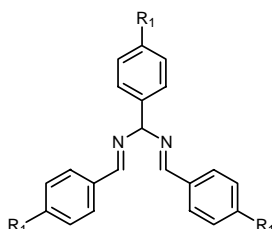


11 Ergebnisse

Alle in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden zuerst auf ihre agonistische und antagonistische Wirkung im Luciferase-Assay untersucht. Es wurde die Aktivierung in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-5} M gemessen. Konnte eine Genaktivierung bestimmt werden, so wurde die relative Bindungsaffinität untersucht. Die antiproliferative Wirkung aller Substanzen wurde in einem Cytotoxizitätstest an MCF-7 Zellen ermittelt. Die Untersuchungen wurden zeitabhängig in Konzentrationen von 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M durchgeführt.

11.1 Eigenschaften von *N,N'*-Bis[benzyliden]arylmethandiaminen

Die *N,N'*-Bis[benzyliden]arylmethandiamine **23** und **24** weisen alle typischen Strukturelemente der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen auf (Schema 60). Sie besitzen drei Arylreste, die jeweils eine funktionelle Gruppe tragen, welche zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung befähigt ist. Darüber hinaus setzt sich das verbindende Molekülteil aus zwei Stickstoff- und drei Kohlenstoffatomen zusammen. Die 5-atomige Teilstruktur ermöglicht durch die Einnahme einer Ringstruktur, aber auch in der gestreckten Konformation, eine trigonale Anordnung der Arylreste.



23, R₁: F
24, R₁: OH

Schema 60

11.1.1 Agonistische und antagonistische Wirkung von *N,N'*-Bis[benzyliden]arylmethandiaminen im Luciferase-Assay

In einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-5} M konnte für die Verbindungen **23** und **24** weder eine agonistische, noch eine antagonistische Wirkung gemessen werden. Die geringe

Abnahme der Aktivität bei Testung der Verbindung **24** auf antagonistische Wirkung liegt innerhalb der für diesen Test typischen Standardabweichung von $\approx \pm 13\%$ (Abb. 34).

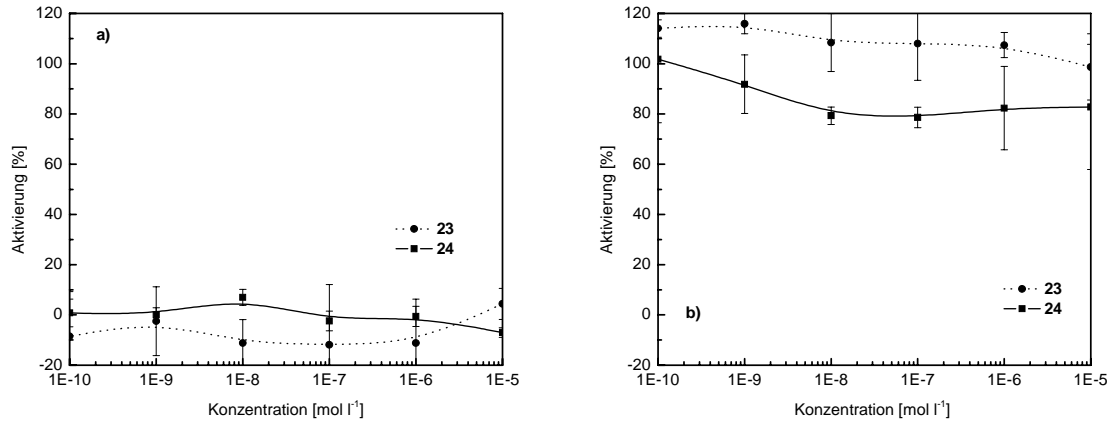


Abbildung 34. Aktivierung der *N,N'*-Bis[benzyliden]arylmethandiaminen **23** und **24** in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-5} M bei Testung auf estrogen (a) und antiestrogen (b) Wirkung.

11.1.2 Antiproliferative Wirkung von *N,N'*-Bis[benzyliden]arylmethandiaminen auf MCF-7 Zellen

Die Verbindungen **23** und **24** zeigen an MCF-7 Zellen bei einer Zeit von 70 h und in Konzentrationen von 5 μ M und 10 μ M bzw. 10 μ M eine marginale Reduktion der Zelldichte (Abb. 35).

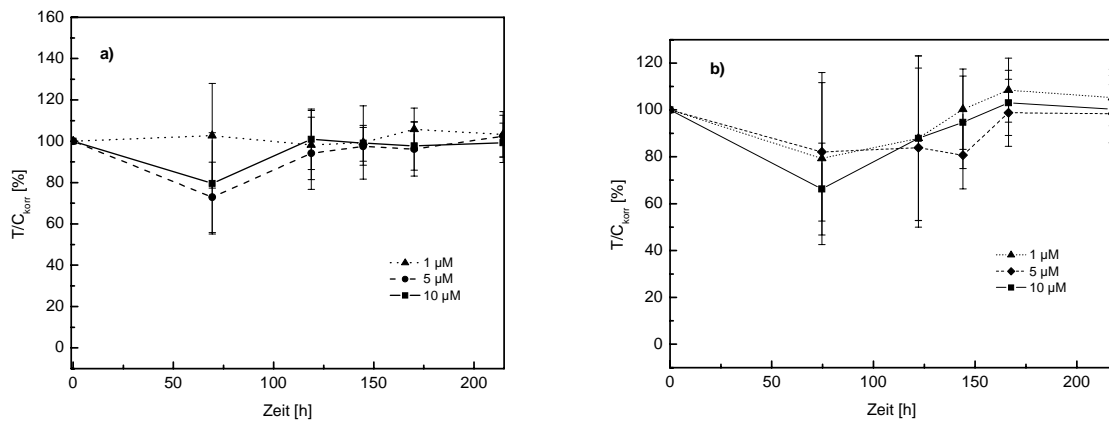


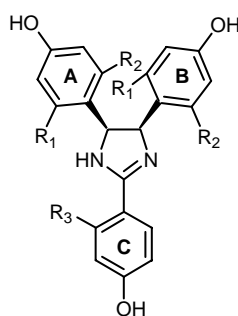
Abbildung 35. Untersuchung der antiproliferativen Wirkung von *N,N'*-Bis[benzyliden]arylmethandiaminen **24** (a) und **23** (b) auf MCF-7 Zellen.

11.2 Eigenschaften von *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen

In früheren Untersuchungen [216] wurde für 4,5-diarylierte *meso*-2-Imidazoline in einer Konzentration von 10^{-6} M eine relative Aktivierung von z.B. 112% für *meso*-4-(2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-5-(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**156**) oder von 74% für *meso*-4-(2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-5-(2-fluor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**157**) ermittelt. Eine Methylierung in der C(2)-Position an Verbindung **156** führte allerdings zu einer Reduzierung der Aktivierung auf 20% [312].

11.2.1 Agonistische und antagonistische Wirkung von *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen im Luciferase-Assay

Zur weiteren Untersuchung der an den Positionen 4 und 5 diarylierten *meso*-2-Imidazoline wurde an C(2) ein dritter Arylrest eingeführt. Die neu synthetisierten *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline **47a** - **47d** tragen dabei u.a. in den Ringen **A** und **B** oder an Ring **C** ein bzw. zwei Chloratome (Schema 61).



47a, R₁: H, R₂: H, R₃: H

47b, R₁: Cl, R₂: H, R₃: H

47c, R₁: Cl, R₂: Cl, R₃: H

47d, R₁: H, R₂: H, R₃: Cl

Schema 61

Im Luciferase-Assay wurden diese Verbindungen untersucht. Bei der Testung auf estrogene Wirkung zeigten alle Verbindungen in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-5} M keine Aktivierung (Abb. 36a). Bei der Untersuchung auf antiestrogene Potenz bewegten sich die Aktivitäten aller Verbindungen in einem Bereich zwischen 80% und 110% (Abb. 36b).

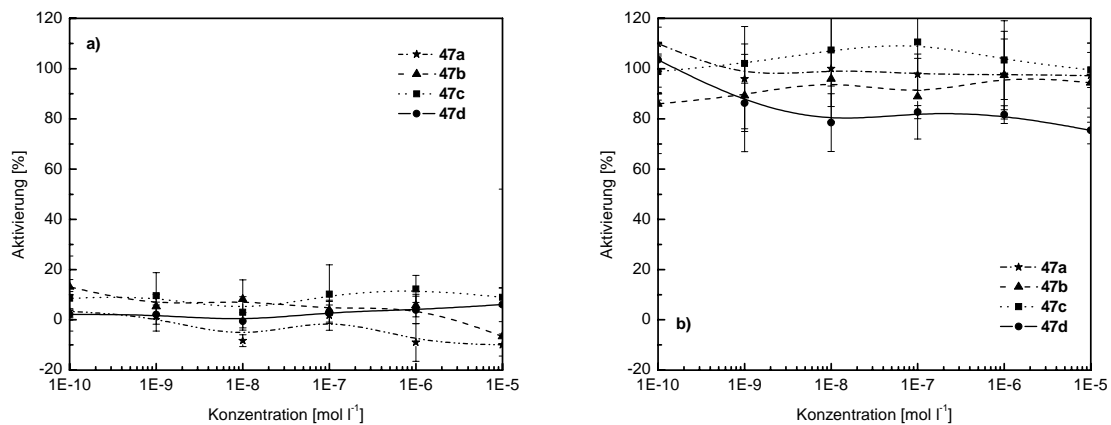


Abbildung 36. a) Testung auf agonistische Wirkung der *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline **47a** - **47d** in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-5} M. b) Untersuchung auf antagonistische Wirkung.

11.2.2 Antiproliferative Wirkung von *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen auf MCF-7 Zellen

Bei der Untersuchung auf cytotoxische Wirkung der *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline **47a** - **47d** konnte bei keiner Verbindung eine antiproliferative Wirkung festgestellt werden (Abb. 37 und 38). Verbindung **47b** zeigte in einem Zeitraum bis 100 h einen leichten stimulierenden Effekt in einer Konzentration von 1 μ M (Abb. 37b).

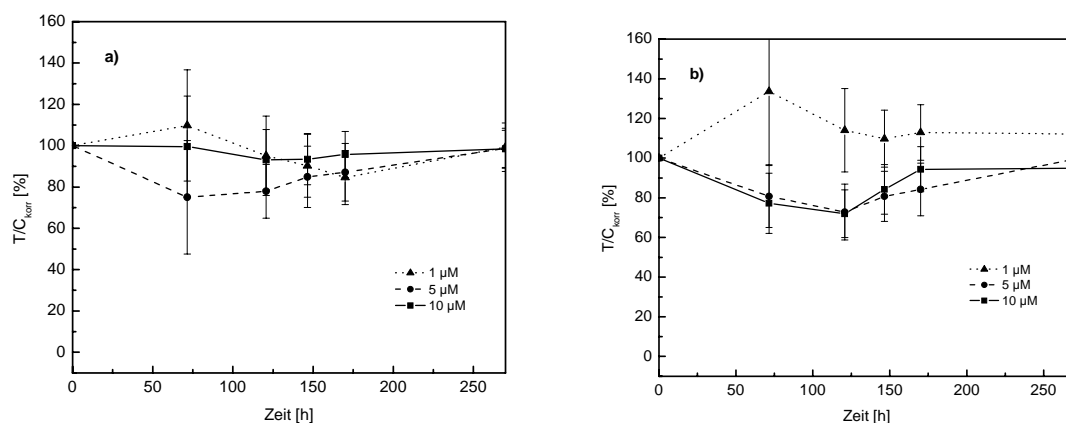


Abbildung 37. Untersuchung der antiproliferativen Wirkung der *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline **47a** (a) und **47b** (b) auf MCF-7 Zellen in den Konzentrationen 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M.

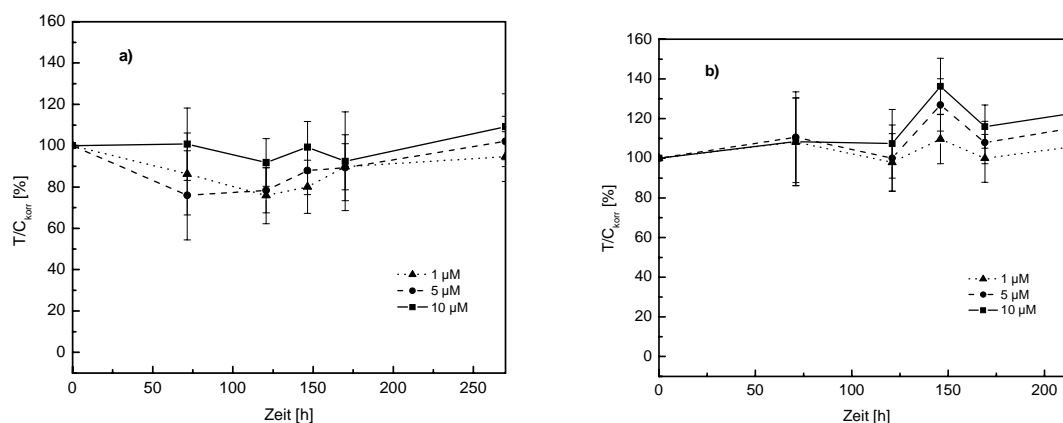
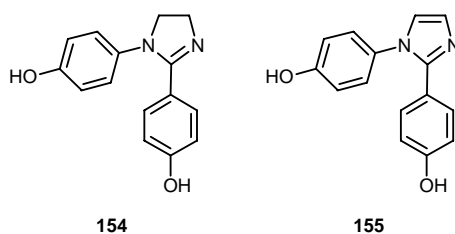


Abbildung 38. Untersuchung auf cytotoxische Wirkung der *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline **47c** (a) und **47d** (b) an MCF-7 Zellen in den Konzentrationen 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M.

11.3 **Eigenschaften von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1H-imidazol**

11.3.1 **Agonistische und antagonistische Wirkung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1H-imidazol im Luciferase-Assay**

Da Verbindung **155** die Grundstruktur aller in dieser Arbeit untersuchten *1H*-Imidazole darstellt, wurde auch von ihr die estrogenere und antiestrogenere Wirkung bestimmt. Daneben wurde das 1,2-Diaryl-2-imidazolin **154**, das auch als 4,5-Dihydro-*1H*-imidazol aufgefasst werden kann, im Luciferase-Assay untersucht (Schema 62).



Schema 62

In einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-5} M konnte für keine der Verbindungen **154** und **155** eine agonistische oder antagonistische Wirkung gemessen werden (Abb. 39).

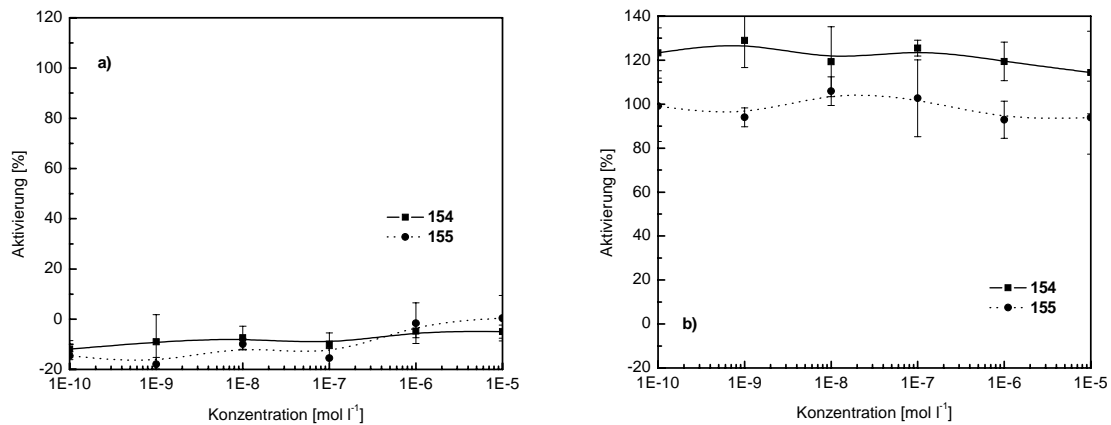


Abbildung 39. Aktivierung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**154**) und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol (**155**) in einem Konzentrationsbereich von 10⁻¹⁰ - 10⁻⁵ M bei Testung auf estrogene (a) und antiestrogene (b) Wirkung.

11.3.2 Untersuchung der antiproliferativen Wirkung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol an MCF-7 Zellen

Für den Konzentrationsbereich von 1 - 10 µM konnte für die Verbindungen **154** und **155** im Proliferationstest an MCF-7 Zellen kein nennenswerter Einfluss auf das Zellwachstum in einem zeitabhängigen Versuch festgestellt werden (Abb. 40).

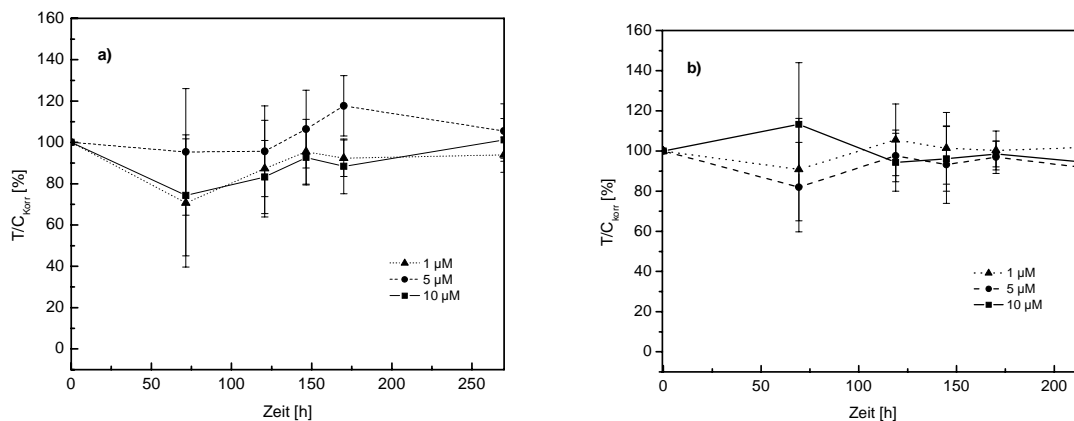
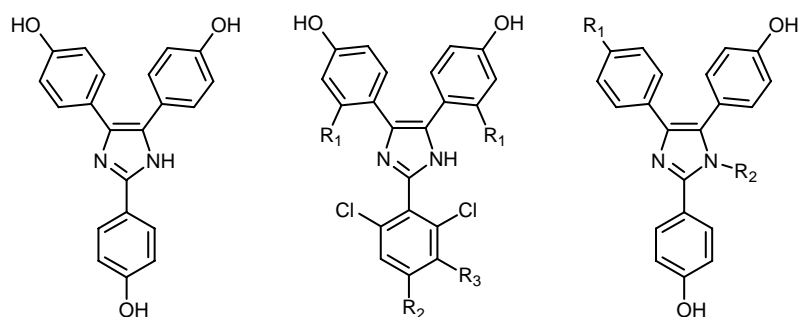


Abbildung 40. Untersuchung der antiproliferativen Wirkung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**154**) (a) und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol (**155**) (b) auf MCF-7 Zellen in den Konzentrationen 1 µM, 5 µM und 10 µM.

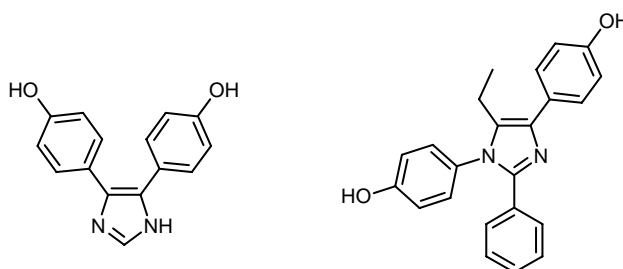
11.4 Eigenschaften von 1,2,4-tri-, 1,2,5-tri- und 1,2,4,5-tetrasubstituierten 1*H*-Imidazolen sowie 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4*H*-indeno[2,3-*d*]imidazol

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Genaktivierung von symmetrischen 2,4,5-Triaryl-1*H*-imidazolen (**158** und **49a** - **49d**) [216] im Luciferase-Assay an stabil transfizierten MCF-7 Zellen untersucht (Schema 63). Dabei wurden relative Aktivierungen zwischen 2% (**49a**) und 7% (**49d**) in einer Konzentration von 10^{-6} M ermittelt. Für diese Verbindungen wurden RBA-Werte von < 0.02% (**49a**) und 0.19% (**49d**) mit Kalbsuterus-Cytosol als Estrogenrezeptorquelle bestimmt [216]. Die relative Bindungsaffinität der *N*-alkylierten Verbindungen **159a** - **159c** und **160** wurden mit Lammuterus-Cytosol, mit Werten zwischen < 0.17% (**159c**) und 0.63% (**159b**) gemessen [217]. Der RBA-Wert des 1*H*-Imidazols **158** wurde mit < 0.02% [216] bzw. < 0.007% [217] bestimmt. Das 4,5-diarylierte Derivat **161** und das in Position C(5) alkylierte 1,2,4,5-tetrasubstituierte 1*H*-Imidazol **18** zeigten einen RBA von < 0.001% bzw. 0.37% [217].

**158**

49a, R₁: H, R₂: H, R₃: OH
49b, R₁: H, R₂: OH, R₃: H
49c, R₁: F, R₂: OH, R₃: H
49d, R₁: Cl, R₂: OH, R₃: H

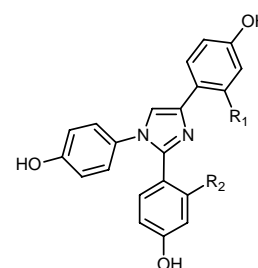
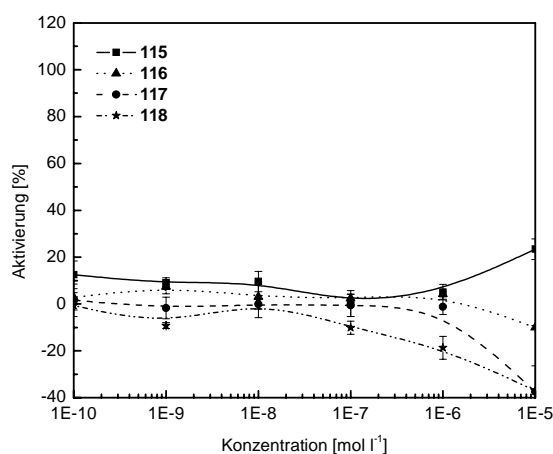
159a, R₁: OH, R₂: Et
159b, R₁: OH, R₂: Pr
159c, R₁: OH, R₂: Bu
160, R₁: H, R₂: Et

**161****18**

Schema 63

11.4.1 Agonistische Wirkung von 1,2,4-Triaryl-1*H*-imidazolen im Luciferase-Assay

Zur weiteren Untersuchung der Eigenschaften von unsymmetrischen 1,2,4-triarylierten 1*H*-Imidazolen wurden chlorierte und unchlorierte, in Position C(5) nicht-alkylierte Derivate (**115** - **118**) der Verbindung **18** im Luciferase-Assay untersucht (Schema 64). Es wurden die an den Arylringen, an C(2) und C(4), mono- bzw. dichlorierten Verbindungen **116** - **118** getestet.



115, R₁: H, R₂: H
116, R₁: H, R₂: Cl
117, R₁: Cl, R₂: H
118, R₁: Cl, R₂: Cl

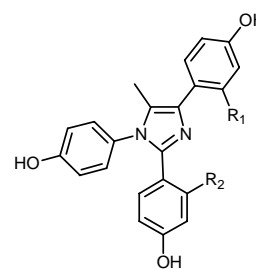
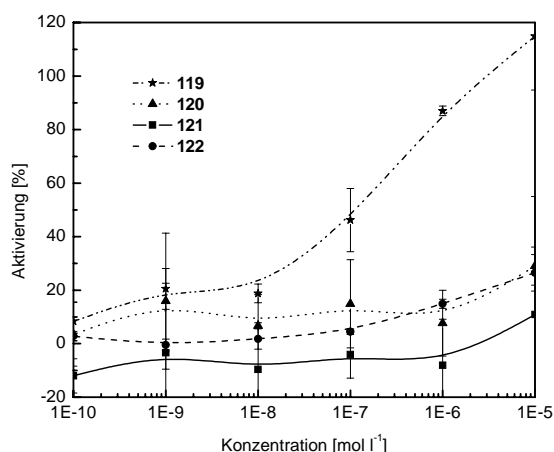
Abbildung 41. Testung auf agonistische Wirkung der 1,2,4-Triaryl-1*H*-imidazole **115** - **118** in einem Konzentrationsbereich von 10⁻¹⁰ - 10⁻⁵ M.

Schema 64

Über einen Konzentrationsbereich von 10⁻¹⁰ - 10⁻⁵ M wurde die Aktivierung bestimmt (Abb. 41). Für alle Verbindungen beträgt die Aktivierung von 10⁻¹⁰ - 10⁻⁷ M zwischen -10% und 13%, die Aktivierung divergiert mit zunehmender Konzentration zwischen -37% und 24%.

11.4.2 Agonistische Wirkung von 1,2,4-Triaryl-5-methyl-1*H*-imidazolen im Luciferase-Assay

Darüber hinaus wurden die an C(5) methylierten 1*H*-Imidazole **119** - **122** mit dem in Kapitel 11.4.1 beschriebenen Substitutionsmuster untersucht (Schema 65). Dabei konnte für die unchlorierte Verbindung **119** in Konzentrationen von 10⁻⁶ M und 10⁻⁵ M eine Aktivierung von 87% bzw. 115% gemessen werden (Abb. 42). Die übrigen 1*H*-Imidazole **120** - **122** zeigten dagegen keine nennenswerte Aktivierung.



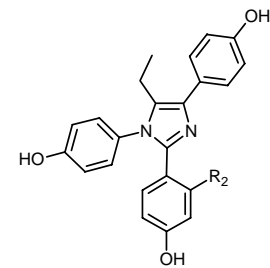
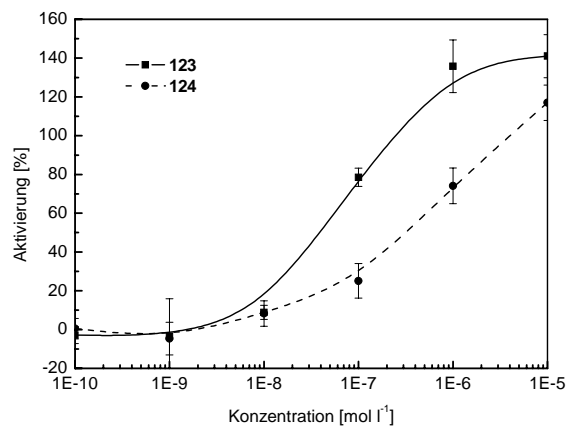
119, R₁: H, R₂: H
 120, R₁: H, R₂: Cl
 121, R₁: Cl, R₂: H
 122, R₁: Cl, R₂: Cl

Abbildung 42. Testung auf agonistische Wirkung der 1,2,4-Triaryl-5-methyl-1*H*-imidazole **119** - **122** in einem Konzentrationsbereich von 10⁻¹⁰ - 10⁻⁵ M.

Schema 65

11.4.3 Agonistische Wirkung von 1,2,4-Triaryl-5-ethyl-1*H*-imidazolen, 5-Ethyl-2,4-bis-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol und 5-Ethyl-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol im Luciferase-Assay

Das in Position C(5) ethylierte und an allen Arylresten in para-Position hydroxylierte, neu synthetisierte 1*H*-Imidazol **123** wurde ebenfalls auf seine estrogene Wirkung untersucht (Schema 66). Diese Verbindung zeigte die stärkste Aktivierung aller in dieser Arbeit untersuchten Substanzen. Es wurde eine Aktivierung von 136% in einer Konzentration von 10⁻⁶ M gemessen (Abb. 43). Das einzige zugängliche chlorierte Derivat **124**, das mit der in Kapitel 5.3 beschriebenen Cyclisierung herstellbar war, zeigte dagegen nur eine Aktivierung von 74%. Wobei sich die Aktivitäten bei 10⁻⁵ M mit 141% (**123**) und 117% (**124**), aufgrund der Plateaubildung bei der maximalen Aktivierung für Verbindung **123** und einer weiteren Aktivitätszunahme für **124**, annähern. Um den Einfluss der 4-Hydroxylgruppen auf die agonistische Wirkung zu untersuchen, wurde an Verbindung **123** umlaufend je eine 4-Hydroxylgruppe an den Arylen in den Positionen N(1), C(2) und C(4) entfernt und die Aktivität im Luciferase-Assay bestimmt (Schema 67). Dabei wurde für jede Dehydroxylierung eine Aktivitätsabnahme in Bezug auf **123** gemessen. Der geringste Aktivitätsverlust, auf 82% bei 10⁻⁶ M, wurde für die an C(2)-Aryl dehydroxylierte Verbindung **18** beobachtet. Ein weiterer Aktivitätsrückgang um 31% auf 51% wurde für das 1*H*-Imidazol **130** gemessen. Die Abwesenheit der 4-Hydroxylgruppe am C(4)-Aryl (**125**) führte dagegen zu einem völligen Verlust der estrogenen Wirkung (Abb. 44).

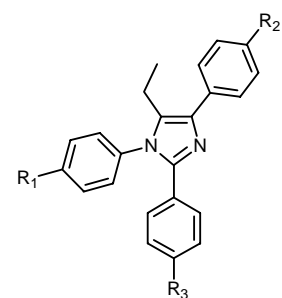
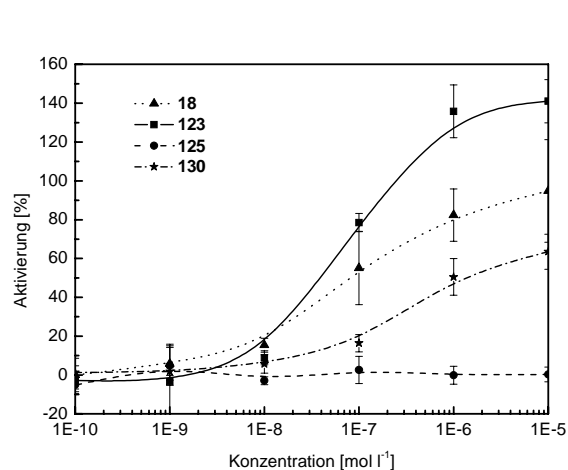


123, R₂: H
124, R₂: Cl

Abbildung 43. Aktivierung der 1,2,4-Triaryl-5-ethyl-1*H*-imidazole **123** und **124** in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-5} M bei Testung auf estrogenen Wirkung.

Schema 66

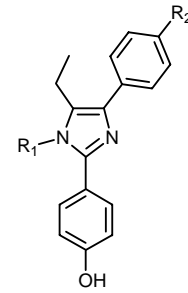
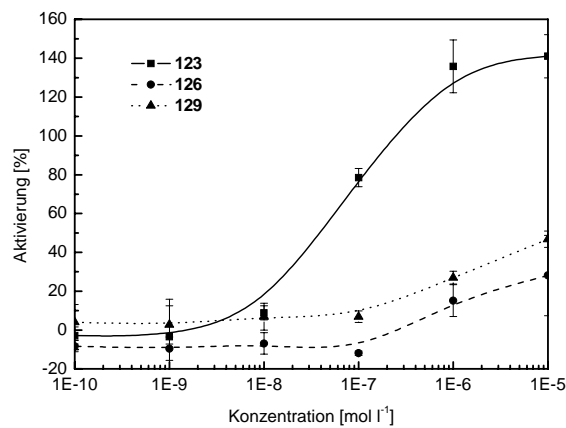
Erwartungsgemäß wurde für die an N(1)- und C(4)-Aryl zweifach dehydroxylierte Verbindung **126** eine sehr geringe estrogenen Aktivität von 15% bei einer Konzentration von 10^{-6} M ermittelt. Wurde nicht nur die Hydroxylfunktion am N(1)-Aryl, sondern die gesamte phenolische Gruppe entfernt, so sank die estrogenen Potenz weiter, von 51% (**130**, Abb. 44) auf 27% (**129**) ab (Schema 68, Abb. 45). Aber auch die Dealkylierung an C(5) geht mit einem Verlust der estrogenen Aktivierung einher (Kap. 11.4.1, Abb 41, **115**).



18, R₁: OH, R₂: OH, R₃: H
123, R₁: OH, R₂: OH, R₃: OH
125, R₁: OH, R₂: H, R₃: OH
130, R₁: H, R₂: OH, R₃: OH

Abbildung 44. Aktivierung der 1,2,4-Triaryl-5-ethyl-1*H*-imidazole **18**, **123**, **125** und **130** in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-5} M bei Testung auf estrogenen Wirkung.

Schema 67

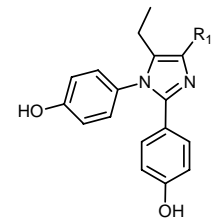
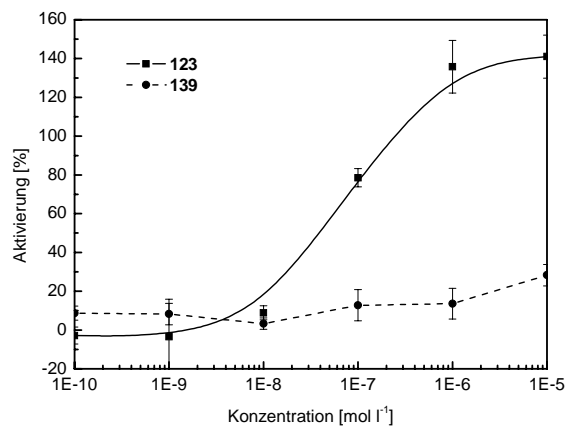


123, R₁: p-OH-Phe, R₂: OH
126, R₁: Phe, R₂: H
129, R₁: H, R₂: OH

Abbildung 45. Testung auf agonistische Wirkung des 2,4-Bis-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazols **129** und der 1,2,4-Triaryl-1*H*-imidazole **126** und **123** in einem Konzentrationsbereich von 10⁻¹⁰ - 10⁻⁵ M.

Schema 68

Das 1,2-Diaryl-5-ethyl-1*H*-imidazol **139** zeigt gegenüber dem 1,2,4-Triaryl-5-ethyl-1*H*-imidazol **123** keine agonistische Wirkung in einem Konzentrationsbereich von 10⁻¹⁰ - 10⁻⁵ M (Schema 69, Abb. 46).



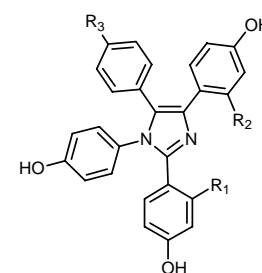
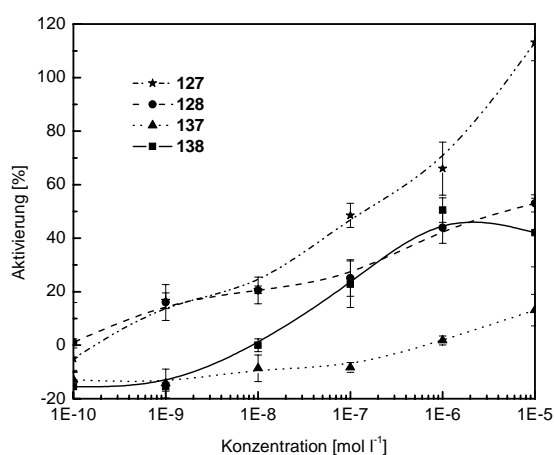
123, R₁: p-OH-Phe
139, R₁: H

Abbildung 46. Vergleich der agonistischen Wirkung des C(5)-alkylierten 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazols **139** mit der Verbindung **123** in einem Konzentrationsbereich von 10⁻¹⁰ - 10⁻⁵ M.

Schema 69

11.4.4 Agonistische Wirkung von 1,2,4,5-Tetraaryl-1*H*-imidazolen im Luciferase-Assay

Um den Einfluss des Substituenten an C(5) auf die estrogenen Wirkung näher zu untersuchen, wurden neben den C(5)-alkylierten 1*H*-Imidazolen auch 1,2,4,5-tetraarylierte Verbindungen dargestellt und untersucht (Schema 70). Die Einführung einer 4-Hydroxyphenylgruppe an C(5) (**137**) führte zu keiner estrogenen Wirkung (Abb. 47). Die Substitution mit einer Phenylfunktion (**127**) dagegen lieferte eine Aktivität von 66% (10^{-6} M). Zur Verifizierung des Einflusses von Chlorsubstituenten am C(2)- und C(4)-Aryl auf die agonistische Wirkung, wurden die ortho-monochlorierten Derivate **128** und **138** des 1,2,4,5-Tetraaryl-1*H*-imidazols **127** dargestellt und untersucht. Wie auch bei den an C(5) methylierten und ethylierten 1*H*-Imidazolen führte auch hier eine Chlorierung zu einer Abnahme der Aktivität. Es wurden Aktivitäten von 51% (**128**) und 44% (**138**) gemessen.



127, R₁: H, R₂: H, R₃: H
128, R₁: Cl, R₂: H, R₃: H
137, R₁: H, R₂: H, R₃: OH
138, R₁: H, R₂: Cl, R₃: H

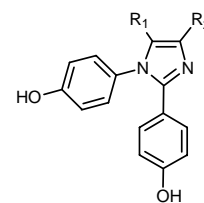
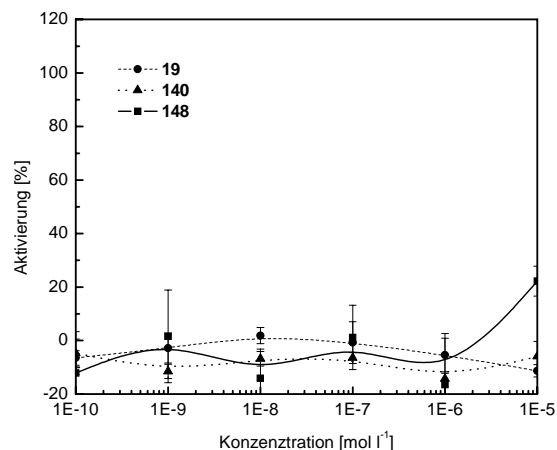
Abbildung 47. Testung auf agonistische Wirkung der 1,2,4,5-Tetraaryl-1*H*-imidazole **127**, **128**, **137** und **138** in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-5} M.

Schema 70

11.4.5 Agonistische Wirkung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol mit CF₃-, Ethyl- und Phenylgruppen in der Position C(4) im Luciferase-Assay

Um weiteren Aufschluss über die Bedeutung der Substituenten an C(4) und C(5) zu bekommen, wurden zum einen an C(4) eine CF₃- (**19**) und eine Phenylgruppe (**148**) eingeführt und C(5) unsubstituiert gelassen. Zum anderen wurde bei Verbindung **140** C(4) ethyliert und C(5) methyliert (Schema 71). Bei keiner der drei Verbindungen konnte in einem

Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-5} M eine nennenswerte agonistische Wirkung nachgewiesen werden (Abb. 48).



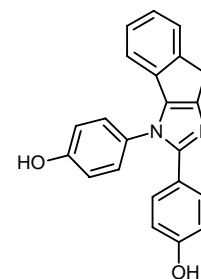
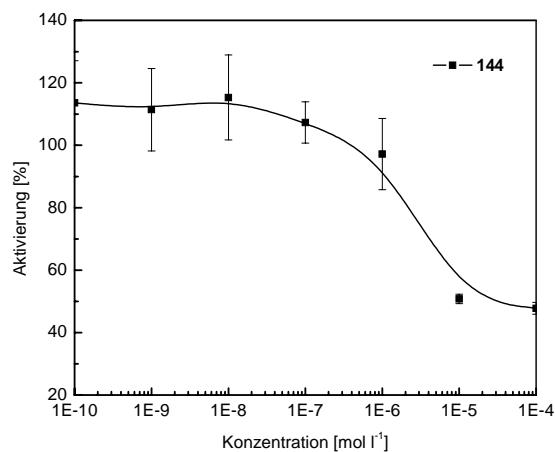
19, R₁: H, R₂: CF₃
 140, R₁: Me, R₂: Et
 148, R₁: H, R₂: Phe

Abbildung 48. Agonistische Wirkung der Verbindungen **19**, **140** und **148** im Luciferase-Assay

Schema 71

11.4.6 Antagonistische Wirkung von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4H-indeno[2,3-d]imidazol im Luciferase-Assay

Alle in den Kapiteln 11.4.1 - 11.4.5 auf agonistische Wirkung untersuchten Verbindungen wurden auch auf ihre antagonistische Potenz untersucht. Für keine der oben aufgeführten Substanzen konnte eine antiestrogene Wirkung festgestellt werden.



144

Abbildung 49. Antagonistische Wirkung von 1,2-Diaryl-4H-indeno[2,3-d]imidazol **144** im Luciferase-Assay.

Schema 72

Neben den 1,2,4-tri-, 1,2,5-tri- und 1,2,4,5-tetrasubstituierten *1H*-Imidazolen wurde auch ein diaryliertes *4H*-Indeno[2,3-*d*]imidazol im Luciferase-Assay untersucht (Schema 72). Das 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-*4H*-indeno[2,3-*d*]imidazol (**144**) zeigte zwischen 10^{-7} M und 10^{-5} M eine Abnahme der Aktivität von 107% auf 51% (Abb. 49). Eine estrogenere Wirkung konnte nicht nachgewiesen werden.

11.4.7 Bestimmung der relativen Bindungsaffinität von *1H*-Imidazolen zum Estrogenrezeptor

Neben der Untersuchung auf estrogenere und antiestrogenere Wirkung wurde der RBA-Wert der *1H*-Imidazole mit Kalbsuterus-Cytosol als Estrogenrezeptorquelle bestimmt. Die Ergebnisse der 1,2,4-tri-, 1,2,5-tri- und 1,2,4,5-tetrasubstituierten *1H*-Imidazole sowie von 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-*4H*-indeno[2,3-*d*]imidazol (**144**) sind in den Tabellen 10 und 11 zusammengefasst. Für keine der untersuchten Verbindungen wurde ein nennenswerter RBA-Wert gefunden. Die höchsten Werte mit 0.11% und 0.19% wurden für die Verbindungen **122** und **123** bzw. **124** bestimmt.

Tabelle 10. RBA-Werte der 1,2,4-tri- und 1,2,4,5-tetrasubstituierten *1H*-Imidazole.

Verbindung	R-N(1)	R-C(5)	R-C(4)	R-C(2)	RBA [%]
115	4-HO-Phe	H	4-HO-Phe	4-HO-Phe	0.04
117	4-HO-Phe	H	2-Cl-4-HO-Phe	4-HO-Phe	0.05
116	4-HO-Phe	H	4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	0.06
118	4-HO-Phe	H	4-Cl-4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	0.09
119	4-HO-Phe	Me	4-HO-Phe	4-HO-Phe	0.04
121	4-HO-Phe	Me	2-Cl-4-HO-Phe	4-HO-Phe	0.03
120	4-HO-Phe	Me	4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	0.03
122	4-HO-Phe	Me	2-Cl-4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	0.11
140	4-HO-Phe	Me	Et	4-HO-Phe	0.02

Tabelle 11. RBA-Werte der 1,2,4-tri-, 1,2,5-tri- und 1,2,4,5-tetrasubstituierten *1H*-Imidazole und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-*4H*-indeno[2,3-*d*]imidazol (**144**) sowie den Verbindungen **154** und **155**.

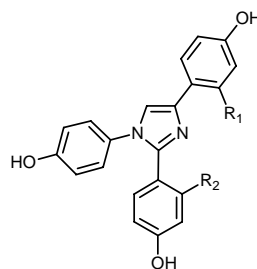
Verbindung	R-N(1)	R-C(5)	R-C(4)	R-C(2)	RBA [%]
123	4-HO-Phe	Et	4-HO-Phe	4-HO-Phe	0.11
124	4-HO-Phe	Et	4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	0.19
130	Phe	Et	4-HO-Phe	4-HO-Phe	0.02
125	4-HO-Phe	Et	Phe	4-HO-Phe	< 0.01
18	4-HO-Phe	Et	4-HO-Phe	Phe	0.06
126	Phe	Et	Phe	4-HO-Phe	0.01
139	4-HO-Phe	Et	H	4-HO-Phe	< 0.01
129	H	Et	4-HO-Phe	4-HO-Phe	< 0.01
127	4-HO-Phe	Phe	4-HO-Phe	4-HO-Phe	0.05
128	4-HO-Phe	Phe	2-Cl-4-HO-Phe	4-HO-Phe	0.03
138	4-HO-Phe	Phe	4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	0.05
137	4-HO-Phe	4-HO-Phe	4-HO-Phe	4-HO-Phe	0.04
148	4-HO-Phe	H	Phe	4-HO-Phe	0.01
19	4-HO-Phe	H	CF ₃	4-HO-Phe	0.06
144	4-HO-Phe	Inden-Rest ^{a)}	Inden-Rest ^{a)}	4-HO-Phe	0.03
155	4-HO-Phe	H	H	4-HO-Phe	0.01
154	4-HO-Phe	H, H ^{b)}	H, H ^{b)}	4-HO-Phe	0.02

^{a)} 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-*4H*-indeno[2,3-*d*]imidazol. ^{b)} 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-*1H*-imidazol.

Auch für das 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-*1H*-imidazol (**155**), dessen Struktur für alle hier diskutierten Verbindungen die Grundlage bildet sowie das davon abgeleitete Derivat des 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-*1H*-imidazols (**154**), wurde nur eine minimale Affinität zum Estrogenrezeptor bestimmt.

11.4.8 Antiproliferative Wirkung von chlorierten 1,2,4-Triaryl-1*H*-imidazolen an MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen

Alle in den Kapiteln 11.4.1 - 11.4.6 auf agonistische und antagonistische Wirkung untersuchten 1*H*-Imidazole wurden auch auf ihre antiproliferative Wirkung getestet. Die Verbindungen wurden in Konzentrationen von 1 μM , 5 μM und 10 μM zeitabhängig an MCF-7 Zellen auf ihre cytotoxischen Eigenschaften untersucht. Dabei wurde nach \approx 75-stündiger Inkubation und einer Konzentration von 10 μM nur für die Verbindung **117** eine antiproliferative (Abb. 50a) und für **118** (Abb. 51a) eine cytostatische bzw. cytocide Wirkung festgestellt (Schema 73).



116, R₁: H, R₂: Cl
117, R₁: Cl, R₂: H
118, R₁: Cl, R₂: Cl

Schema 73

Daneben wurden die Verbindungen auch auf ihre Wirkung an der hormonunabhängigen MDA-MB 231 Zelllinie untersucht. Dabei wurde in einer Konzentration von 10 μM für Verbindung **117** nach 80 h eine cytocide Wirkung gemessen (Abb. 50b).

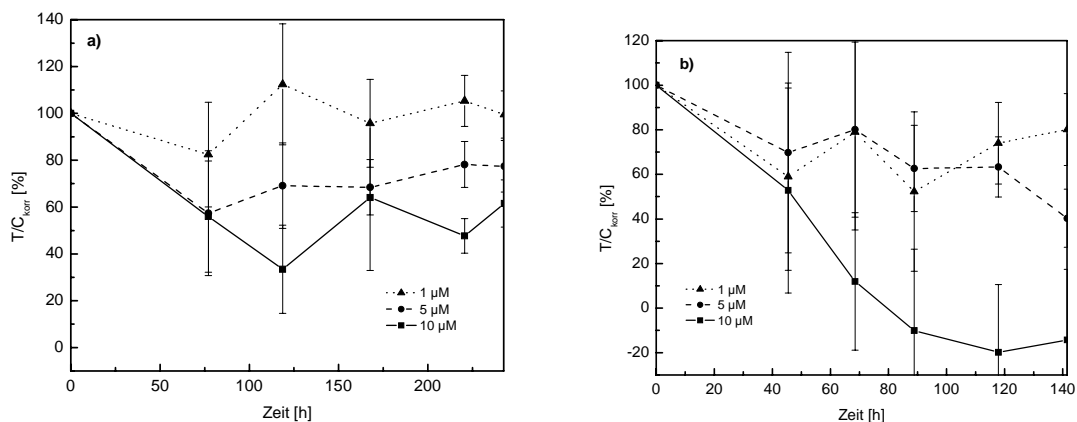


Abbildung 50. Untersuchung der antiproliferativen Wirkung des chlorierten 1,2,4-Triaryl-1*H*-imidazols **117** auf MCF-7 (a) und MDA-MB 231 Zellen (b).

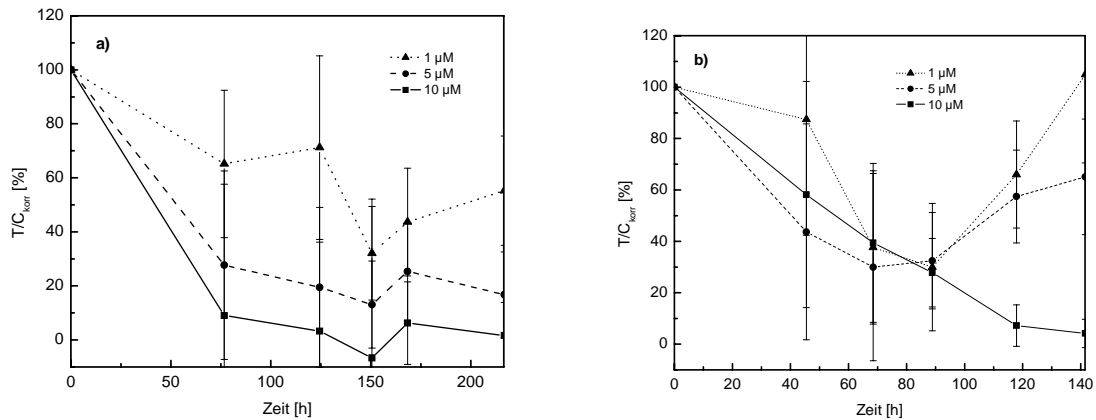


Abbildung 51. Untersuchung der antiproliferativen Wirkung des chlorierten 1,2,4-Triaryl-*1H*-imidazols **118** auf MCF-7 (a) und MDA-MB 231 Zellen (b).

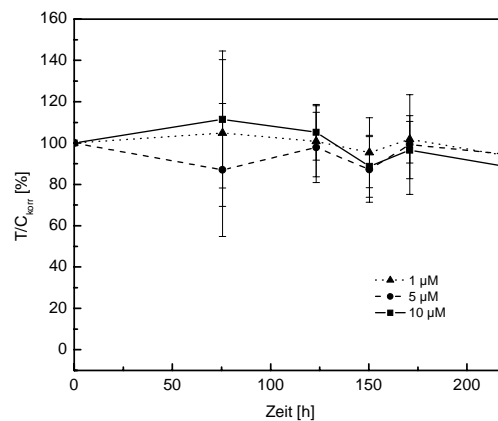


Abbildung 52. Untersuchung der antiproliferativen Wirkung von **116** auf MCF-7 Zellen.

Das *1H*-Imidazol **118** zeigte dagegen bei der gleichen Konzentration nach 100 h einen cytostatischen Effekt (Abb. 51b). Für die Konzentrationen 1 μM und 5 μM wurde nach dem Erreichen eines Minimums bei 80 h ein erneuter Anstieg der Zellzahl festgestellt. Das *1H*-Imidazol **116**, welches eine ortho-Chlorierung am C(2)-Aryl trägt, zeigte dagegen an MCF-7 Zellen keine cytotoxischen Eigenschaften (Abb. 52).

11.4.9 Antiproliferative Wirkung von chlorierten 1,2,4-Triaryl-*1H*-imidazolen an SUP-B15 und LAMA84 Zellen

Zur weiteren Verifizierung der antiproliferativen Eigenschaften wurden die chlorierten triarylierten Verbindungen **117** und **118** von Frau Dr. Kircher im Labor für Tumor- und

Immunbiologie, in der Klinischen Abteilung für Hämatologie und Onkologie an der Universitätsklinik für Innere Medizin der Stadt Innsbruck auf ihre cytotoxischen Eigenschaften an den Leukämiezelllinien SUP-B15 und LAMA84 von Patienten mit akuter lymphatischer bzw. chronischer myeloischer Leukämie untersucht. Die Untersuchungen wurden mit dem EZ4U Zell Proliferation Assay der Firma Medica konzentrationsabhängig bei einer Zellwachstumszeit von fünf Tagen durchgeführt. Es wurden Substanzkonzentrationen zwischen 1 - 50 μM untersucht. Für die chlorierten 1,2,4-triarylierten *1H*-Imidazole **117** und **118** wurde bei LAMA84 Zellen eine starke antiproliferative Wirkung festgestellt, von 90% Proliferation in 10 μM auf 15% in 25 μM für **117** und von 97% in 10 μM auf 23% in 25 μM für **118** (Abb. 53). An der SUP-B15 Zelllinie wurde ebenfalls eine deutliche cytotoxische Wirkung gemessen. Es wurde eine Abnahme der Zelldichte für die Verbindungen **117** und **118** von 61% bzw. 70% für eine Konzentrationssteigerung von 10 μM auf 25 μM ermittelt. Um die Testergebnisse der zeitabhängigen Untersuchungen im Kristallviolett-Assay (Kap. 11.4.8) mit denen des EZ4U Zell Proliferation Assays besser vergleichen zu können, wurden die *1H*-Imidazole **117** und **118** auch in diesem Testsystem mit MDA-MB 231 Zellen untersucht (Abb.54). Dabei zeigte sich, dass der zeitabhängige Test sensitiver auf die untersuchten Verbindungen reagiert. So wurde beim EZ4U Zell Proliferation Assay erst in einer Konzentration von 50 μM ein entsprechender cytostatischer Effekt erzielt, der beim Kristallviolett-Assay bereits in 10 μM erreicht wurde. Für eine Konzentrationssteigerung von 10 μM auf 25 μM wurde eine Abnahme der Poliferation von 95% auf 52% für die Verbindung **117** und von 98% auf 61% für das *1H*-Imidazol **118** gemessen.

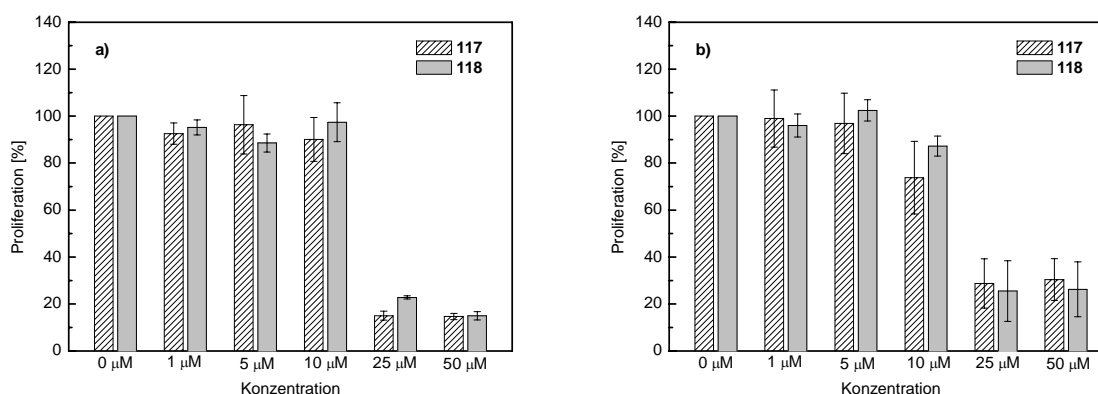


Abbildung 53. Untersuchung der antiproliferativen Wirkung der chlorierten 1,2,4-triarylierten *1H*-Imidazole **117** und **118** auf LAMA84 (a) und SUP-B15 (b) Zellen in einem Konzentrationsbereich von 0 - 50 μM bei 5-tägiger Inkubation.

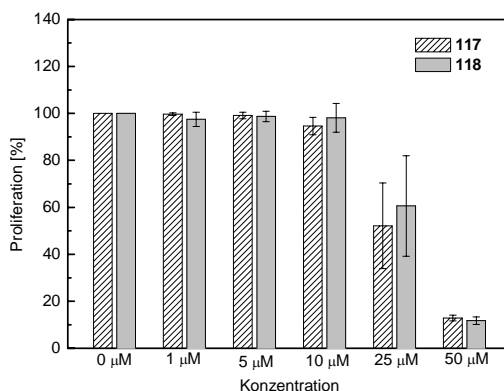


Abbildung 54. Untersuchung der antiproliferativen Wirkung der chlorierten 1,2,4-triarylierten *1H*-Imidazole **117** und **118** auf MDA-MB 231 Zellen in einem Konzentrationsbereich von 0 - 50 µM.

11.4.10 Untersuchung auf apoptoseinduzierende Wirkung von chlorierten 1,2,4-Triaryl-*1H*-imidazolen durch Detektion von ssDNA

Zur näheren Untersuchung der cytotoxischen Eigenschaften der Verbindungen **117** und **118** an den Brustkrebszelllinien MDA-MB 231 sowie der Leukämiezelllinien LAMA84 und SUP-B15 wurden von Frau Dr. Kircher Untersuchungen zur Apoptose durchgeführt. Es wurde versucht, das Auftreten von „single-stranded“ DNA [313, 314] bei der Inkubation der Zellen mit den *1H*-Imidazolen mit dem ssDNA Apoptosis ELISA Kit (APT225) der Firma Chemcon International nachzuweisen. Dazu wurden die Zelllinien mit den Verbindungen **117** und **118** in den Konzentrationen von 1 - 50 µM inkubiert und nach fünf Tagen die Zellkulturen aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelten Mengen an ssDNA wurden durch die im Antiproliferations-Assay (Kap. 11.4.9) bestimmten Zelldichten korrigiert und die Werte zu einem Blindwert, mit dem Wert von eins, ins Verhältnis gesetzt. Bei dem Blindwert handelt es sich um eine unbehandelte Zellkultur. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 55 und 56 zusammengefasst. Nach 5-tägiger Inkubationszeit der Verbindungen an der Zelllinie LAMA84 wurden für Konzentrationen von 25 µM und 50 µM für **117** die 15-fache und für **118** die 9- und 15-fache Menge an ssDNA nachgewiesen, im Gegensatz zu einer unbehandelten Zellkultur. Für eine Postivkontrolle von 30 ng ssDNA/100µl wird ein Wert von 2 erreicht.

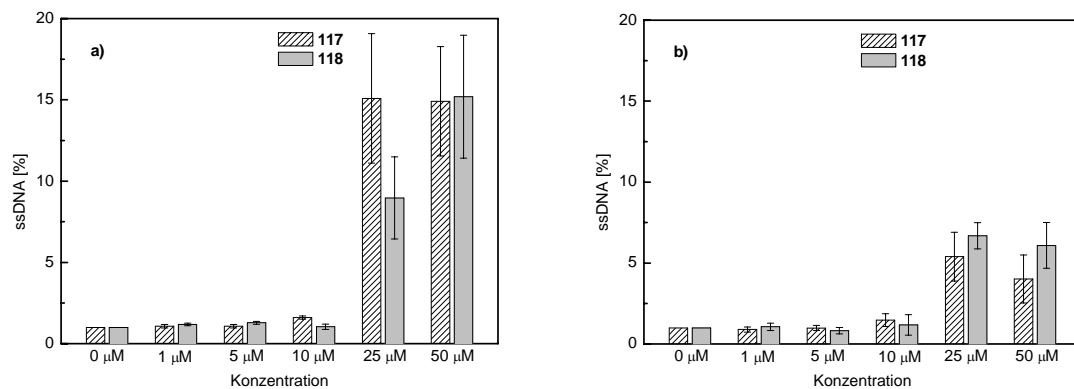


Abbildung 55. Untersuchung auf apoptoseinduzierende Wirkung der chlorierten 1,2,4-Triaryl-1H-imidazole **117** und **118** an der LAMA84 (a) und SUP-B15 Zelllinie (b) in einem Konzentrationsbereich von 1 - 50 µM bei 5-tägiger Inkubation.

An den SUP-B15 Zellen wurde dagegen über einen Konzentrationsbereich von 1 - 50 µM eine geringere Menge an ssDNA gemessen, die um das 5-fache in 10 µM und um das 4-fache in 50 µM für **117** und um den Faktor 7 bis 6 bei der Verbindung **118** erhöht war. Die Untersuchungen an MDA-MB 231 Zellen zeigten in 50 µM dafür für beide Verbindungen ein 12- (**117**) bzw. 17-fach (**118**) höheres Auftreten von ssDNA.

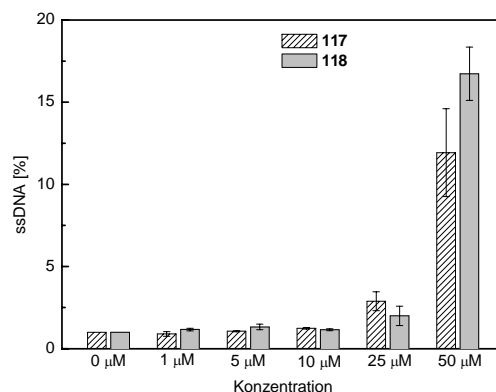


Abbildung 56. Untersuchung auf apoptoseinduzierende Wirkung der chlorierten 1,2,4-Triaryl-1H-imidazole **117** und **118** an der MDA-MB 231 Zelllinie in einem Konzentrationsbereich von 1 - 50 µM bei einer Inkubationszeit von fünf Tagen.

11.4.11 Inhibitorische Wirkung von chlorierten 1,2,4-Triaryl-1*H*-imidazolen an Cox-1 und Cox-2

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der chlorierten 1,2,4-triarylierten 1*H*-Imidazole **117** und **118** mit einer Reihe bekannter Cox-2 selektiver Inhibitoren wie z.B. DuP697, Celecoxib sowie den Verbindungen **11** oder **12** wurden die 1*H*-Imidazole **117** und **118** mit dem Cox Inhibitor Screening Assay der Firma Cayman Chemical auf ihre inhibitorische Wirkung an den beiden Isoformen der Cyclooxygenase untersucht. Die Ergebnisse der Cox-inhibierenden Wirkung sind in Abbildung 57 und 58 zusammengefasst. Die Untersuchungen wurden mit isoliertem ovinem Cox-1 und humanem rekombinanten Cox-2 Enzym mit Substanzkonzentrationen von 1 μM , 10 μM und 200 μM durchgeführt. Dabei wurde für die Inhibierung an Cox-1 für die Verbindungen **117** und **118** in einer Konzentration von 1 μM keine Enzymhemmung festgestellt. In 10 μM und 200 μM wurde eine Hemmung der Aktivität von 76% bzw. 99% ermittelt. Die Inhibierung an der Isoform 2 wurde für das 1*H*-Imidazol **118** mit 6% und für **117** mit 8%, in einer Konzentration von 1 μM bestimmt. In einer Konzentration von 10 μM wurden Inhibierungen von 51% (**118**) und 31% (**117**), bei 200 μM von 96% (**118**) und 84% (**117**) gemessen. Um weiteren Aufschluss über die Bedeutung der einzelnen Strukturelemente für die inhibitorische Wirkung der 1*H*-Imidazole an den Isoformen der Cyclooxygenase zu erhalten, wurden auch das 1,2,4-Triaryl-5-ethyl-1*H*-imidazol **123**, das 1,2,4-Triaryl-1*H*-imidazol **115** und das trifluormethylierte 1,2-Diaryl-1*H*-imidazol **19** auf ihre enzymhemmende Wirkung untersucht.

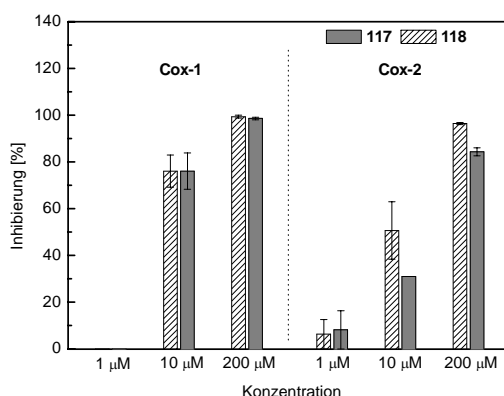


Abbildung 57. Inhibierende Wirkung der chlorierten 1,2,4-Triaryl-1*H*-imidazole **117** und **118** an den Cyclooxygenase Isoformen 1 und 2 in Konzentrationen von 1 μM , 10 μM und 200 μM . Es wurden Inhibierungen zwischen 6% (**118**) und 7% (**117**) von Cox-2 bei 1 μM und 99% (**117**, **118**) von Cox-1 bei 200 μM bestimmt.

Dabei wurde für die Verbindung **115** eine Inhibierung von 19% in 10 μM und von 71% in 200 μM an Cox-1 gemessen. Bei der Isoform 2 wurden Werte von 17% bzw. 20% bestimmt. Darüber hinaus wurde auch in einer Konzentration von 1 μM eine Inhibierung von 6% ermittelt. Die *1H*-Imidazole **19** und **123** zeigen an der Isoform 2 ebenfalls eine geringe Inhibierung von 12 - 22% in Konzentrationen von 1 - 200 μM . Verbindung **123** zeigt bei 200 μM an Cox-1 eine hemmende Aktivität von 40%.

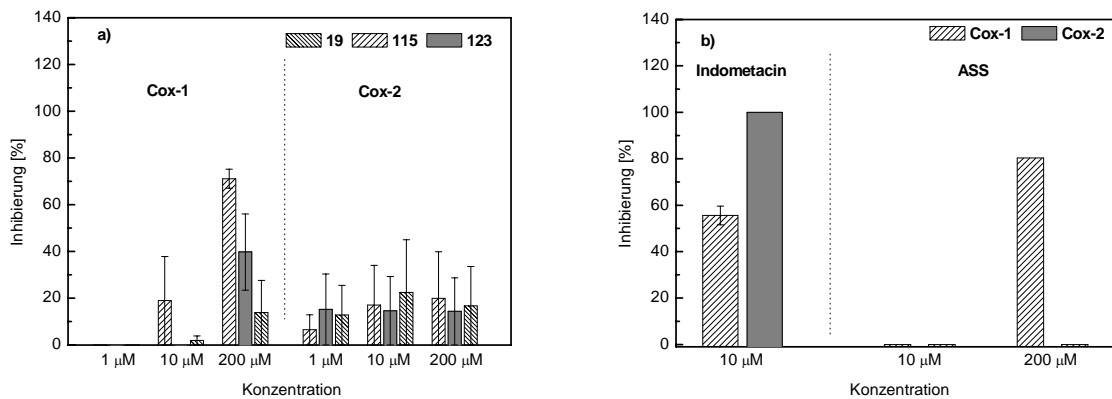


Abbildung 58. a) Inhibierende Wirkung der *1H*-Imidazole **19**, **115** und **123** an Cox-1 und -2 in einem Konzentrationsbereich von 1 - 200 μM . b) Hemmung der Cox-Aktivität durch Acetylsalicylsäure und Indometacin an beiden Isoformen.

Für Acetylsalicylsäure (ASS) wurde nur in einer Konzentration von 200 μM für die Isoform 1 eine Inhibierung von 80% gemessen. Das Indometacin zeigte eine hemmende Aktivität von 56% für Cox-1 und 100% für Cox-2 in einer Konzentration von 10 μM (Abb. 58).