

13 Zusammenfassung

Ausgehend vom *meso*-4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**15a**), für dessen ortho-halogenierte Derivate **15b**, **15c**, **156** und **157** eine agonistische Wirkung am Estrogenrezeptor beschrieben ist, wurden *meso*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline **47a** - **47d** dargestellt und ihre genaktivierende Wirkung untersucht. Dabei konnte für keine der Verbindungen eine agonistische oder antagonistische Wirkung festgestellt werden. Die Verbindungen wurden auf ihre antiproliferative Wirkung an der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl *meso*-2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (**47a**) als auch die halogenierten Derivate **47b** - **47d** nur marginale Effekte auf das Zellwachstum in Konzentrationen von 1 μM , 5 μM und 10 μM in einem Zeitraum bis 260 h ausüben.

Für eine Reihe von alkylierten Triarylheteroaromaten wurden in der Vergangenheit hohe Bindungsaffinitäten mit z.T. ausgeprägter Subtypspezifität zu einer Isoform des Estrogenrezeptors nachgewiesen. Ausgehend vom 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol (**155**) wurde der Einfluss von Alkyl- und Arylgruppen in den Positionen C(4) und C(5) sowie der para-Hydroxylierung und ortho-Halogenierung in den Arylen untersucht. Dabei wurden die stärksten agonistischen Genaktivierungen für das 1,2,4-Tris(4-hydroxyphenyl)-5-methyl-1*H*-imidazol (**119**), das 5-Ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazol (**123**) und das 1,2,4-Tris(4-hydroxyphenyl)-5-phenyl-1*H*-imidazol (**127**) nachgewiesen. Die Stärke der Aktivierung nahm vom Phenyl- über den Methyl- zum Ethylsubstituenten in der Position C(5) zu. Es zeigte sich, dass die in den Arylen an C(2) und C(4) ortho-halogenierten Derivate eine deutlich geringere Genaktivierung auslösten. Die Einführung einer para-ständigen Hydroxylgruppe am C(5)-Phenyl der Verbindung **127** hatte den Verlust der agonistischen Wirkung zur Folge. Für die am stärksten wirksame Verbindung **123** konnte gezeigt werden, dass sich die genaktivierende Wirkung mit dem Verlust einer der drei Hydroxylgruppen erniedrigt. Dabei wurde der stärkste Wirkungsverlust bei einer Dehydroxylierung am C(4)-Aryl, der schwächste am C(2)-Aryl beobachtet.

Für das 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4*H*-indeno[2,3-*d*]imidazol (**144**) konnte eine antagonistische Wirkung nachgewiesen werden. Die Genaktivierung bei einer 17 β -Estradiol-Konzentration von 10^{-9} M wurde durch Substanzkonzentrationen von 10^{-7} - 10^{-5} M um rund 50% reduziert. Für alle untersuchten 1*H*-Imidazole wurde eine minimale Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor beim Test mit Kalbsuterus-Cytosol als Estrogenrezeptorquelle gemessen.

Alle *1H*-Imidazole wurden einem Cytotoxizitätstest an MCF-7 Zellen unterworfen. Dabei zeigten 4-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-*1H*-imidazol (**117**) und 2,4-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-1-(4-hydroxyphenyl)-*1H*-imidazol (**118**) in Konzentrationen von 5 μM und 10 μM ab einer Inkubationszeit von drei Tagen einen antiproliferativen Effekt. Beide Verbindungen hemmten das Wachstum der hormonunabhängigen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB 231 und der Leukämiezelllinien LAMA84 und SUP-B15. In den Kulturen von MDA-MB 231, LAMA84 und SUP-B15 Zellen, die mit diesen Verbindungen behandelt worden waren, wurde nach 5-tägiger Inkubation ssDNA nachgewiesen. Ein Apoptose-Test mit Annexin/Propidiumiodid im FACS nach 3-stündiger Inkubation verlief negativ.

Für beide Verbindungen wurde die inhibitorische Wirkung an der Cyclooxygenase-1 und -2 bestimmt. In Konzentrationen von 1 μM , 10 μM und 200 μM wurde eine Hemmung der Aktivität der Cyclooxygenase-1 von 0%, 76% bzw. 99% festgestellt. An der Cyclooxygenase-2 wurde eine Hemmung der Enzymaktivität von 6%, 51% und 96% für die Verbindung **118** und von 8%, 31% und 84% für die Verbindung **117** in den gleichen Konzentrationen bestimmt. Das unchlorierte Derivat **115** zeigte dagegen in 10 μM nur eine Hemmung von 19% an der Cyclooxygenase-1 und von 17% an der Cyclooxygenase-2.

Summary

Ortho-halogenated derivatives (**15b**, **15c**, **156**, **157**) of *meso*-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazoline (**15a**) are well known ligands for the estrogen receptor. One intention of this thesis was to investigate the influence of C(2)-substituents on the ER-activation. Therefore the gene activation were determined on the mammary carcinoma MCF-7 2a cells of *meso*-2,4,5-triaryl-2-imidazolines **47a** - **47d**. The 2-imidazolines **47a** - **47d** showed neither estrogenic or anti-estrogenic nor cytotoxic activity against ER-positiv MCF-7 cells.

An other aim of this thesis was the study of the influence of alkyl and aryl substituents in 1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazole (**155**) at C(4) and C(5) on the gene activation, according to recent publications which described triaryl hetero-aromatics as potent ligands for the estrogen receptor with partly a high selectivity for one subtype. Effects of para-hydroxylation and ortho-halogenation in the aryls were identified. The strongest gene activation was observed for the 1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-5-methyl-1*H*-imidazole (**119**), the 5-ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazole (**123**) and the 1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-5-phenyl-1*H*-imidazole (**127**). The estrogenic activity increased from the phenyl over the methyl up to the ethyl substituent at C(4). The activity at the estrogen receptor was decreased by compounds bearing chlorine substituents in the aromatic rings at C(2) and C(4). It could be demonstrated, that the C(5)-phenol derivative of imidazole **127** had no agonistic activity. Contrary to this observation the partial de-hydroxylation of **123** reduced the agonistic potency. The analogous imidazole with a phenyl ring at N(1) was less active then the compound with a phenyl substituent at C(2). No activity was achieved by de-hydroxylation at C(4)-aryl.

In this SAR study 1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-4*H*-indeno[2,3-*d*]imidazole (**144**) was identified as an anti-estrogenic imidazole derivative. It reduced the gene activation of 17 β -estradiol in 10⁻⁹ M of about 50% in concentrations from 10⁻⁷ to 10⁻⁵ M. For all 1*H*-imidazoles a minimal receptor binding affinity was observed by using calf uterus-cytosol as estrogen receptor source.

The cytotoxic activities of imidazoles were evaluated on ER-positiv MCF-7 cells. Only the treatment with the 4-(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazole (**117**) or the 2,4-bis(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-1-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-imidazole (**118**) in concentrations of 5 μ M and 10 μ M resulted in growth inhibition after three days of application. Compounds **117** and **118** inhibited the growth of ER-negative MDA-MB 231 and leukemia LAMA84 und SUP-B15 cells as well. Increase of single-stranded DNA in the cells

as an indicator of apoptosis was detected after an incubation time of 5 days. As expected no apoptotic cells were shown after three hours treatment in an assay with annexine/propidiumiodide.

Both **117** and **118** shown inhibitory activity on cyclooxygenase-1 und -2 enzymes. In concentrations of 1 μM , 10 μM and 200 μM a Cox-1-inhibition of 0%, 76% and 99% was determined, respectively. Cyclooxygenase-2 was inhibited of about 6%, 51% and 96% by imidazole **118** and of 8%, 31% and 84% by **117** in the same concentrations. The non-chlorinated analog **115** mediated at 10 μM only a minimal inhibition of cyclooxygenase-1 (19%) and cyclooxygenase-2 (17%). A distinct structure-activity relationship was made evident by this experiments.

This thesis describes facile and practical syntheses of a series of imidazoles. A number of targeted compounds shown estrogenic and anti-estrogenic activity. Chlorinated non-estrogenic imidazoles of this series were also potent growth inhibitors of various cancer cell lines. In addition these imidazoles inhibited both isoforms of cyclooxygenase.