Wechselwirkungen mit der LBD stattfinden.  $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierte 2-Imidazoline lassen sich gut mit dem Grundgerüst von steroidalen Antagonisten (Abb. 1.1, Seite 3) überlagern, wobei der zweite Aromat der Imidazoline dabei in die gleiche Richtung wie die Substituenten in  $7\alpha$  bzw.  $11\beta$ -Position der Antagonisten zeigt (Abb. 5.5).

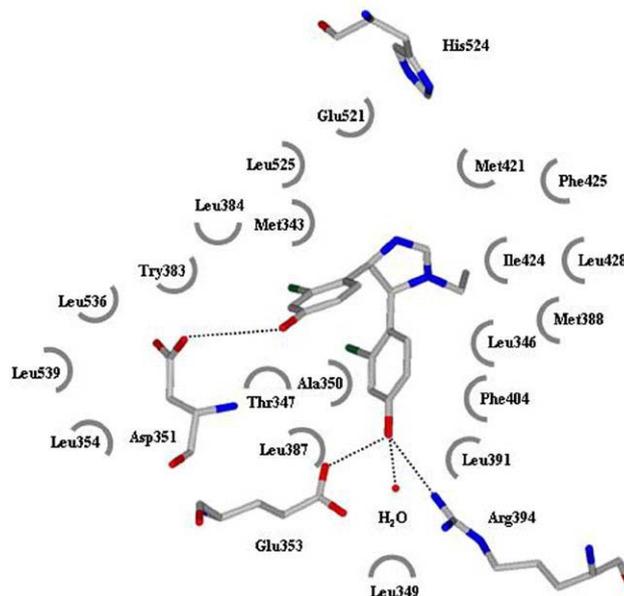


**Abb. 5.5:** Überlagerung eines  $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten 2-Imidazolins mit  $11\beta$ -(4-Hydroxyphenyl)estradiol (links) und ICI 164 384 (rechts; die Seitenkette des ICI 164 384 ist nicht komplett dargestellt).

Aus diesen Überlagerungen wird ersichtlich, dass die Imidazoline keine Wasserstoffbrückenbindung analog zu steroidalen Antagonisten zu His 524 eingehen können (Abb. 1.7, Seite 13). Diese Wechselwirkung ist für eine antagonistische Wirkung nicht essentiell, da diese auch bei OHT nicht möglich ist (Abb. 1.8, Seite 14).

Ein Bindungsstellenmodell für Typ-II-Estrogene geht von einer Bindung von Typ-II-Estrogenen [Gust, 137, 186] aus, die der Bindung von SERM und echten Antagonisten ähnlich ist, ohne dass es dabei zu einem Kontakt zu His 524 kommt. Danach finden hydrophile Wechselwirkungen zwischen einem den A-Ring des E2 simulierenden Aromaten der Typ-II-Estrogene und Glu 353, Arg 394 und einem Wassermolekül statt. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem zweiten Aromaten und Asp 351 wurde postuliert. Asp 351 ist als wichtige Bindungsstelle von Agonisten und Antagonisten bekannt [MacGregor, 105]. Die Bindung dieser Estrogene kann durch lipophile

Wechselwirkungen zusätzlich stabilisiert werden. Die derartige Bindung eines Typ-II-Estrogens ist in Abb. 5.6 am Beispiel eines 2-Imidazolins dargestellt.



**Abb. 5.6:** Mögliche Wechselwirkungen des 2-Imidazolins **86** mit der LBD des ER $\alpha$ .

2-Imidazole ohne Halogenatome in den Aromaten sind nur schwach wirksam. Die agonistische Wirkung kann durch Einführung von Halogenatomen in die Aromaten deutlich gesteigert werden. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung der lipophilen Wechselwirkungen zwischen LBD und Wirkstoff.

Einen positiven Effekt auf die Wirkung übt auch die *N*-Alkylierung des Imidazolins aus. Alle *N*-Alkyl-Imidazole mit 2-Chlor-4-hydroxyphenylsubstituenten (**84**, **86** und **87**) sind aufgrund der höheren Lipophilie aktiver als die entsprechende *NH*-Verbindung **70** (Abb. 5.7). Dabei zeigt sich auch eine Abhängigkeit der Wirkung von der Kettenlänge der Alkylgruppe. Durch *N*-Methylierung (**84**) sinkt der EC<sub>50</sub>-Wert im Vergleich zu **70** um Faktor zwei. Dieser Trend setzt sich beim *N*-ethylierten Imidazolin **86** fort. Diese Verbindung zeigt einen EC<sub>50</sub>-Wert von  $15 \cdot 10^{-9}$  M und ist damit die am stärksten wirksame Verbindung dieser Arbeit. Eine weitere Verlängerung des Alkylrestes führt zu einer Abnahme der Wirkung. Die mit einem Propylrest alkylierte Verbindung **87** ist etwas stärker wirksam als das methylierte Imidazolin **84**. Durch den Propylrest ist **87** zwar die lipophilste *N*-Alkyl-Verbindung, aber es kommt durch diesen Alkylrest scheinbar zu sterischen Behinderungen der Wechselwirkungen zwischen Ligand und Estrogenrezeptor.

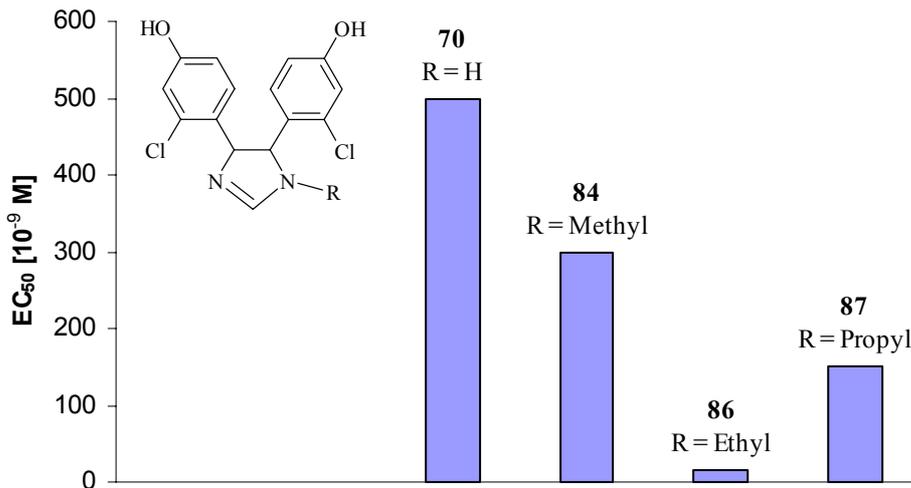


Abb. 5.7: EC<sub>50</sub>-Werte *N*-substituierter (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)imidazoline.

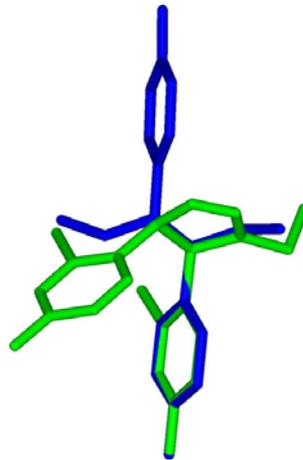


Abb. 5.8: Überlagerung von DES und dem 2-Imidazolin 86.

Die *N*-Alkylreste der Imidazoline zeigen in Überlagerungen mit DES eine analoge Anordnung der Alkylketten zu einer der beiden Ethylketten des DES (Abb. 5.8). Interessant ist, dass auch die Bindungsaffinität zum ER und die estrogenische Wirkung verschiedener Derivate von Diethylstilbestrol [Katzenellenbogen, 190] und Hexestrol [Hartmann, 191, 192] in gleicher Weise von der Kettenlänge der Alkylreste abhängig ist, wie die agonistische Wirkung von *N*-Alkylimidazolinen: Die Bindungsaffinität steigt mit der Verlängerung der Kette und erreicht bei den ethylierten Verbindungen das Maximum (Tab. 5.13). In einem Uterusgewichtstest ist HES stärker estrogen wirksam als die dazu analogen Verbindungen mit kürzerer bzw. längerer Alkylkette [Hartmann, 191, 192]. In der LBD des ER kommt es daher wahrscheinlich auch bei *N*-Alkylimidazolinen

zu Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Phe 404 und Leu 428, die bei DES hydrophobe Kontakte zu einer der beiden Ethylseitenketten ausbilden (Kapitel 1.1.5, Seite 12).



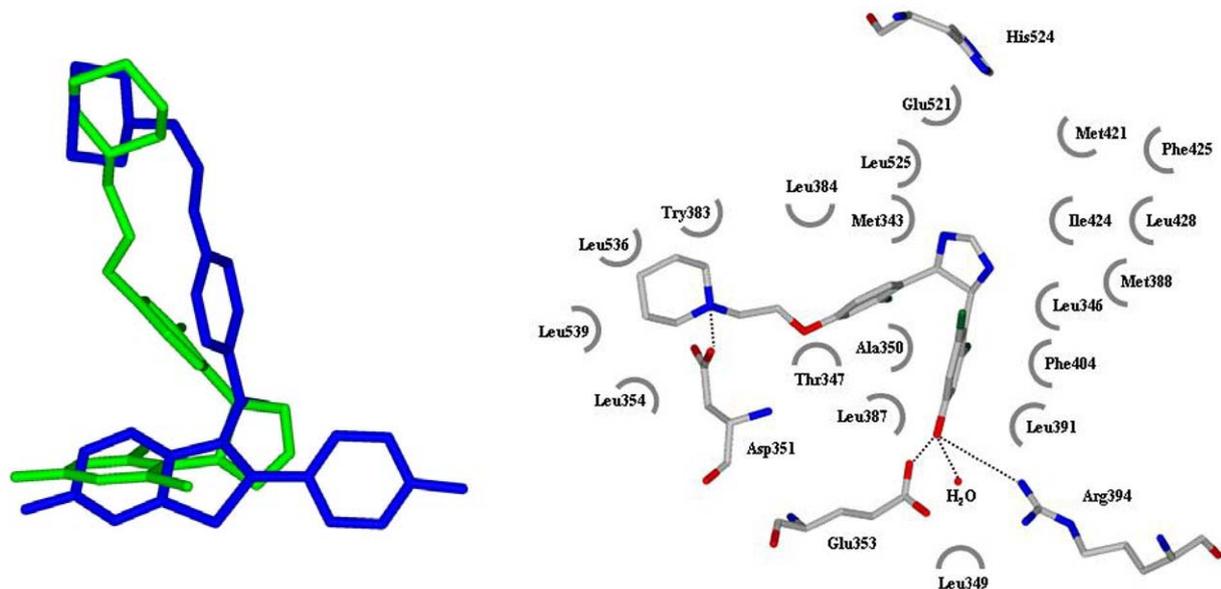
R	RBA [%]	R	RBA [%]
H	<b>0.37<sup>a</sup></b>		
Methyl	<b>28<sup>a</sup></b>	Methyl	<b>12<sup>b</sup></b>
Ethyl (DES)	<b>99<sup>a</sup></b>	Ethyl (HES)	<b>27</b>
Propyl	<b>81.5<sup>a</sup></b>	Propyl	<b>8<sup>c</sup></b>

**Tab. 5.13:** RBA-Werte von DES- und HES-Derivaten (<sup>a</sup> Katzenellenbogen [190], <sup>b</sup> Hartmann [191], <sup>c</sup> Hartmann [192]).

Im Gegensatz zur *N*-Alkylierung ist die Alkylierung an *C2* ungünstig für die agonistischen Eigenschaften der Imidazoline. Alle *C*-alkylierten Verbindungen sind schwächer wirksam als die entsprechenden nicht alkylierten Verbindungen (Tab. 5.5, Tab. 5.6). Die zusätzliche Alkylgruppe kann in der LBD in Richtung von His 524 zeigen und somit in einen von unalkylierten Imidazolininen nicht okkupierten Freiraum ragen. Dabei ergeben sich keine sterischen Gründe, die die Bindung der *C*-Alkylimidazoline an die LBD abschwächen könnten.

Die Klasse der 2-Imidazoline zeigt an der MCF-7-2a Zelllinie ausschließlich agonistische Wirkung. Auch durch Einführung basischer Seitenketten (**92-99**), die bei SERM Helix 12 in eine andere Position drängen und damit die antagonistische Wirkkomponente hervorrufen (Kapitel 1.1.5, Seite 10), wurde keine antagonistische Wirkung nachgewiesen. Durch diese Modifikation geht zugleich die agonistische Wirkung verloren. Die zusätzlich eingeführte basische Seitenkette dieser Verbindungen kann in die gleiche Richtung wie die Seitenkette des Raloxifens zeigen (Abb. 5.9). Ähnliche hydrophile Wechselwirkungen zu Asp 351 wie bei RAL bzw. OHT sollten also möglich sein. Auch

die Möglichkeit zur Bindung an Glu 353 und Arg 394 bleibt bei den Verbindungen mit basischen Seitenketten erhalten. Anscheinend kann durch diese Bindung in der LBD Helix 12 nicht in die „antagonistische“ Position verschoben werden. Möglicherweise fehlt den Verbindungen hierzu die Möglichkeit einer weiteren Fixierung an die Bindungstasche über Aminosäuren im Bereich von His 524, die bei RAL über eine Wasserstoffbrückenbindung bzw. bei OHT über hydrophobe Wechselwirkungen stattfindet.

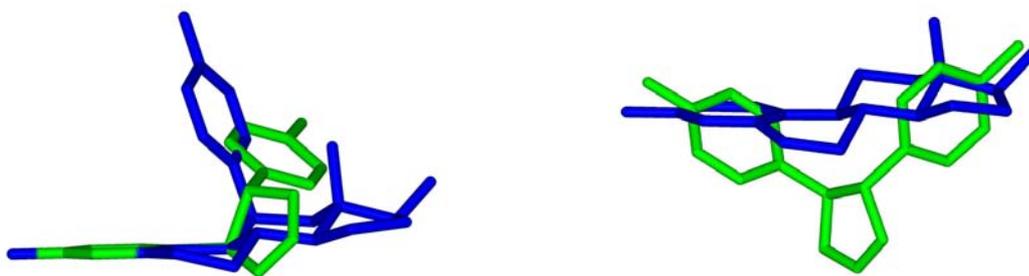


**Abb. 5.9:** Überlagerung von RAL und dem 2-Imidazolin mit basischer Seitenketten **97** (links) bzw. theoretische Wechselwirkungen des 2-Imidazolins **97** mit der LBD des ER $\alpha$  (rechts).

Die (*4R,5R*)/(*4S,5S*)-konfigurierten 2-Imidazoline haben eine andere Raumstruktur als (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-konfigurierten 2-Imidazoline. Dort stehen die Aromaten auf verschiedenen Seiten der Ebene des Imidazolinrings (Seite 4.2.2, Seite 80). Eine analoge Bindung an den ER wie bei (*4R,5R*)/(*4S,5S*)-konfigurierten 2-Imidazolinen ist nicht möglich, da die Verbindungen kaum Übereinstimmung mit Verbindungen zeigen, die den 11 $\beta$ -Kanal der LBD zur Bindung nutzen. In Überlagerungen von 11 $\beta$ -(4-Hydroxyphenyl)estradiol und (*4R,5R*)/(*4S,5S*)-konfigurierten 2-Imidazolinen zeigt der entsprechende Aromat in die entgegengesetzte Richtung (Abb. 5.10). Durch die unterschiedliche Anordnung der Aromaten im Vergleich zu (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-konfigurierten 2-Imidazolinen steigt der O-O-Abstand von 6.3 Å auf ca. 10 Å und liegt im Bereich des O-O-Abstand von E2 (10.9 Å). Die beiden Hydroxygruppen der Imidazoline lassen sich daher gut mit den OH-Gruppen des Estradiols in Einklang bringen und Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu 353, Arg 394 und His 524 erscheinen möglich. Der Imidazolin-

ring ist dabei ober- bzw. unterhalb des Steroidgerüsts von E2 angeordnet (Abb. 5.10). Somit sind die lipophilen Wechselwirkungen zur LBD nicht in gleicher Weise wie bei E2 möglich. Daher zeigen  $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierte Imidazoline an der estrogenabhängigen MCF-7-2a Zelllinie nur sehr schwache Wirkung.

Am stärksten wirksam ist **69**, das in den Aromaten keine Halogenatome trägt (Kapitel 9.2.2, Seite 214). Die mit Halogenen substituierten  $(1R,2R)/(1S,2S)$ -2-Imidazoline sind schwächer wirksam als die entsprechenden Diastereomere. Die geräumigen Halogenatome scheinen hier die Interaktionen mit der LBD aus sterischen Gründen zusätzlich zu behindern.



**Abb. 5.10:** Überlagerung eines  $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierten 2-Imidazolins mit  $11\beta$ -(4-Hydroxyphenyl)estradiol (links) und Estradiol (rechts).

Eine der weitere Verbindung stellt  $(4R/5S)/(4S/5R)$ - $N,N'$ -Diethyl-4,5-dihydro-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)imidazoliumbromid **88** dar, das trotz des ionischen Charakters agonistische Wirkung im Luciferase-Assay zeigt. Im Vergleich zum nicht alkylierten Imidazolin **70** ändert sich durch die  $N,N'$ -Dialkylierung des 2-Imidazolinring die Raumstruktur der Verbindung nicht (Kapitel 4.2.3, Seite 89). **88** sollte daher in der Lage sein analog zu den  $(4R/5S)/(4S/5R)$ -konfigurierten 2-Imidazolinen als Typ-II-Estrogen an die LBD zu binden. Wie bei 2,3-Diarylpiperazinen (Tab. 5.12) ist die diethylierte Verbindung allerdings schwächer wirksam als die einfach ethylierte Verbindung (**88** < **86**; **116** < **118**).

Auch bei Diaryltetrahydropyrroloimidazolen und Diarylhexahydroimidazopyridinen **89-91** zeigt sich der negative Einfluss der  $C$ -Alkylierung auf die estrogenische Wirkung. Die Einführung des weiteren Ringsystems führt insgesamt zu schwächer wirksamen Verbindungen.



Die oben postulierte Wasserstoffbrückenbindung der zweiten OH-Gruppe der Typ-II-Estrogene zu Asp 351 konnte dagegen nicht bestätigt werden: An Stelle dessen wird nach diesen Berechnungen eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der zweiten Hydroxygruppe der Typ-II-Estrogene und Thr 347 gebildet (Abb. 5.11, [Kekenes-Huskey, 193]). Diese Aminosäure ist ebenfalls im 11 $\beta$ -Kanal der Bindungstasche lokalisiert. Ein Nachteil dieser Berechnungen ist allerdings, dass die Berechnungen nicht auf die Flexibilität des Estrogenrezeptors eingehen. Während der Berechnungen wird die Struktur der LBD starr gehalten. Die durch Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor hervorgerufene „Anpassungen“ der LBD an den Liganden wurden somit nicht berücksichtigt.

