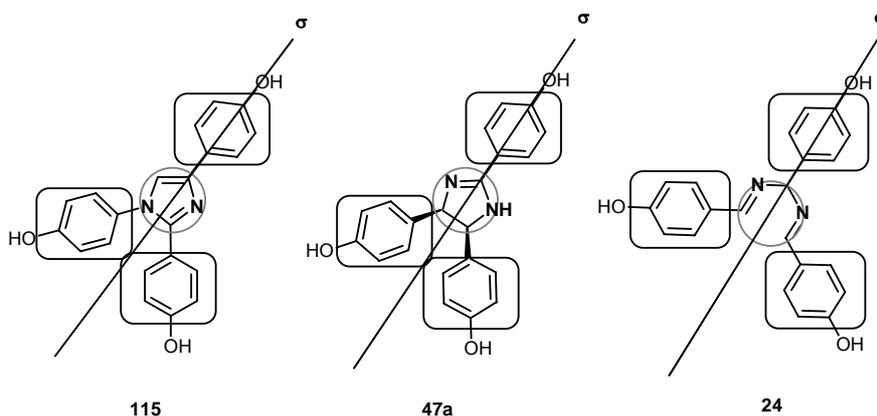


12 Diskussion

12.1 Strukturelle Analogien zwischen 2-Imidazolinen, 1H-Imidazolen und benzylierten Methandiaminen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene triarylierte 2-Imidazoline (**47a**), 1H-Imidazole (**115**) und benzylierte Methandiamine (**24**) auf ihre agonistische und antagonistische Wirkung am Estrogenrezeptor untersucht. Alle Verbindungen zeichnen sich durch eine trigonale Anordnung ihrer phenolischen Substituenten aus. Das zentrale Strukturelement ist dabei ein 2-Imidazolin, ein 1H-Imidazol bzw. eine offenkettige 5-atomige Struktur mit zwei Stickstoffatomen. Für die Methandiaminderivate wurde in der Kristallstruktur die Ausbildung einer ringanalogen Konformation [222] beobachtet (Schema 74), aber auch in der gestreckten Molekülform nehmen die Arylreste eine trigonale Anordnung ein.



Schema 74

Als wesentliches Charakteristikum der einzelnen Verbindungsklassen kann der Grad der Planarität der Strukturen angesehen werden. Das 1H-Imidazol zeigt aufgrund der sp^2 -Hybridisierung der Kohlenstoff- und Stickstoffatome eine planare Struktur [315]. Die trigonal-planare Geometrie der sp^2 -Hybridorbitale ordnet auch die arylischen Substituenten in der Ringebene an. Dabei müssen die Substituenten selber keine koplanare Stellung einnehmen. So wurden die Torsionswinkel zwischen den Arylsubstituenten und der Heteroaromatenebene mit $\theta = 74.1^\circ$ (N(1)), $\theta = 15.4^\circ$ (C(2)), $\theta = 47.9^\circ$ (C(4)) und $\theta = 78.1^\circ$ (C(5)), eines 1,2,4,5-Tetraaryl-1H-imidazols, auskristallisiert aus einem Pikrinsäure-Ethanolgemisch (1:1), bestimmt [315].

Im 2-Imidazolin zeigen beide Stickstoffatome, hervorgerufen durch einen schnellen Protonentransfer, eine partielle sp^2 -Hybridisierung, sodass die resultierende planare N-C=N-

Gruppierung dem Imidazolinring eine ebene Struktur aufzwingt [216]. Die auftretende Spiegelsymmetrie wird durch die chemische Äquivalenz der Protonen und Kohlenstoffatome in den beiden Molekülhälften durch die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie (Kap. 7) bestätigt. Infolge der sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatome in den Positionen 4 und 5 werden die Arylsubstituenten in eine pseudoaxiale Position gedrängt. In der vorliegenden Arbeit wurden *meso*-konfigurierte 2-Imidazoline auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Für das *meso*-4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin **15b** wurde für die Arylreste ein Diederwinkel von $60 - 70^\circ$ berechnet [312]. Der Torsionswinkel für die ekliptisch angeordneten Aromaten wurde für das nicht ortho-substituierte *meso*-4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin **15a** mit 3.5° berechnet [216]. Ein Torsionswinkel von 8.2° wurde dagegen für ein unsymmetrisch ortho-halogeniertes 4,5-Diaryl-2-imidazolin [216] errechnet. Für *meso*-4-(2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-5-(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazolin (**156**) und *meso*-4-(2,6-Dichlor-4-hydroxyphenyl)-5-(2-fluor-4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazolin (**157**) mit Kopplungskonstanten von 12.0 Hz und 12.1 Hz für die ^3J -Kopplungen der benzyllischen Protonen wurde ein Torsionswinkel (θ) von $0 - 25^\circ$ abgeschätzt [216]. Eine Ausnahme von der vollständigen Symmetrie stellt das 2-Imidazolin mit 2,6-Dichlor-4-hydroxyphenylresten an C(4) und C(5) dar. Für die aromatischen Protonen wurden bei dieser Verbindung (**47c**) zwei Singulets bei 6.80 ppm und 6.71 ppm gemessen, was auf eine Rotationseinschränkung hinweist. Diese Beobachtung wurde auch bereits am analogen diaryliertem 2-Imidazolin gemacht [216].

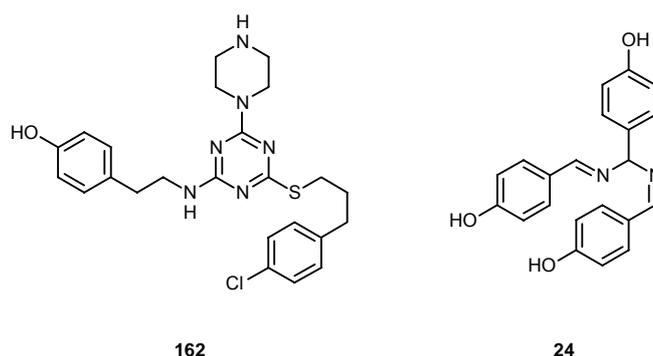
Die benzylierten Methandiamine zeigen eine gewellte Struktur [222], hervorgerufen durch die unterschiedliche Hybridisierung der Atome. Der Methankohlenstoff zeigt eine sp^3 -Hybridisierung mit einer tetraedrischen Anordnung seiner Substituenten. Die Kohlenstoffatome sowie die Stickstoffatome in dem Imin-Strukturelement zeigen beide aufgrund der sp^2 -Hybridisierung eine trigonal-planare Geometrie.

Die Strukturen der *N,N'*-Bis[benzyliden]arylmethandiamine und 2-Imidazole lassen sich, mit Ausnahme des *meso*-2-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolins, wenn der C(2)-Arylring eine coplanare Stellung einnimmt (**47d**), mit der Symmetrieeoperation der Spiegelung (σ) beschreiben. Aber auch bei den 1,2,4-triarylierten 1*H*-Imidazolen lassen sich die Strukturelemente der 4-Hydroxyphenylgruppen durch Spiegelung oder Drehung an der σ -Achse mit sich selbst zur Deckung bringen. Der Heteroaromat folgt dieser Symmetrie nicht.

12.2 Strukturelemente und estrogene Wirkung

12.2.1 *N,N'*-Bis[benzyliden]arylmethandiamine als Liganden für den Estrogenrezeptor

Die *N,N'*-Bis[benzyliden]arylmethandiamine folgen nicht nur dem Strukturprinzip einer arylierten Verbindung mit trigonaler Anordnung funktioneller Gruppen, die zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigt sind, sondern sie ermöglichen durch ihre offenkettige Struktur und der hiermit einhergehenden Flexibilität den Zugang zu neuen Bindungsmodi. Für eine kürzlich [316] beschriebene Serie von 2,4,6-trisubstituierten 1,3,5-Triazinen, die beide Merkmale miteinander vereinigt, wurden K_i -Werte von 10 - 40 nM am ER β mit einer 30-fachen Subtypspezifität von ER β gegenüber ER α ermittelt. Dabei konnte durch Kokristallisation der Verbindung **162** (Schema 75) mit der LBD des ER β gezeigt werden, dass der Piperazinrest im 11 β -Kanal in Richtung des Asp 303 und die 4-Hydroxyphenylethylamino-Funktion zu den Aminosäuren Arg 346 und Glu 305 orientiert ist. Der 4-Chlorphenylpropylsulfanylrest ist dabei am Iso 373 in der Estradiolbindungstasche lokalisiert. Die Alkylkette beschreibt dabei eine Schleife in der LBD. Die Untersuchungen der SAR-Studie zeigten, dass die *N,N'*-Bis[benzyliden]arylmethandiamine **23** und **24** keine agonistische und antagonistische Wirkung im Luciferase-Assay besitzen. Als Ursache kann die sehr geringe Stabilität der Verbindungen angesehen werden. In UV-spektroskopischen Untersuchungen wurde bei 37°C in PBS innerhalb von 30 Minuten ein Verlust einer Absorptionsbande bei 290 nm beobachtet. Dies wurde als hydrolytische Spaltung der Imin-Gruppe interpretiert.



Schema 75

12.2.2 *meso*-Konfigurierte 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline als Liganden für den Estrogenrezeptor

In der Verbindungsklasse der 2-Imidazoline wurde versucht, durch die Einführung einer phenolischen Funktion in der C(2)-Position die Genaktivierung der bereits synthetisierten und an C(4) und C(5) in ortho-Position halogenierten diarylierten 2-Imidazoline [216] zu steigern. Die Triarylierung von heterocyclischen Fünfringen folgt einem grundlegenden Strukturprinzip einer ganzen Reihe von nicht-steroidalen Liganden für den Estrogenrezeptor, so z.B. von Pyrazolen [107, 317], Furanen [109] und Oxazolen [217]. Darüber hinaus wurden auch aliphatische Monocyclen wie 1,2,4-Triarylcyclopenta-1,3-diene [318] auf ihre Bindungsaffinität untersucht.

In vorangegangenen Untersuchungen [312] wurde eine Hydrolyseempfindlichkeit der an N(1) und C(2) nicht alkylierten *meso*-konfigurierten 4,5-Diaryl-2-imidazoline festgestellt. Nähere Untersuchungen zeigten, dass das als Hydrolyseprodukt der Verbindung **15b** identifizierte (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-2-Amino-1,2-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)ethan-1-formamid (**163**) nicht hauptsächlich für die gemessene genaktivierende Wirkung verantwortlich sein kann. Für das formylierte Ethan-1,2-diamin **163** wurde lediglich eine Aktivierung von 21% (10^{-6} M) gemessen, während die relative Aktivierung des 2-Imidazolins **15b** mit 67% bestimmt wurde. Ausgehend von diesem Ergebnis kann für die Diskussion des Bindungsmodus von einem geschlossenen 2-Imidazolinring ausgegangen werden, da eine kurze Stimulationszeit bzw. eine lang anhaltende Stimulierung auf niedrigem Niveau für die Genaktivierung ausreichend zu sein scheint.

Durch Alkylierungen der C(2)-Position wurde in der Vergangenheit versucht die agonistische Wirkung der 2-Imidazoline am Estrogenrezeptor durch Erhöhung der Lipophilie zu steigern [312]. Es zeigte sich aber, dass bei dem unchlorierten 2-Imidazolin **15a** durch Methylierung und Ethylierung keine Wirkungssteigerung erzielt werden konnte (H-C(2): 0% (**15a**) → Me-C(2): 2% (**164**) → Et-C(2): 6% (**167**), Tab. 12). Die zuvor gut wirksamen Verbindungen **15b** und **156** büßten dagegen ihre agonistischen Eigenschaften ein (H-C(2): 67% (**15b**) → Me-C(2): -5% (**165**) → Et-C(2): 6% (**168**), H-C(2): 112% (**156**) → Me-C(2): 24% (**166**)). Auch durch die Einführung einer Hydroxyethyl-Funktion an C(2) zur Absenkung der Lipophilie und zur Ausbildung neuer H-Brücken mit dem Rezeptor konnte kein Anstieg der Aktivität erzielt werden (0% (**169**), 20 % (**170**)). Es zeigte sich nur die bereits bekannte Wirkungserhöhung durch den Einfluss der Chlorsubstitution an den phenolischen Gruppen in der Position C(4) und C(5).

Um das Strukturprinzip bereits bekannter und hoch wirksamer sowie selektiv wirkender Verbindungen aufzugreifen, wurden *meso*-konfigurierte 4,5-Diaryl-2-imidazoline an der C(2)-Position mit einer 4-Hydroxyphenylgruppe bzw. 2-Chlor-4-hydroxyphenylgruppe aryliert. Für das unchlorierte 2-Imidiazolin **15a** konnte durch keinen der beiden Substituenten eine Wirkungssteigerung hervorgerufen werden (-9% (**47a**), 6% (**47c**)).

Tabelle 12. Relative Aktivierung von an C(2) alkylierten und arylierten *meso*-konfigurierten 4,5-Diaryl-2-imidazolinen im Luciferase-Assay.

Verbindung	R-C(2)	R-C(4)	R-C(5)	rel. Aktivierung bei 10 ⁻⁶ M [%]
15a	H	4-OH-Ph	4-OH-Ph	0 ^{a)}
15b	H	2-Cl-4-OH-Ph	2-Cl-4-OH-Ph	67 ^{a)}
156	H	2,6-Cl ₂ -4-OH-Ph	2-Cl-4-OH-Ph	112 ^{a)}
164	Me	4-OH-Ph	4-OH-Ph	2 ^{b)}
165	Me	2-Cl-4-OH-Ph	2-Cl-4-OH-Ph	-5 ^{b)}
166	Me	2,6-Cl ₂ -4-OH-Ph	2,6-Cl ₂ -4-OH-Ph	24 ^{b)}
167	Et	4-OH-Ph	4-OH-Ph	6 ^{b)}
168	Et	2-Cl-4-OH-Ph	2-Cl-4-OH-Ph	6 ^{b)}
169	HO-CH ₂ -CH ₂	4-OH-Ph	4-OH-Ph	0 ^{b)}
170	HO-CH ₂ -CH ₂	2-Cl-4-OH-Ph	2-Cl-4-OH-Ph	20 ^{b)}
47a	4-OH-Ph	4-OH-Ph	4-OH-Ph	-9
47b	4-OH-Ph	2-Cl-4-OH-Ph	2-Cl-4-OH-Ph	6
47d	4-OH-Ph	2,6-Cl ₂ -4-OH-Ph	2,6-Cl ₂ -4-OH-Ph	12
47c	2-Cl-4-OH-Ph	4-OH-Ph	4-OH-Ph	6

^{a)} [216], ^{b)} [312].

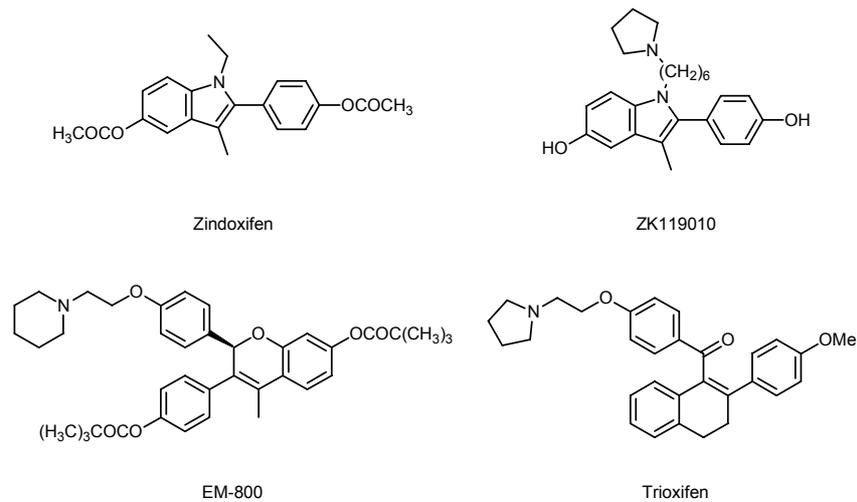
Das *meso*-4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidiazolin **15b** verlor durch die Einführung der 4-Hydroxyphenylgruppe seine Wirkung (67% (**15b**) → 6% (**47b**)). Eine marginal bessere Wirkung von 12% wurde für das tetrachlorierte 2,4,5-Triaryl-2-imidiazolin **47d** ermittelt. Die kaum nennenswerten Unterschiede in der Aktivität können durch den signifikanten Einfluss der Chloratome erklärt werden.

In den bisherigen Untersuchungen wurden die estrogen wirksamen *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazoline als Typ-II Estrogene bezeichnet [218]. Sie zeichnen sich durch einen besonderen Bindungsmodus zur Ligandenbindungsdomäne des ER α aus. Darin bildet die Hydroxylgruppe eines Phenylrests eine Wasserstoffbrücke zum Asp 351, die nach Brzozowski [89] auch für die Bindung des Piperidinrests der Seitenkette des Raloxifens oder nach Shiau [93] für die Ausbildung einer Salzbrücke der Dimethylaminogruppe der Seitenkette des 4-Hydroxytamoxifens in der LBD verantwortlich ist. Die zweite phenolische OH-Gruppe bindet dabei analog der Hydroxylgruppe am Ring **A** des 17 β -Estradiols über eine Wasserstoffbrücke zum Guanidiniumrest des Arg 394, der Carboxylatgruppe des Glu 353 und einem inkorporierten Wassermolekül.

Im Gegensatz dazu werden als Klasse der Typ-I Estrogene all jene Liganden bezeichnet, die vergleichbare van der Waals-Volumen- und Wechselwirkungen wie das 17 β -Estradiol aufweisen und dessen Lage in der LBD einnehmen. Dabei treten nicht nur ausgeprägte hydrophobe Wechselwirkungen des Gonangrundkörpers mit den aliphatischen Resten der Aminosäuren ober- und unterhalb der Ringe **A** - **D** auf, sondern die 17 β -Hydroxylgruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem His 524 aus. Diese Gruppe von Estrogenen muss daher vergleichbare hydrophile Interaktionen mit der LBD aufweisen, um den ER zu aktivieren. Neben zwei Hydroxylgruppen mit einem Abstand von 10.9 Å [319], der dem im 17 β -Estradiol ähnelt, muss der Wirkstoff eine planare Struktur besitzen.

Das Strukturprinzip eines planaren Grundkörpers für Liganden des ER wird von einer Reihe von Verbindungen erfüllt, so z.B. von 2-Phenylindolen in Zindoxifen [320, 321], ZK119010 [322] (Schema 81), ERA-923 und TSE-4127 [323] (Kap. 12.2.3.2). Mit Ausnahme von Zindoxifen zeigen diese Verbindungen alle eine antiestrogene Wirkung. Zindoxifen zeigt Antitumoraktivität, sein deacetylierter Metabolit fördert hingegen das Wachstum von MCF-7 Zellen. Daneben wurden aber auch Verbindungen mit Naphthalen- (1,2,3,4-Tetrahydronaphthalen: Lasofoxifen (Schema 83), 3,4-Dihydronaphthalen: Trioxifen), Chrysen-2,8-diol- (Tetrahydrochrysen (THC), 5,6-Dihydrobenzo[c]phenanthridin [324]), Chromen-4-on- (Genistein), 2*H*-Chromen- (EM-800) [325] (Schema 76) und Indengrundgerüst [326 - 329] (Kap. 12.2.3.2) als Liganden für den ER beschrieben.

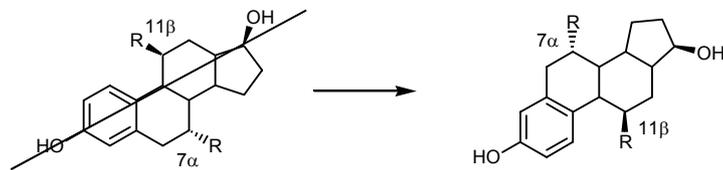
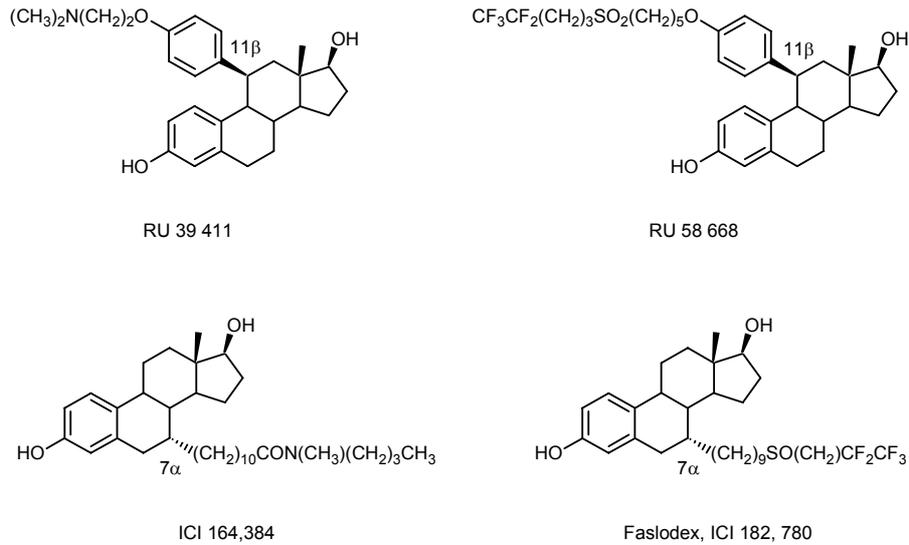
Als weitere Unterscheidung zwischen Typ-I und Typ-II Estrogenen wurde bisher das Vermögen der Typ-I Estrogene herangezogen, den physiologischen Liganden E2 aus der LBD zu verdrängen und damit Genaktivierung auszulösen. Wohingegen die Typ-II Liganden zwar eine Genaktivierung zeigen, aber im kompetitiven Assay nicht in der Lage sind, 17 β -Estradiol aus der Bindungstasche zu verdrängen.



Schema 76

In neueren Berechnungen zum Bindungsmodell für Typ-II Estrogene [330] konnten das Arg 394, Glu 353 und ein Wassermolekül als wahrscheinliche Bindungsstelle in der Estradiolbindungstasche der LBD bestätigt werden. Dagegen konnte das Asp 351 in dem 11 β -Kanal nicht als zweite Bindungsstelle verifiziert werden. An dessen Stelle wird das Thr 347 zur Ausbildung einer zweiten Wasserstoffbrücke für die Typ-II Estrogene vorgeschlagen.

Eine Reihe von rein antiestrogen wirksamen 7 α - und 11 β -substituierten Estradiolderivaten (Schema 77, Kap.1.1.10) zeichnen sich durch einige Besonderheiten aus. Sie verbinden die optimale Struktur zur Raumerfüllung der Estradiolbindungstasche eines Typ-I Estrogens mit einer hoch flexiblen Seitenkette mit hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften. Darüber hinaus können die Substituenten in den Positionen 7 α und 11 β durch die Operation einer Spiegelung oder Drehung an einer Achse durch C(3) und C(17) in das jeweilige strukturäquivalente Molekül überführt werden. Für die in früheren Arbeiten postulierte Bindung der *meso*-4,5-Diaryl-2-imidazoline als Typ-II Estrogene wurden als Strukturanaloga die 11 β -(4-Hydroxyphenyl)estradiolteilstruktur der Verbindungen RU 39 411 und RU 58 668 herangezogen. Dabei wurden die 4-Hydroxyphenylgruppen des 2-Imidazolins mit dem Arylrest in der 11 β -Position und dem Ring **A** des 17 β -Estradiols zur Superposition gebracht. Der 2-Imidazolring zeigt dabei in die Ebene des Gonangerüsts. Werden die neu synthetisierten *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline in Analogie zu den diarylierten 2-Imidazolinen **15a** - **15b** mit den 4-Hydroxyphenylteilstrukturen des 11 β -(4-Hydroxyphenyl)estradiols zur Deckung gebracht, so ragt der phenolische Substituent an C(2) über den Ring **C** des Estradiols hinaus und steht dabei deutlich oberhalb der Molekülebene (Abb. 59, links).



Schema 77

Eine Bindung ist durch die sterische Hinderung mit LBD nicht mehr möglich. Würde man dagegen nur eine 4-Hydroxyphenylgruppe mit dem phenolischen Substituenten in der 11β-Position zur Deckung bringen und den 2-Imidazolinring mit dem Arylrest an C(2) in die Ebene der Ringe **C** und **D** des Estradiols legen, so würde zwar die zweite 4-Hydroxyphenylgruppe die gleiche Orientierung wie der Ring **A** einnehmen, jedoch oberhalb dessen die Molekülebene verlassen (Abb. 59, rechts). Damit scheint die Affinität zur LBD unabhängig davon zu sein, welche der beiden 4-Hydroxyphenylgruppen aus der Molekülebene herausragt. So zeigen beide Enantiomere des 3-[4-(1-Piperidinoethoxy)phenyl]spiro[inden-1,1'-indan]-5,5'-diol Hydrochlorids (**171**, **172**) [331] eine Affinität zum Estrogenrezeptor (Schema 78). In einem kompetitiven radio-metrischen Bindungs-Assay mit MCF-7 Zellcytosol wurden K_i -Werte von 9.05 nM (OS-689) und 78.3 nM (*ent-1*) (Schema 78) bestimmt. Damit befinden sich die 11β-analoge 4-Hydroxyphenylgruppe in der Ebene des Indengerüsts, während der über ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom gebundene Indanrest je nach Enantiomer sich ober- oder unterhalb der Molekülebene befindet (Abb. 60). Diese Struktur unterscheidet sich damit vom Raloxifen, bei dem sich die 11β-analoge Arylgruppe durch eine trigonal-planare Carbonylfunktion aus der Molekülebene drehen kann. In der Kristallstruktur der kokristallisierten LDB mit Raloxifen steht die Arylgruppe mit der basischen Seitenkette mit einem Torsionswinkel von fast 90° zum Benzothiophengerüst [89].

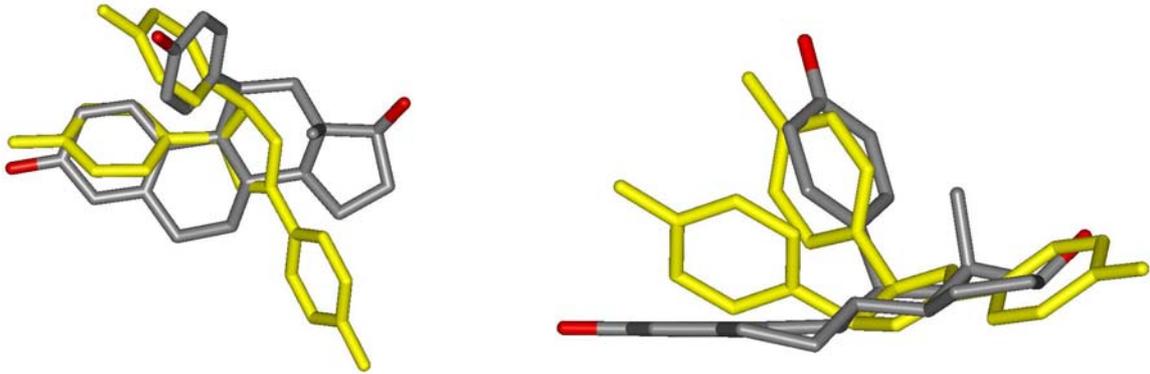
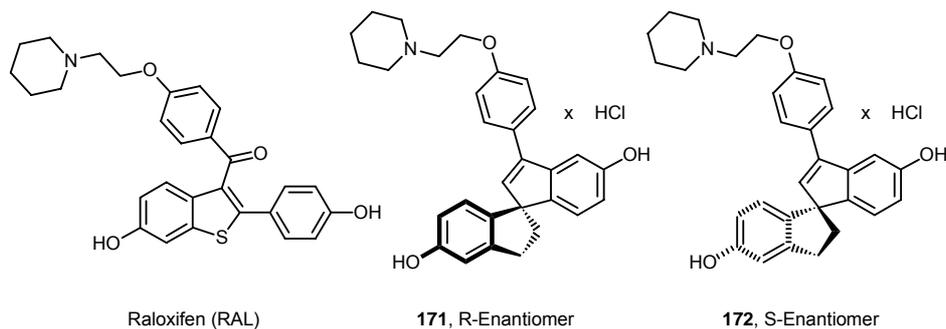


Abbildung 59. Superposition vom *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazolin **47a** mit 11 β -(4-Hydroxyphenyl)estradiol. Aufsicht auf Verbindung **47a** mit 11 β -(4-Hydroxyphenyl)estradiol bei Orientierung der Aryle am 2-Imidazolin in Richtung des **A**-Rings im Gonan und zum 11 β -4-Hydroxyphenyl (links). Im rechten Teil der Abbildung wurden die benzylichen Kohlenstoffatome C(4) und C(5) von **47a** an den Kohlenstoffen in den Positionen 11 und 9 des E2 und C(2) des 2-Imidazolins **47a** an C(13) ausgerichtet.

Das Bemerkenswerte an den Verbindungen **171** und **172** ist jedoch, dass sie nicht der oben aufgestellten Hypothese nach einer planaren Struktur für den die Hydroxylgruppen tragenden und das Gonansystem imitierenden Molekülteil folgen. Dabei ist zu beachten, dass auch die 17 β -Hydroxylgruppe des Estradiols oberhalb der Molekülebene steht.



OS-689 ((+)-Enantiomer)^{a)} und *ent-1*^{a)}

^{a)} Die absolute Konformation wurde nicht bestimmt [199].

Schema 78

Einem ähnlichen strukturellen Aufbau folgt das Lasofoxifen, die beiden Arylreste des Diaryltetrahydronaphthalens verlassen die Molekülebene, die Estradioltasche erfüllende

Teilstruktur weist damit ebenfalls eine Winkelung auf (Schema 79). Lasofoxifen zeichnet sich durch eine hohe Bindungsaffinität zum ER α aus [332]. Für den nicht-steroidalen Agonisten/Antagonisten konnte in der Ratte ein positiver Einfluss auf die Knochendichte festgestellt werden [333, 334]. Darüber hinaus konnten mit Lasofoxifen in der Ratte erfolgreich chemoinduzierte Mammatumore behandelt sowie eine präventive Wirkung festgestellt werden [335]. Lasofoxifen ist das linksdrehende Enantiomer (1*R*,2*S*), das sich durch eine 20-fach höhere Bindungsaffinität von dem (1*S*,2*R*)-Enantiomer unterscheidet. Diese höhere Affinität beruht aber nicht auf unterschiedlichen sterischen oder elektronischen Effekten der Enantiomeren in der LBD, sondern auf der unterschiedlichen Glucuronisierung [332]. Das Lasofoxifenderivat Nafoxidin zeigt bei planarer Struktur eine antiestrogene Wirkung [336, 337].

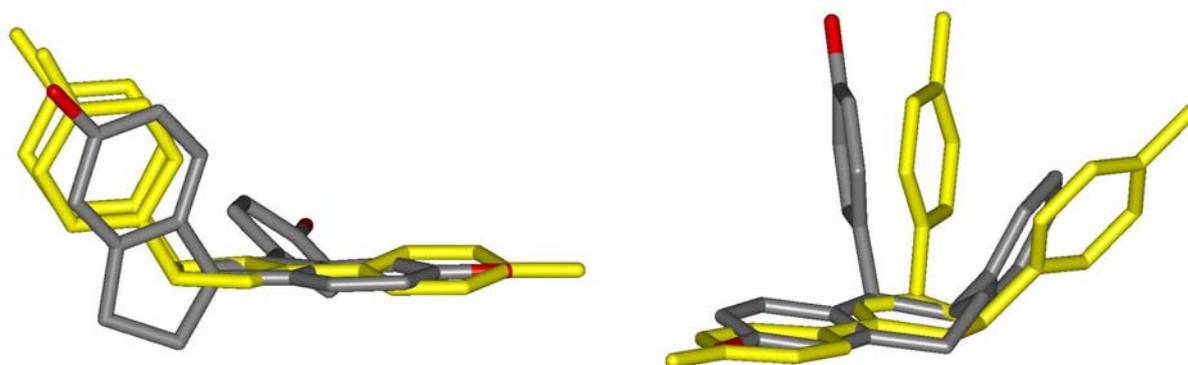
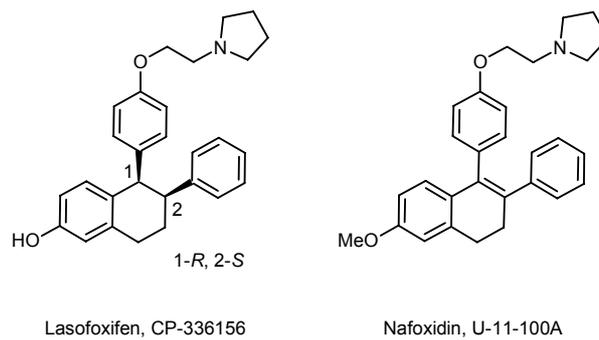


Abbildung 60. Superposition des *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazolins **47a** (gelb) mit dem R-Enantiomer des Spiro[inden-1,1'-indan]-5,5'-diols (links) und der 1-(4-Hydroxyphenyl)-2-phenyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-6-ol-Teilstruktur des Lasofoxifens (rechts). Bei den Spiroverbindungen liegt die Hydroxylgruppe am Arylrest mit dem Indengerüst in einer Ebene, die Indanständige weist aus ihr heraus. Die Arylgruppen des 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalens stehen beide oberhalb der Molekülebene, verlassen die Ebene aber in unterschiedlichen Winkeln. In beiden Verbindungen kann nur eine 4-Hydroxyphenylgruppe des 2-Imidazolins **47a** einer äquivalenten Gruppe zugeordnet werden.

Übertragen auf die neu dargestellten *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline heißt das, dass die gewinkelte Struktur ausgehend vom Arylrest an C(2) über den 2-Imidazolring hin zu der 4-Hydroxyphenylgruppe in der Position C(5) in der Lage ist den Estradiol-Kanal in der LBD auszufüllen, dass aber die zweite phenolische Funktion an C(4) eine andere räumliche Orientierung einnehmen muss.



Schema 79

Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass die hydroxylierten Strukturelemente, die zum einen den 11 β -Kanal und zum anderen die Estradiolbindungstasche mit der Orientierung in Richtung des Arg 394 und dem Glu 353 erfüllen sollen, einmal innerhalb der Molekülebene und zum anderen aus ihr herauszeigen muss. Dabei scheint es unerheblich zu sein, welche Bindungstasche das gewinkelte Strukturelement aufnimmt.

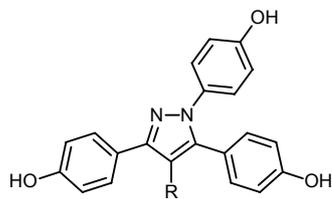
Eine Orientierung in Analogie des Lasofoxifens mit den phenolischen Gruppen in Richtung des His 524 erscheint aufgrund der Ausrichtung der Arylgruppe an C(2) kaum möglich, kann aber in Analogie zu planaren triarylierten 5-atomigen Heteroaromaten nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Kap. 12.2.3).

Um abschließend Klarheit über die Wirkung von *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen am ER zu gewinnen, müssen Untersuchungen zur Genaktivierung noch mit einem Subtyp-spezifischen Test auf ER β durchgeführt werden, da die in den hier vorgestellten Untersuchungen verwendeten MCF-7 Zellen kaum detektierbare Menge an ER β [12] exprimieren.

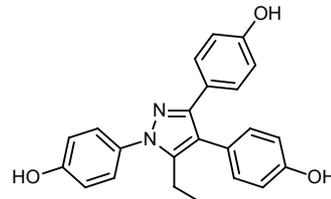
12.2.3 1*H*-Imidazole als Liganden für den Estrogenrezeptor

12.2.3.1 Agonistische Interaktion

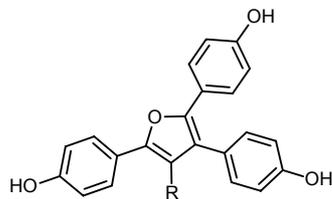
In den vergangenen Jahren ist eine Vielzahl von alkylierten triarylierten 5-atomigen Heteroaromaten und Alicyclen auf ihre Bindungsaffinität zum ER untersucht worden [107, 109, 317, 318]. In Schema 80 sind einige der untersuchten Verbindungen dargestellt. Daneben wurden aber auch mit einer Reihe anderer arylierter Heterocyclen wie z.B. 3,5-Diaryl-1*H*-pyrazol und 3,5-Diarylisoxazol [217], 2,4-Diaryl-1*H*-imidazol, 2,4-Diarylthiazol und 2,4-Diaryloxazol [217], 4,5-Diaryl-1*H*-imidazol, 4,5-Diarylthiazol und 4,5-Diaryloxazol [217], 2,3,5-Triarylthiophen [109], 2,4,5-Triaryl-1*H*-imidazol [216] u.a [109], Untersuchungen zur ER-Affinität durchgeführt.



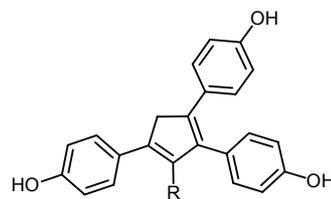
17, R: Et
4, R: *n*-Pr
173a, R: *i*-Bu
173b, R: *n*-Bu



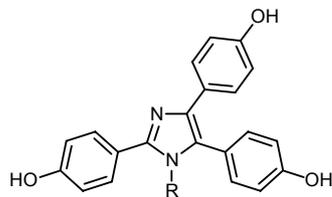
174



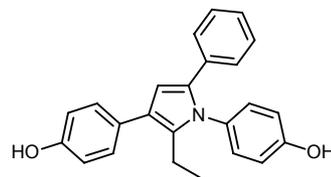
175a, R: Me
5, R: Et
175b, R: *n*-Pr
175c, R: *n*-Bu



176a, R: H
176b, R: Et



177a, R: H
177b, R: Et
177c, R: *n*-Pr
177d, R: *n*-Bu



178

Schema 80

Dabei zeigte sich, dass die alkylierten Triarylheteroaromaten und Triarylalicyclen neben einer hohen Bindungsaffinität z.T. auch eine hohe Subtypenspezifität zu einer Isoform des ER besitzen. Die Stärke der Affinität variierte dabei mit der Kettenlänge des Alkylrests. So konnte für eine Serie von 4-Alkyl-1,3,5-triaryl-1*H*-pyrazolen (**4**, **17**, **173a**, **173b**) eine ER α -Selektivität nachgewiesen werden. Die Affinität stieg vom Ethyl- (ER α : 36%) über den Propyl- (ER α : 49%) zum *iso*-Butylrest (ER α : 75%) an. Bei der *n*-Butylierung an C(4) sank dagegen die Bindungsaffinität am ER α auf 1/5 ab (Tab. 13).

Tabelle 13. Relative Bindungsaffinitäten (RBA) von 4-Alkyl-1,3,5-triaryl-1*H*-pyrazolen (**4**, **17**, **173a**, **173b**), 5-Ethyl-1,3,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazol (**174**), 4-Alkyl-2,3,5-triarylfuranen (**5**, **175a** - **175c**), 1,2,4-Triarylcyclopenta-1,3-dienen (**176a**, **176b**), 3-Alkyl-2,4,5-triaryl-1*H*-imidazolen (**177a** - **177d**) und 5-Ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**178**).

Verbindung	RBA (Cytosol) ^{a)} [%]	RBA ER α [%]	RBA ER β [%]
17	-	36 \pm 6 ^{b)}	0.15 \pm 0.014 ^{b)}
4	-	49 \pm 12 ^{b)}	0.12 \pm 0.04 ^{b)}
173^a	-	75 \pm 6 ^{b)}	0.89 \pm 0.06 ^{b)}
173b	-	14 \pm 4 ^{b)}	0.18 \pm 0.09 ^{b)}
174	7.8 \pm 4 ^{c)}	-	-
175a	2.9 \pm 0.09 ^{d)}	40 \pm 6.5 ^{d)}	0.62 \pm 0.02 ^{d)}
5	6.5 \pm 0.8 ^{d)}	140 \pm 38 ^{d)}	2.9 \pm 0.1 ^{d)}
175b	3.6 \pm 0.6 ^{d)}	100 \pm 14 ^{d)}	1.8 \pm 0.65 ^{d)}
175c	1.3 \pm 0.7 ^{d)}	21 \pm 0.6 ^{d)}	3.9 \pm 1.1 ^{d)}
176a	0.11 \pm 0 ^{e)}	3.8 \pm 1.7 ^{e)}	0.23 \pm 0.15 ^{e)}
176b	1.0 \pm 0.2 ^{e)}	4.9 \pm 0.6 ^{e)}	1.5 \pm 0.2 ^{e)}
177a	0.007 ^{f)}	-	-
177b	0.38 ^{f)}	-	-
177c	0.62 ^{f)}	-	-
177d	0.17 ^{f)}	-	-
178	0.50 ^{d)}	-	-

^{a)} Kompetitiver radio-metrischer Bindungsassay mit Lammutterus-Cytosol als Estrogenrezeptorquelle und 10 nM 17 β -[³H]-Estradiol als Tracer. Bezogen auf 100% 17 β -Estradiol. ^{b)} [107], ^{c)} [317], ^{d)} [109], ^{e)} [318], ^{f)} [217].

Das Stellungsisomer der Verbindung **17**, das 5-Ethyl-1,3,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazol (**174**), zeigte im Test mit Lammuterus-Cytosol als Estrogenrezeptorquelle eine deutlich geringere Affinität von 7.8%. Analoge Verbindungen mit einer Furangrundstruktur wurden ebenfalls hergestellt und untersucht. Auch hier wurde der Einfluss der Alkylfunktion in der Position C(4) im 2,3,5-Triarylfuran bestimmt. Bei diesen Verbindungen konnte ebenfalls eine Selektivität zum ER α (65- (**175a**), 48- (**5**), 56-fach (**175c**)) festgestellt werden. Die höchste Affinität wurde hier bereits bei einer Ethylierung an C(4) gemessen. Des Weiteren wurden auch 3-Ethyl-1,2,4-triarylcyclopenta-1,3-diene (**176a**, **176b**), 3-Alkyl-2,4,5-triaryl-1*H*-imidazole (**177a** - **177d**) und 5-Ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**178**) auf ihre Affinität zum ER hin untersucht. Bei diesen Verbindungen wurden nur moderate Bindungsaffinitäten bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Substituenten in der Position C(4) und C(5) am 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol auf die genaktivierende Wirkung im Luciferase-Assay und ihre Bindungsaffinität am ER α untersucht. Dabei wurde der Einfluss von Methyl-, Ethyl-, Phenyl-, Phenol- und ortho-chlorierten Arylsubstituenten näher betrachtet.

In der Testung auf agonistische genaktivierende Wirkung zeigte sich, dass eine Alkylierung an C(5) beim 1,2,4-Triaryl-1*H*-imidazol **115** zu einer estrogenen Wirkung führt, bei der die Aktivierung von der Methyl- (**119**) zur Ethylgruppe (**123**) zunimmt. Die ortho-Chlorierung in den C(2)- und C(4)-Arylen der methylierten Verbindung **119** führte zu einem vollständigen Verlust der agonistischen Potenz (**120** - **122**). Das ethylierte Derivat **123** erfuhr bei einer Chlorierung in ortho-Position eine Aktivitätseinbuße von 62%. Das in der para-Position an allen Arylen hydroxylierte 1,2,4-Triaryl-5-ethyl-1*H*-imidazol **123** zeigte die stärkste Aktivierung. Der Verlust der Hydroxylgruppe am C(2)-Aryl (**18**) und am N(1)-Aryl (**130**) führte zu einem Rückgang der Aktivität auf 82% bzw. 51%. Die Dehydroxylierung am C(4)-Aryl (**125**) hob jegliche estrogenen Wirkung auf. Verbindungen, die an C(4) und C(5) nur jeweils einen Alkyl- oder Arylrest (**19**, **115** - **118**, **139**, **148**) bzw. zwei Alkylgruppen (**140**) trugen, zeigten keine aktivierende Wirkung.

Dagegen konnte für das tetraarylierte 1,2,4-Tris(4-hydroxyphenyl)-5-phenyl-1*H*-imidazol (**127**) eine Aktivierung von 66% gemessen werden. Eine ortho-Chlorierung am C(4)-Aryl (**138**) verringerte die estrogenen Wirkung auf 51%, am C(2)-Aryl (**128**) auf 44%. Eine para-Hydroxylierung am C(5)-Aryl (**137**) führte zum Verlust der agonistischen Wirkung. Abbildung 61 zeigt den Einfluss der wichtigsten Substituenten auf die agonistische Wirkung.

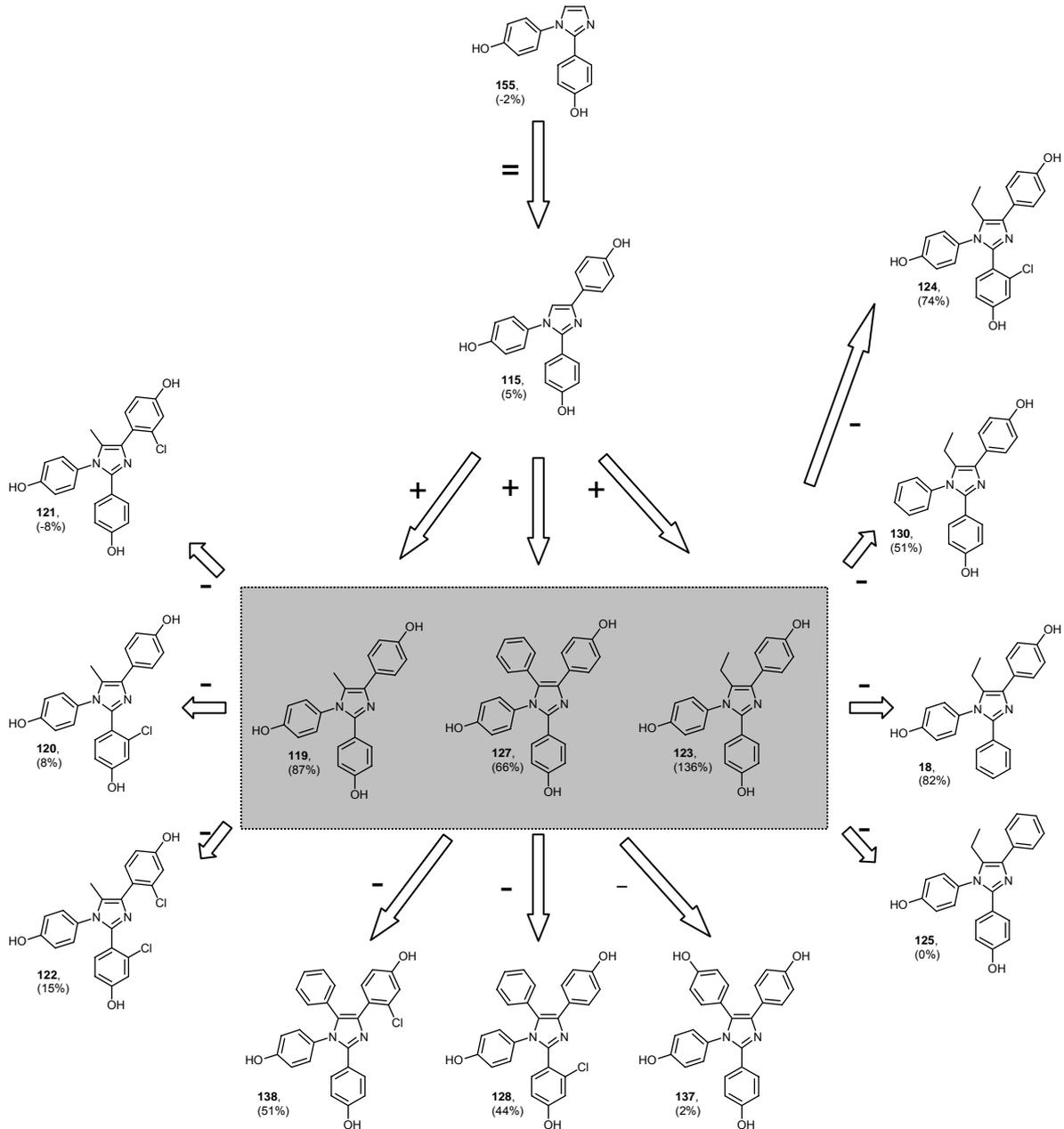


Abbildung 61. Übersicht über den Zusammenhang zwischen Strukturelementen und der relativen Aktivität im Luciferase-Assay (10^{-6} M). Alle mit + gekennzeichneten Strukturveränderungen haben zu einer Zunahme, die mit – gekennzeichneten zu einer Abnahme der genaktivierenden Wirkung geführt. = : Symbolisiert keine nennenswerten Veränderungen. Eine Alkylierung (**119**, **123**) und Arylierung (**127**) am C(5) führt zu einem Anstieg der Aktivität. Die Einführung von ortho-Chlorsubstituenten in die Arylreste an C(2) und C(4) führt zu einer Abnahme (**122**, **124**, **128**, **138**) bzw. zu einem Verlust (**120**, **121**) der Aktivität. Die relative Aktivität geht bei para-Hydroxylierung des C(5)-Aryls (**137**) verloren. Dagegen führt eine Dehydroxylierung am 1,2,4-Triaryl-5-ethyl-1H-imidazol **123** zu einer Abnahme der agonistischen Wirkung (**18**, **125**, **130**).

In den Tabellen 14 und 15 sind die Ergebnisse aller untersuchten *1H*-Imidazole zusammengefasst.

Tabelle 14. Relative Aktivierung von 1,2,4-tri-, 1,2,5-tri- und 1,2,4,5-tetrasubstituierten *1H*-Imidazolen im Luciferase-Assay.

Verbindung	R-N(1)	R-C(5)	R-C(4)	R-C(2)	rel. Aktivierung bei 10 ⁻⁶ M [%]
115	4-HO-Phe	H	4-HO-Phe	4-HO-Phe	5
117	4-HO-Phe	H	2-Cl-4-HO-Phe	4-HO-Phe	-1
116	4-HO-Phe	H	4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	4
118	4-HO-Phe	H	2-Cl-4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	-19
119	4-HO-Phe	Me	4-HO-Phe	4-HO-Phe	87
121	4-HO-Phe	Me	2-Cl-4-HO-Phe	4-HO-Phe	-8
120	4-HO-Phe	Me	4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	8
122	4-HO-Phe	Me	2-Cl-4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	15
140	4-HO-Phe	Me	Et	4-HO-Phe	-14
123	4-HO-Phe	Et	4-HO-Phe	4-HO-Phe	136
124	4-HO-Phe	Et	4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	74
130	Phe	Et	4-HO-Phe	4-HO-Phe	51
125	4-HO-Phe	Et	Phe	4-HO-Phe	0
18	4-HO-Phe	Et	4-HO-Phe	Phe	82
126	Phe	Et	Phe	4-HO-Phe	15
139	4-HO-Phe	Et	H	4-HO-Phe	14
129	H	Et	4-HO-Phe	4-HO-Phe	27

Obwohl für die hier untersuchten *1H*-Imidazole keine nennenswerte Bindungsaffinität im kompetitiven Bindungsexperiment festgestellt werden konnte, spiegeln die gefundenen Ergebnisse den für Triaryl-*1H*-pyrazole und Triarylfurane in der Literatur beschriebenen Sachverhalt wieder. Die Einführung einer Alkylgruppe in ein planares System aus einem 5-atomigen Heteroaromaten, der in einer trigonalen Anordnung mit 4-Hydroxyphenylresten substituiert ist, führt zum Auftreten einer estrogenen Wirkung am ER α . Die unterschiedliche Bindungsaffinität spiegelt sich aber in den verschiedenen Konzentrationsbereichen wieder,

die zum Erreichen einer 100%igen Genaktivierung benötigt werden. Für das *1H*-Pyrazol **4** wurde in Untersuchungen zur Transkriptionsaktivierung eine 100%ige Aktivierung bereits zwischen 10^{-9} M und 10^{-8} M [107] sowie für die Furane **175a**, **5** und **175c** bei 10^{-7} M ($\approx 90\%$) für **175a**, 10^{-9} - 10^{-8} M für **5** und 10^{-8} M für **175c** [109] an HEC-1 Zellen erreicht. Der Eintritt einer 100%igen Genaktivierung von Verbindung **123** wurde im Test mit MCF-2a Zellen zwischen 10^{-7} M und 10^{-6} M festgestellt.

Tabelle 15. Relative Aktivierung von 1,2,4-tri-, 1,2,5-tri- und 1,2,4,5-tetrasubstituierten *1H*-Imidazolen und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4*H*-indeno[2,3-*d*]imidazol (**144**) im Luciferase-Assay.

Verbindung	R-N(1)	R-C(5)	R-C(4)	R-C(2)	rel. Aktivierung bei 10^{-6} M [%]
127	4-HO-Phe	Phe	4-HO-Phe	4-HO-Phe	66
138	4-HO-Phe	Phe	2-Cl-4-HO-Phe	4-HO-Phe	51
128	4-HO-Phe	Phe	4-HO-Phe	2-Cl-4-HO-Phe	44
137	4-HO-Phe	4-HO-Phe	4-HO-Phe	4-HO-Phe	2
148	4-HO-Phe	H	Phe	4-HO-Phe	-17
19	4-HO-Phe	H	CF ₃	4-HO-Phe	-5
144	4-HO-Phe	Inden-Rest ^{a)}	Inden-Rest ^{a)}	4-HO-Phe	2
155	4-HO-Phe	H	H	4-HO-Phe	-2
154	4-HO-Phe	H, H ^{b)}	H, H ^{b)}	4-HO-Phe	-5

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

In der Literatur wird für die alkylierten Triaryl-*1H*-pyrazole [195], -furane [109] und -cyclopenta-1,3-diene [318] eine Orientierung in der Bindungstasche des ER α postuliert, die der in Abbildung 61 für 4-Propyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-*1H*-pyrazol (**4**) entspricht. Dabei zeigt der Arylring an C(3) in Richtung des Glu 353 und des Arg 394, der para-hydroxylierte Arylrest an C(5) ist in Richtung des His 524 orientiert. Die N(1)-Phenolgruppe erfüllt bei dieser Ausrichtung die Kavität des β -ständigen Methylsubstituenten in der Position C(18) des 17 β -Estradiols. Der Alkylrest ist zum Phe 404 und Met 421 hin ausgerichtet.

Für die in dieser Arbeit neu synthetisierten, in der Position C(5) alkylierten und arylierten 1,2,4-Tris(4-hydroxyphenyl)-*1H*-imidazole wird ein analoger Bindungsmodus vorgeschlagen. Obwohl für die trigonal-planare Struktur sechs verschiedene Bindungsmodi formuliert werden

können, deuten die Ergebnisse der Genaktivierungsexperimente auf diese Ausrichtung der Liganden in LBD hin.

So zeigen die Experimente zum Einfluss der verschiedenen Hydroxylgruppen auf die estrogene Aktivierung der Verbindung **123**, dass der Hydroxylgruppe am C(4)-Aryl eine bedeutende Rolle zukommt. Ohne diese funktionelle Gruppe kann keine Genaktivierung erreicht werden, wohingegen ein Verlust der Hydroxylgruppe am N(1)- und C(2)-Aryl nur zu einer AktivitätseinbuÙe führt. Da aber für die in der Literatur [338, 339] beschriebenen Verbindungen, sobald sie eine Hydroxylgruppe tragen eine Ausrichtung dieses Molekülteils in Richtung der Aminosäuren Glu 353 und des Arg 394 beschrieben ist, muss von einer besonderen Bedeutung dieser Region der LBD für die Wechselwirkung des Liganden mit dem ER ausgegangen werden. Die Versuche zeigen, dass eine Dehydroxylierung am N(1)-Aryl mit einem deutlichen Verlust an Aktivität einhergeht (**130**). Die Entfernung der gesamten Arylgruppe macht jede estrogene Wirkung (**129**, Abb. 62) zunichte. Der Verlust der Hydroxylgruppe am C(2)-Aryl spielt für die Genaktivierung eine geringere Rolle als am N(1)-Aryl (**18**), die Aktivierung ist aber gegenüber Verbindung **123** immer noch um den Faktor 1.7 erniedrigt.

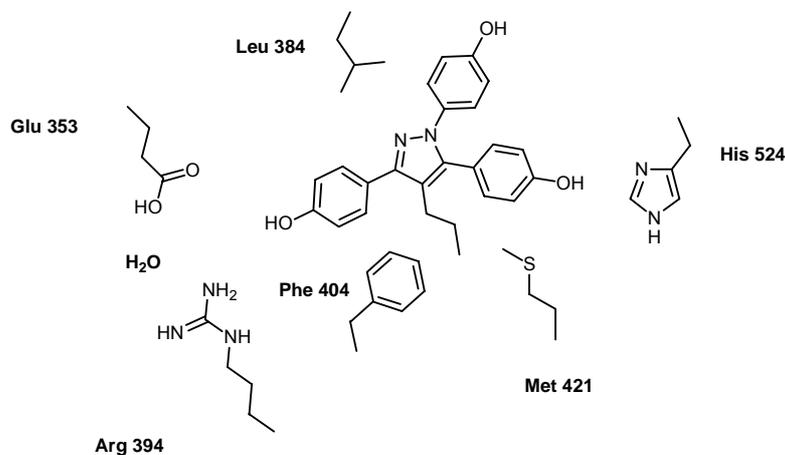


Abbildung 62. Orientierung von 4-Propyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-pyrazol (**4**) in der LBD des ER α nach [107].

Damit überhaupt eine estrogene Wirkung beobachtet werden kann, muss eine apolare Gruppe in Form eines Aryl- oder Alkylrests in Richtung der Aminosäuren Phe 404 und Met 421 orientiert sein (**115** \rightarrow **123**, **127**) (Abb. 63). Wird zusätzlich zu einem vorhandenen hydrophoben Substituenten eine hydrophile funktionelle Gruppe eingeführt, wie bei Verbindung **137**, so geht die agonistische Wirkung wieder vollständig verloren. Aber auch eine Verbindung wie **139**, die die formale Forderung nach einem hydrophoben Substituenten

erfüllt und die mit der Methyl-C(18)-Kavität des E2 wechselwirken kann, ist nicht zur Aktivierung befähigt, solange die 4-Hydroxyphenylfunktion an C(4) nicht vorhanden ist.

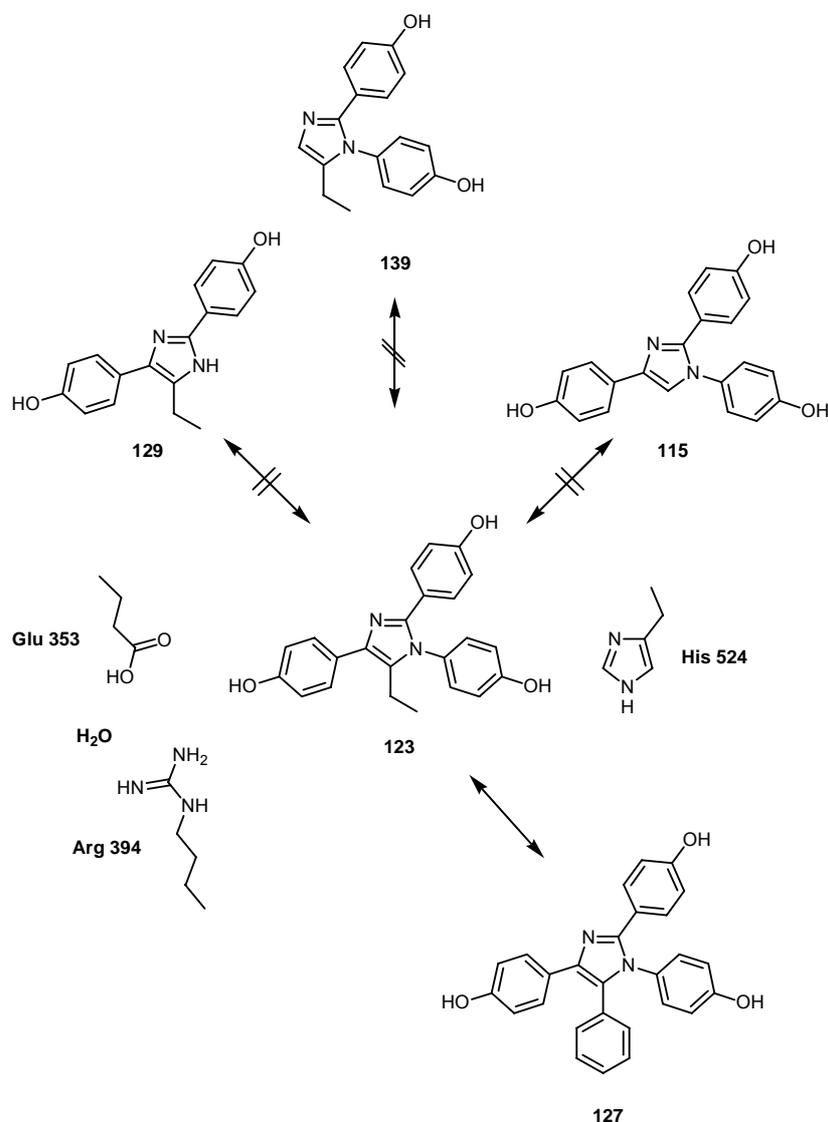


Abbildung 63. Postulierte Orientierung von 5-Ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-imidazol (**123**) in der LBD des ERα. Verbindung **127** zeigt eine analoge Struktur und ist ebenfalls zur Genaktivierung befähigt. Den Verbindungen **129**, **115** und **139** fehlen entscheidende Strukturmerkmale zur Interaktion mit dem ERα.

Diese Vorstellung passt auch gut mit den Befunden der chlorierten Derivate (**12**, **120**, **122**, **128**, **138**, **124**) zusammen. So scheinen die Chloratome durch ihre van der Waals-Wechselwirkungen oder durch sterische Hinderung eine direkte Interaktion mit LBD zu verhindern.

Abbildung 64 zeigt den aus den vorliegenden Daten erarbeiteten Bindungsmodus für die 5-Alkyl-1,2,4-triaryl-1*H*-imidazole. Dabei wurde die energieminierte Struktur des 5-Ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazols (**123**) mit dem E2 in der kokristallisierten LBD des ER α mit E2 [89] superpositioniert. Die Hydroxylgruppe am C(4)-Aryl wurde an der Hydroxylgruppe in der C(3)-Position des **A**-Rings des E2 und die Arylfunktion an C(2) an der 18 β -Methylgruppe des 17 β -Estradiols ausgerichtet. Die 4-Hydroxyphenylgruppe am N(1) ist dabei zum His 524 gewandt und der Alkylrest orientiert sich zum Phe 404 und Leu 346. Die Hydroxylgruppe am C(4)-Aryl weist zum Glu 353 und zum Arg 394 sowie dem inkorporierten Wassermolekül.

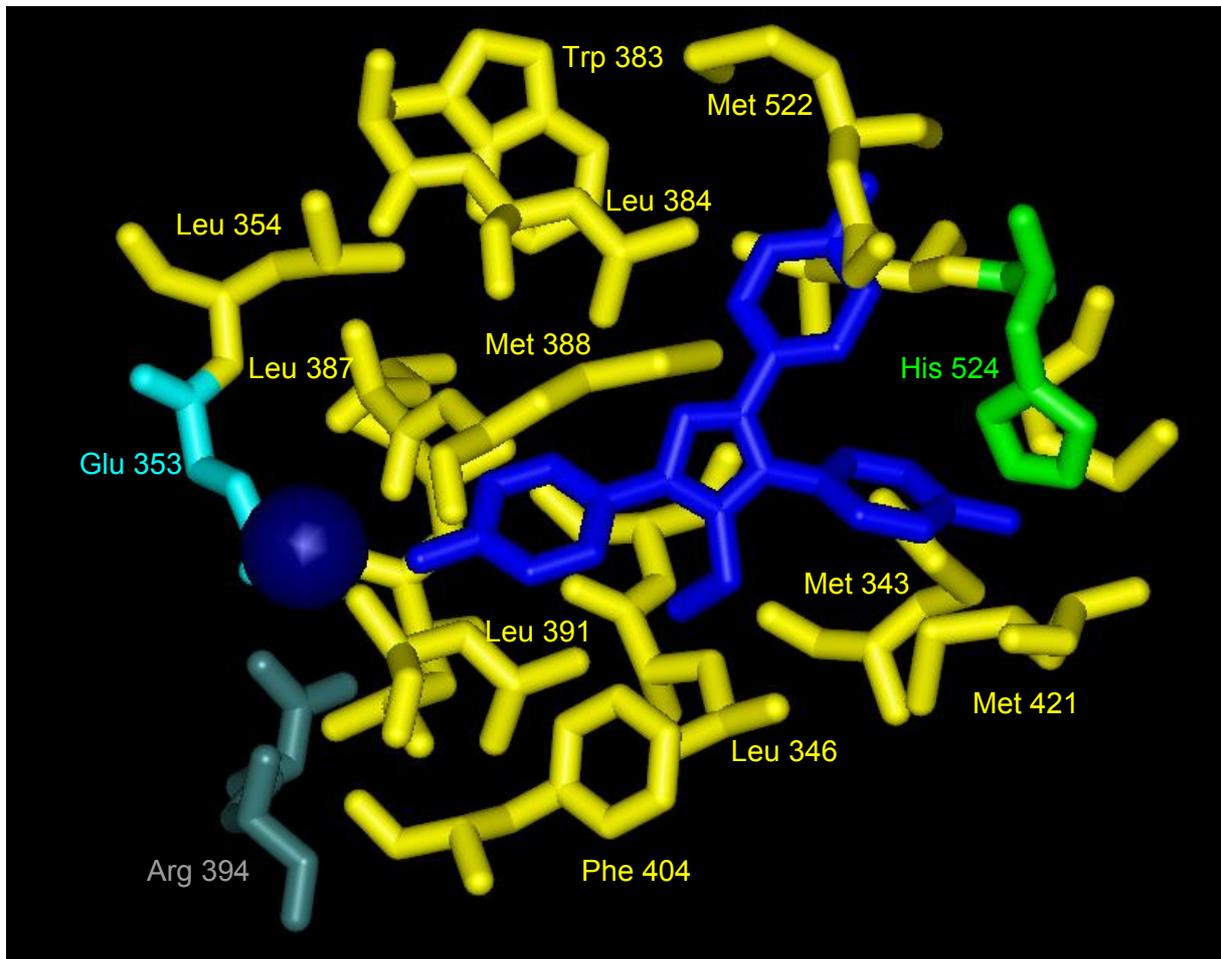


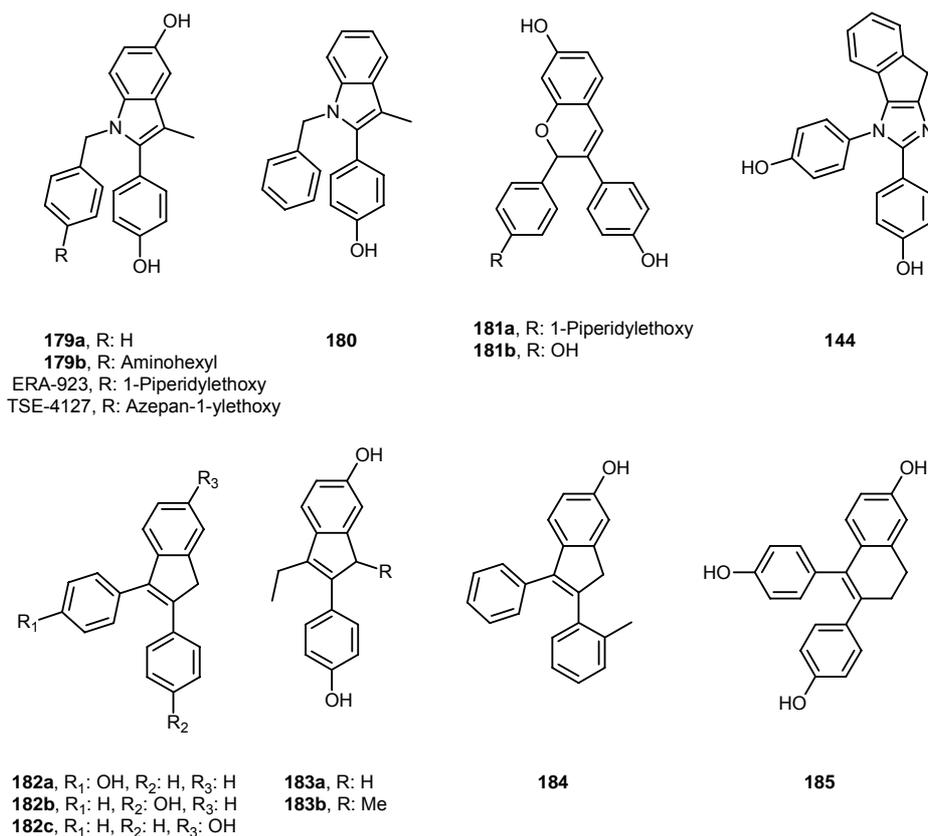
Abbildung 64. 5-Ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol (**123**, blau) in der LBD des mit E2 kokristallisierten ER α [89]. Das Modell zeigt die wichtigen Wechselwirkungen zwischen Glu 353 (türkis) und Arg 394 (grau) zum 4-Hydroxyphenyl in der Position C(4) sowie His 524 (grün) und dem 4-Hydroxyphenyl am N(1).

Obwohl die hier untersuchten Verbindungen von dem molekularen Aufbau und dem damit einhergehenden Wechsel des Bindungsmodus nicht den Typ-II Estrogenen entsprechen,

zeigen sie eine Genaktivierung bei einer kaum nennenswerten Affinität im kompetitiven Bindungsexperiment bei Anwesenheit von E2. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine große Anzahl weiterer Verbindungen mit kaum messbaren Affinitäten, doch eine agonistische Wirkung am Estrogenrezeptor entfalten. Die entscheidende Rolle beim Erreichen einer hohen Bindungsaffinität scheint dabei für das hier beschriebene Strukturprinzip eines alkylierten und arylierten Heteroaromaten der Art und die Lage des Heteroatoms zuzukommen. Werden die analogen Furane, Pyrazole, Imidazole und Pyrrole superpositioniert, so zeigen sie fast identische Winkel, Bindungsabstände und van der Waals-Volumina. Das einzige Unterscheidungsmerkmal stellt dabei die Partialladungsverteilung im Heteroaromaten dar. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass schon bereits mit dem Furan **5** die optimale Partialladungsverteilung für einen derartigen Liganden im ER α erreicht wurde.

12.2.3.2 Antagonistische Interaktion

Die einzige Verbindung, die nicht dem in Kapitel 12.2.3.1 vorgestellten Strukturprinzip aus einem 1*H*-Imidazolring als Kernstruktur folgt, die von einer Reihe von Aryl- und Alkylsubstituenten umgeben ist, ist das 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4*H*-indeno[2,3-*d*]imidazol (**144**). Hierbei handelt es sich um ein anelliertes Ringsystem aus einem Inden und einem Imidazol mit einer ebenen Molekülstruktur. Diese Verbindung konnte in der vorliegenden Arbeit als antiestrogen wirksame Substanz identifiziert werden. In einem Konzentrationsbereich von 10^{-7} - 10^{-5} M konnte im Luciferase-Assay die Wirkung einer 10^{-9} M E2-Lösung um gut 50% gehemmt werden. Mehrere Autoren beschreiben ähnlich aufgebaute Verbindungen, mit denen Untersuchungen zur Bindungsaffinität am ER sowie auf antiestrogene Wirkung durchgeführt wurden (Schema 81). V. Angerer [320] beschreibt eine Serie von 1-(Phenylmethyl)-2-phenyl-3-methylindolen (**179a**, **180**), entwickelt aus 1,3-Dialkyl-2-phenylindolen [340] mit RBA-Werten, bestimmt mit Kalbsuterus-Cytosol von 16% (**179a**) - 0.55% (**180**). Im antiuterotrophen Test an der juvenilen Maus wurde für das Indol **179a** eine Inhibierung von 42% der E2-Wirkung (125 $\mu\text{g}/\text{Tier}$) festgestellt. Durch Einführung einer Aminoethyl-Seitenkette am N(1)-Benzyl (**179b**) konnte die Affinität auf einen RBA-Wert von 25% gesteigert werden, während bei einer Dosis von 25 $\mu\text{g}/\text{Tier}$ eine 100%ige Inhibierung erreicht wurde [341].



Schema 81

Andere Arbeitsgruppen folgten diesem Ansatz und erzielten mit anderen basischen Seiten im Radioliganden-Bindungs-Assay IC₅₀-Werte im nanomolarem Bereich (ERA-923: ER α 14 \pm 10 nM, ER β 40 \pm 24 nM, TSE-4127: ER α 23 \pm 15 nM, ER β 85 \pm 59 nM) bei einer guten antiestrogenen Wirkung [342]. Auch die Struktur des 2,3-diarylierten *2H*-Chromens folgt dem Aufbau des 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-*4H*-indeno[2,3-*d*]imidazols (**144**) aus einem planaren Grundkörper mit zwei arylischen Substituenten. Das hydroxylierte Derivat **181b** zeigte einen moderaten RBA von 2.2 \pm 0.2. In der Testung auf antiestrogene Potenz im Uterusgewichtstest an der Ratte (10 μ g/Tier) konnte keine Inhibierung festgestellt werden. Mit der 1-Piperidylethoxy-Seitenkette (**181a**) konnte dagegen eine 98%ige Hemmung erreicht werden, bei einem RBA von 49 \pm 5% [343]. Darüber hinaus wurden 2,3-Diaryl-*1H*-indene (**182a** - **182c**) in einem kompetitiven Bindungsassay mit Rattenuterus-Cytosol auf ihre Bindungsstärke untersucht. Dabei wurden Werte von 0.017% (**182a**), 0.36% (**182b**) und 8.9% (**182c**) ermittelt. Als die Verbindungen mit den stärksten Affinitäten wurden in dieser Untersuchung die Indene **183a** und **183b** mit einem RBA von 81% beschrieben [326]. Durch eine ortho-Methylierung am C(2)-Aryl (**184**) konnte die Bindungsaffinität des Indens **182c** auf 100% gesteigert werden [327]. Für das den Verbindungen **182a** - **182b** analoge 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,4-dihydro-6-hydroxynaphthalen **185** wurde ein RBA von 140 - 150% gemessen [328, 329]. In der Literatur [344] wurden auch eine Reihe von 5-Hydroxy-2-(4-

hydroxyphenyl)-1*H*-benzimidazolen mit verschiedenen Substituenten in der Position N(1) beschrieben, die sich durch eine ER β -Selektivität auszeichnen.

Für Indene und Indanone wird in der Literatur [326, 327, 328] eine Orientierung der 6-Hydroxylgruppe sowie des Aromaten in Analogie der C(3)-Hydroxylgruppe am Ring **A** des E2 vorgeschlagen (Abb. 64). Diese Annahme beruht dabei nicht nur auf der strukturellen Ähnlichkeit, sondern auch auf Untersuchungen zur Bindungsaffinität, bei denen alle Verbindungen ohne eine E2 analoge C(3)-Hydroxylgruppe erheblich an Affinität einbüßen [326]. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Indole **179a**, **180** und die entsprechenden Derivate gefunden [320]. Für das 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4*H*-indeno[2,3-*d*]imidazol (**144**) wird eine entsprechende Ausrichtung in der Bindungstasche des ER postuliert (Abb. 65). Dabei kann die phenolische Gruppe am Stickstoffatom in Position 1 die in Kapitel 12.2.3.1 beschriebene Kavität des β -ständigen Methylsubstituenten in der Position C(18) des 17 β -Estradiols ausfüllen.

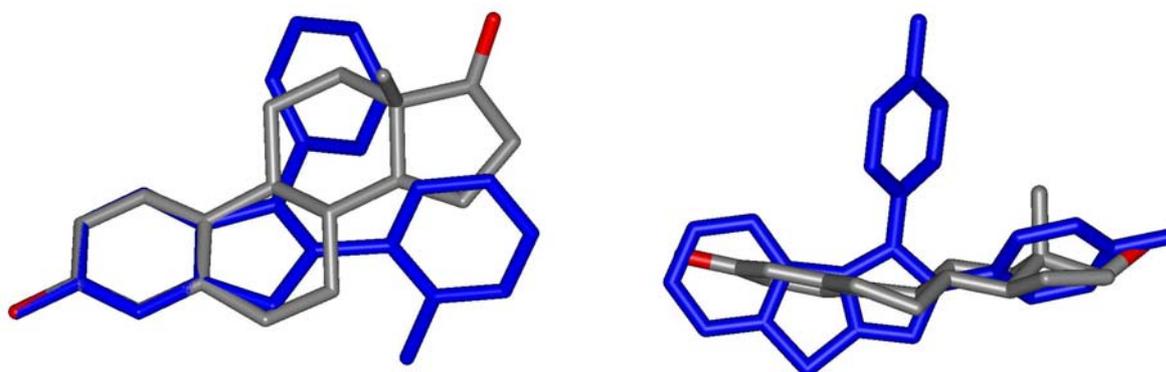
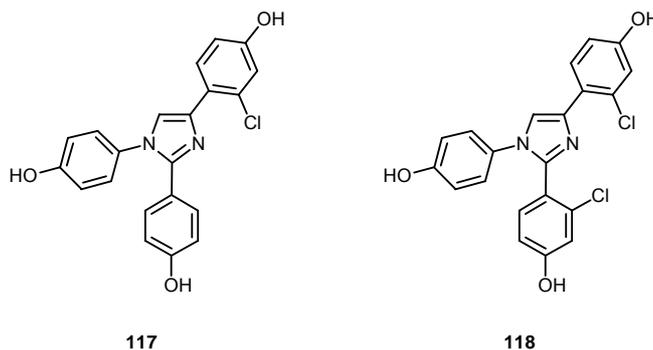


Abbildung 65. Superposition von E2 (grau) mit 3,2-Diaryl-6-hydroxyinden **185**, (links) und 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4*H*-indeno[2,3-*d*]imidazol (**144**).

Das 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4*H*-indeno[2,3-*d*]imidazol (**144**) zeichnet sich darüber hinaus durch eine deutliche Fluoreszenzbande bei 397 nm, bei einer Exitationswellenlänge von 315 nm in PBS bei einem pH-Wert von 7.3 aus. Dabei reichen starke Emissionsbanden bis zu einer Wellenlänge von 450 nm. Damit werden Emissionswellenlängen erreicht, die auch für vergleichbare 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)indole als Liganden für den Estrogenrezeptor erreicht wurden [345]. 1,2-Diaryl-4*H*-indenoimidazole können damit in quantitativen Experimenten zur Aufklärung der Signaltransduktion oder zu Aufnahmestudien in Zellkulturen eingesetzt werden.

12.3 Wachstumsinhibierende Wirkung von chlorierten 1*H*-Imidazolen an Mammakarzinom- und Leukämiezelllinien

Für die chlorierten 1,2,4-Triaryl-1*H*-imidazole **117** und **118** wurde gegenüber den MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen ein antiproliferativer Effekt festgestellt (Schema 82). Aber auch gegenüber den Leukämiezelllinien LAMA84 und SUP-B15 wurde eine cytotoxische Wirkung gemessen.



Schema 82

Da diese Eigenschaft sowohl an hormonabhängigen MCF-7 Zellen als auch hormonunabhängigen MDA-MB 231 Mammakarzinom- sowie den Leukämiezellen LAMA84 und SUP-B15 beobachtet wurde, muss von einem Zelltyp-unabhängigen Wirkmechanismus ausgegangen werden. Für die Substanzen wurde weder eine Affinität zum Estrogenrezeptor α gefunden, noch eine agonistische oder antagonistische Transkriptionsaktivität, vermittelt durch ER α , gemessen. Die mit den Substanzen **117** und **118** inkubierten Zellen wurden auf den Gehalt an ssDNA untersucht. Der Gehalt von ssDNA wird in der Literatur mit dem Auftreten der Apoptose in Zusammenhang gebracht [313, 314]. Für die Zelllinien MDA-MB 231, LAMA84 und SUP-B15 konnte gezeigt werden, dass eine stärkere antiproliferative Wirkung mit einer größeren Menge an gebildetem ssDNA einhergeht. Obwohl für beide Verbindungen im Kristallviolett-Assay und EZ4U Zell Proliferation Assay an MDA-MB 231 Zellen verschiedene Konzentrationen bis zum Erreichen einer cytostatischen bzw. cytociden Wirkung ermittelt wurden, stehen die Ergebnisse gut mit den Besonderheiten der jeweiligen Testdurchführung im Einklang. So wird im Kristallviolett-Assay trotz einer 48-stündigen Präinkubation vor der Substanzzugabe, bei einer Aussatzzellzahl von ≈ 450 pro Well nicht die Zelldichte von 10000 Zellen/Well zum Zeitpunkt der Substanzzugabe im EZ4U Zell Proliferation Assay erreicht. Es ist anzunehmen, dass sich die Zellen im Kristallviolett-Assay zum Zeitpunkt der Substanzzugabe in der log-Phase befinden und eine der Zellcyclusphasen durchlaufen, was einer cytotoxischen Verbindung eine Vielzahl von Angriffspunkten bietet.

Im EZ4U Zell Proliferation Assay werden sich die Zellen dagegen durch die Passagierung erzwungenermaßen in der G₀- oder in der postmitotischen G₁-Phase befinden. Bis die Zellen aus der lag-Phase herausgetreten sind, können die Testsubstanzen z.T. metabolisiert worden sein, zumal im zeitabhängigen Proliferationstest an MDA-MB 231 Zellen für niedrige Konzentrationen bis 5 µM für das *1H*-Imidazol **118** nach 90 h eine Erholung der Zelldichte einsetzt.

Da die *1H*-Imidazole **117** und **118** an verschiedenen Zelllinien einen cytotoxischen Effekt entfalten, der darüber hinaus mit dem Gehalt an ssDNA im Zusammenhang steht, kann von einem gerichteten Eingreifen der Verbindungen in die Zellproliferation ausgegangen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die antiproliferativen Eigenschaften mit einer apoptose-induzierenden Wirkung der *1H*-Imidazole **117** und **118** im Zusammenhang stehen. Abschließend ist anzumerken, dass für die beiden hier besprochenen Verbindungen im Apoptose-Assay mit Annexin/Propidiumiodid im FACS (Ergebnisse nicht gezeigt) nach einer 3-stündigen Inkubation an den Zelllinien LAMA84 und SUP-B15 keine apoptotischen Zellen nachgewiesen werden konnten. Eine Bestimmung der Apoptose an den adhärennten Zelllinien MCF-7 und MDA-MB 231 war nicht möglich.

12.4 Inhibitorische Wirkung von chlorierten 1*H*-Imidazolen auf die Cyclooxygenase-1 und -2

An isolierter Cyclooxygenase-1 und -2 zeigten 4-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol (**117**) und 2,4-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-1-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol (**118**) in einer Konzentration von 10 μM und 200 μM eine inhibitorische Wirkung. Sie reicht von 76% bzw. 99% an Cox-1 und von 51% (**118**) und 31% (**117**) in 10 μM bis zu 96% (**118**) und 84% (**117**) in 200 μM an Cox-2. Für das unchlorierte Derivat **115** wurde eine Abnahme der inhibitorischen Aktivität festgestellt. Für das an C(5)-ethylierte 1*H*-Imidazol **123** wurde ein weiterer Rückgang der Cox-hemmenden Wirkung gemessen. Auch eine Substitution der Arylgruppe in der Position C(4) durch eine Trifluormethylfunktion führt ebenfalls zu einem Verlust der inhibitorischen Eigenschaft an Cox-1 (Abb. 66). Für Cox-2 wurde durch die beschriebenen Derivatisierungen ebenfalls eine Abnahme der Inhibierung gemessen (31% (**117**), 51% (**118**) \rightarrow 15% (**123**) - 22% (**19**)). Interessant dabei ist, dass durch die Einführung eines zweiten Chloratoms am C(2)-Aryl die inhibitorische Wirkung an Cox-2 erhöht werden konnte.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Untersuchungen zur antiproliferativen Wirkung, so zeigt sich, dass die 1*H*-Imidazole, die als einzige eine cytostatische oder cytocide Wirkung aufweisen, auch die Cyclooxygenase-Aktivität hemmen. Da bei diesen Verbindungen auch ssDNA nachgewiesen wurde, kann man die Hypothese aufstellen, dass die cytostatische bzw. cytocide Wirkung dieser Verbindungen über die Cox-inhibitorische Wirkung, Apoptose induzieren können. Es hat dabei den Anschein, als müsste eine bestimmte inhibitorische Aktivität überschritten werden, damit eine cytotoxische Wirkung vermittelt werden kann. In vielen humanen Mammakarzinomen wurde eine Überexpression von Cox-1 nachgewiesen [207], wie auch in den hier eingesetzten MCF-7 Zellen [346]. Aber auch eine verstärkte Expression der induzierbaren Cox-2 wurde in der Literatur [346] beschrieben, z.B. für die MDA-MB 231 Zelllinie. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Patienten in der chronischen Phase der chronischen myelomischen Leukämie einen erhöhten Spiegel an Cox-2 im Knochenmark besitzen, der mit einer verringerten Überlebenszeit der Patienten einhergeht [347]. Für selektive Inhibitoren von Cox-2 wurde eine steigernde Wirkung der cytotoxisch-induzierten Apoptose in Tumormodellen [348, 349, 350, 351] beobachtet. Es wurde auch eine Reduzierung des Tumorwachstums und der Metastasierung durch SC-236 und Indometacin in einem orthotopen Brustkrebstiermodell mit Adenokarzinomzellen festgestellt [352]. Dabei wurde *in vitro* ein Anstieg der apoptotischen Tumorzellen beobachtet. Andere Autoren [353] konnten für SC-236 eine Apoptoseinduzierung über den Proteinkinase C- β_1 -abhängigen Pathway nachweisen. Harris [354, 355] zeigte in

prospektiven Studien generell, dass das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, durch die Einnahmen von NSAID's vermindert wird.

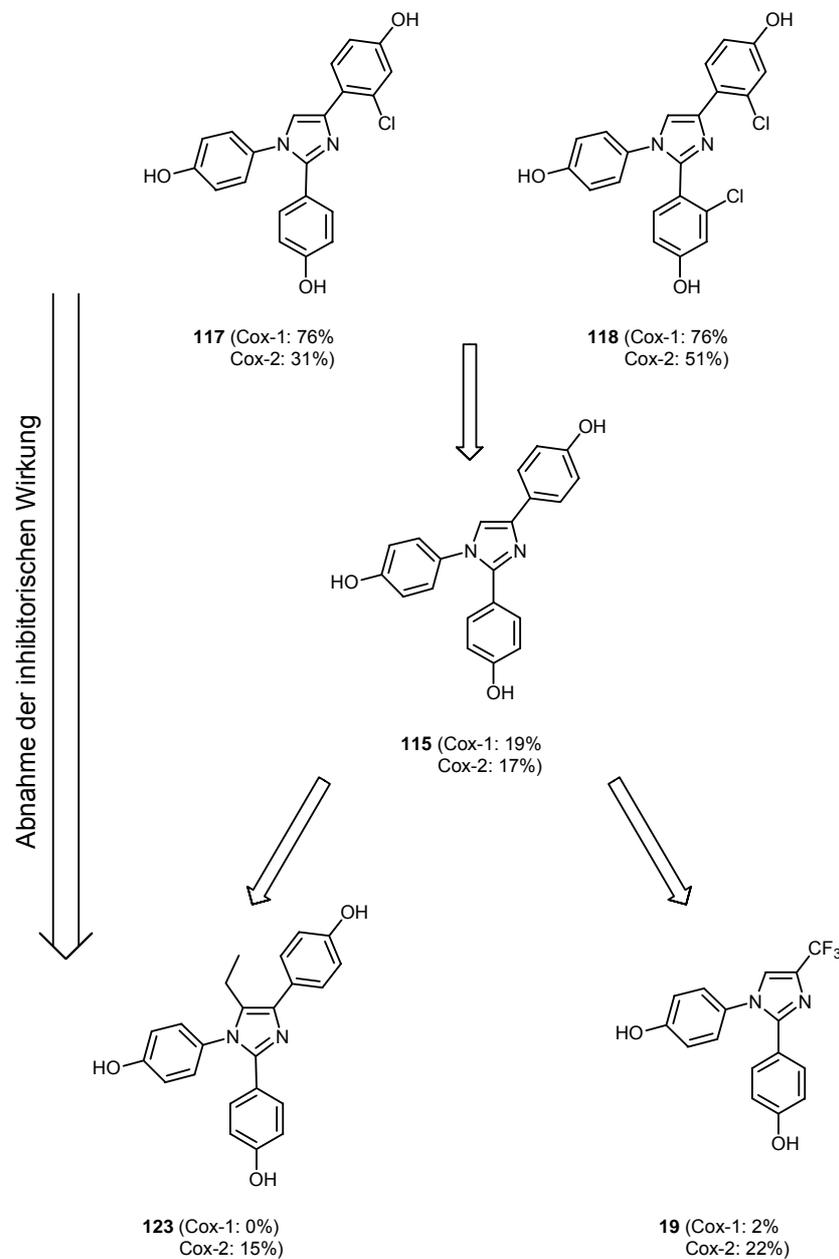


Abbildung 66. Einfluss der Substituenten auf die inhibitorische Wirkung von *1H*-Imidazolen auf die Cyclooxygenase-1 und -2 in einer Konzentration von 10 μ M. Die Entfernung der ortho-ständigen Chloratome am C(2)- und C(4)-Aryl (**117**, **118**) führt zu einem fast völligen Verlust der hemmenden Aktivität an Cox-1 (**115**). Durch die Einführung einer Ethylgruppe an C(5) (**123**) bzw. der Substitution der Arylgruppe an C(4) durch eine Trifluormethylgruppe konnte kein erneuter Anstieg der inhibierenden Aktivität herbeigeführt werden. Die Enzymhemmung bei Cox-2 betrug zwischen 51% (**118**) und 15% (**123**).

Aufgrund dessen, dass bei den untersuchten Verbindungen eine höhere inhibitorische Aktivität an Cox-1 als an Cox-2 festgestellt wurde und dass im Hinblick auf die Expressionsmuster der Cyclooxygenase in den verwendeten Zellen keine einheitliche cytotoxische Wirkung beobachtet wurde, kann aber auch ein anderer Angriffspunkt für die Induzierung der Apoptose nicht ausgeschlossen werden. Dabei muss die Induzierung nicht zwingend an eine Überexpression einer Isoform gekoppelt sein.

Andererseits konnte gezeigt werden, dass es durch unspezifische Inhibitoren wie Indometacin und Sulindac Sulfid, aufgrund der Cox-Hemmung und des dadurch erhöhten Arachidonsäurespiegels zu einer gesteigerten Konversion von Sphingomyelin zu Ceramid in den Colonrectalkarzinom Zelllinien HCT116 und SW480 kommt, wobei Ceramid als Apoptosemediator wirken kann [356]. Für Sulindac Sulfid wurde aber auch eine apoptose-induzierende Wirkung an humanen Colon- und Prostatakarzinomzellen beschrieben, die durch DR5 und Caspase 8 vermittelt wird [357].

Die Cyclooxygenase besitzt auch eine Hydroperoxidase-Aktivität, die durch Häm vermittelt wird. *1H*-Imidazole sind als gute Liganden des Häms bekannt. So koordinieren zwei *1H*-Imidazole im Häm *a* und *b* des Cytochroms *a* und *b* sowie ein *1H*-Imidazol und ein Methioninrest im Häm *c* des Cytochroms *c* [120] das Zentralatom Eisen. Aber auch in der Cyclooxygenase selbst ist das Eisen des Häms durch zwei *1H*-Imidazole in Form von His koordiniert (Abb. 67). Die beiden His vermitteln dabei die heterolytische Spaltung der O-O Bindung der Hydroperoxidgruppe, die als „push-pull“-Mechanismus bezeichnet wird [358 - 360]. Das His 207 (distal) fungiert dabei als Base und abstrahiert das Proton und überträgt es auf den terminalen Sauerstoff [361]. Das His 388 (proximal) besitzt dagegen aufgrund seiner Wasserstoffbrückenbindung zum Tyr 504 über ein inkorporiertes Wassermolekül eine weniger ausgeprägte Nucleophilie.

In der Literatur sind Verbindungen mit *1H*-Imidazolen als Strukturelement als Liganden und damit als Inhibitoren des Cytochroms P450 und der daran assoziierten Reaktionen beschrieben. So z.B. von Cytochrom P450 17 und 19, auch als Aromatase bekannt. Verbindung **186** stellt solch eine Substanz dar. Das Xanthangerüst soll dabei als H-Brückenakzeptor in einer Proteintasche in der Nähe des Häms fungieren. Der *1H*-Imidazolring koordiniert das Eisen im Porphyrinliganden [362]. Ein bekannter Aromatasehemmer ist das Letrozol. Hier übernimmt das Triazol die Funktion des Liganden. Eine Reihe von *1H*-Imidazolderivaten werden als antimykotische Wirkstoffe eingesetzt. Sie hemmen die Ergosterol-Biosynthese durch Blockade der Lanosterol-14 α -Demethylase. Auch sie binden an Cytochrom P450. Clotrimazol, Tioconazol, Miconazol und Econazol sind Vertreter dieser

Verbindungsclassen (Schema 83). Neben einem *1H*-Imidazolring tragen sie, genau wie die Verbindungen **117** und **118**, ein oder mehrere Chloratome an einem bzw. zwei Arylringen.

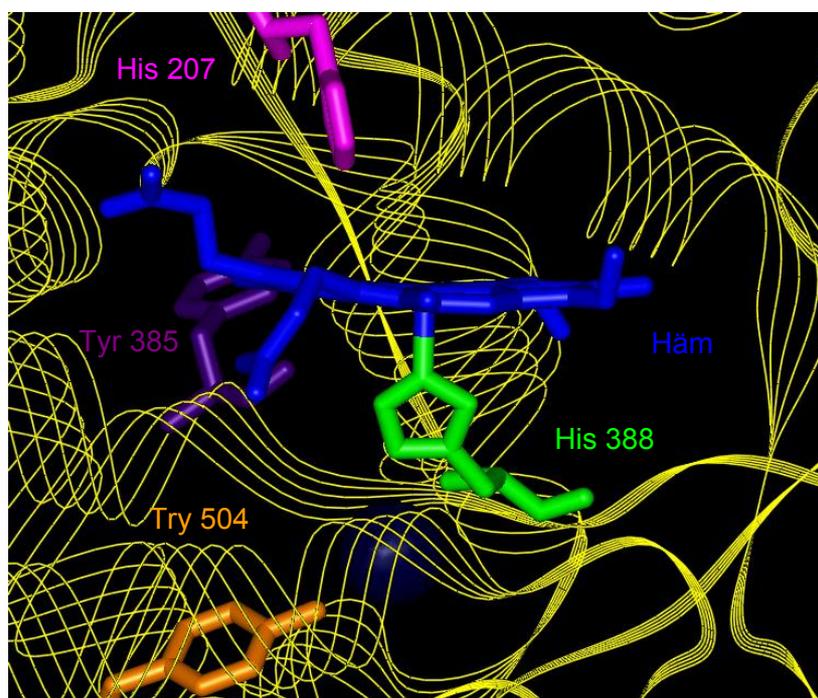
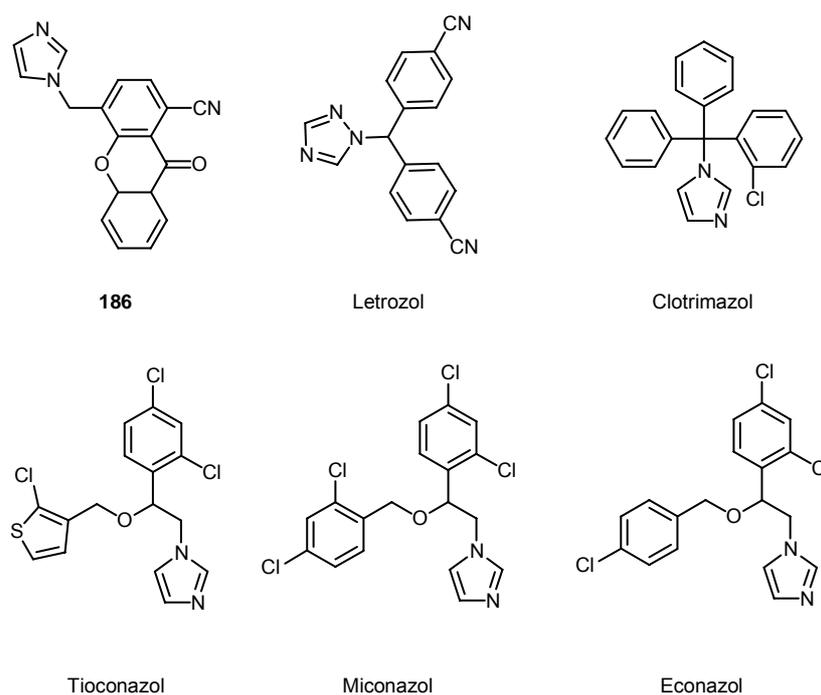


Abbildung 67. Häm in der ovinen Cox-1 vom PDB File 1prh [150]. Das Eisen im Porphyrin (blau) ist von zwei His umgeben (His 388 (grün) und 207 (violett)). Dabei koordiniert His 388 das Eisen direkt. Des Weiteren ist das His 388 über ein Wassermolekül (dunkelblau, nachträglich eingefügt) mit dem Tyr 504 (orange) durch eine Wasserstoffbrücke verbunden [361]. Im Hintergrund ist das Tyr 385 (lila) hervorgehoben.

In einer Reihe von Untersuchungen wurde die Bindung von methylierten *1H*-Imidazolen am Häm im Myoglobin [363, 364] oder der Cytochrom *c* Peroxidase [365] NMR-spektroskopisch untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch exogene *1H*-Imidazol-Liganden die Reste des Proteinbackbones und der Seitenketten in der distal-axialen Ligandenregion des Cytochrom *c* charakteristisch verschoben werden [366]. Es zeigte sich aber auch, dass 2-Methyl-*1H*-imidazol in einer ausreichenden Konzentration die Funktion des distalen His 207 in der Ala-Mutante (His 207 Ala) der Cox-1 übernehmen kann [367].

Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch die hier beschriebenen *1H*-Imidazole **117** und **118** in der Lage sind, das Zentralatom des Häms zu koordinieren und so einen Elektronentransfer zu unterdrücken. Dies könnte erklären, warum eine Hemmung der Cyclooxygenase und eine antiproliferative Wirkung an unterschiedlichen Zelllinien

beobachtet werden konnte. Beide Ereignisse müssen nicht ursächlich miteinander verknüpft sein. Zumal die eingesetzten Zelllinien ein unterschiedliches Cox-Expressionsmuster aufweisen. Die MCF-7 Zelllinie zeigt eine Cox-1 Überexpression, die MDA-MB 231 Zellen eine Überexpression von Cox-2 [346]. Die Verbindung **118** zeigt einen stärkeren cytotoxischen Effekt auf die MCF-7 Zellen als **117** und dies, obwohl beide Verbindungen an Cox-1 eine identische Inhibierung von 76% (10 μ M) zeigen. Dagegen zeigt **117** eine ausgeprägtere Wirkung auf die MDA-MB 231 Zellen als **118**, was jedoch mit den Befunden der Cox-Hemmung im Einklang stehen würde.



Schema 83

Es ist nicht ausgeschlossen, dass eine neue Klasse von Verbindungen gefunden wurde, die in der Lage sind, das Eisen des Häms zu koordinieren und die damit assoziierten Reaktionen zu inhibieren. Damit lässt sich auch die spät einsetzende Apoptose in Einklang bringen.