

Synthese und Testung von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro- 1H-Imidazolen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien
Universität Berlin

vorgelegt von
Friederike Schwegler
aus Berlin

Berlin 2009

1. Gutachter: Professor Dr. R. Gust

2. Gutachter: Professor Dr. P. Surmann

Datum der mündlichen Prüfung: 01.02.2010

Danksagungen

Die vorliegende Doktorarbeit entstand in der Zeit von Dezember 2003 bis Oktober 2008 am Institut für Pharmazie an der Freien Universität Berlin. Die Dissertation wurde unter Anleitung von Professor Dr. R. Gust angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Professor Gust für die Überlassung des vielfältigen Themas, dem entgegengebrachten Vertrauen, der vielfältigen Unterstützung und der großen Freiheit bei der Bearbeitung.

Frau Jessica Piniek und Frau Marleen Selent für ihre synthetische Unterstützung und sorgfältige Mitarbeit.

Frau Silke Bergemann für die Unterstützung bei den pharmakologischen Testungen.

Den Mitarbeitern der analytischen Abteilung für die Aufnahme der Spektren

Den Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für zahlreiche fachliche und nichtfachliche Gespräche und Hilfestellungen, insbesondere Frau L. Avagyan, Herrn K. Bochert, Herrn M. Goebel, Frau. Dr. M. Schlenk, Frau A. Schäfer, Frau K. Szymanowitz und Frau A. Wellner .

Herrn A. Güleryüz, Frau F. Feldmann, Frau U. Forstreuter, Frau Dr. C. Keller und Frau D. Seefeld für Unterstützung und stete Freundschaft.

und Herrn R. Wolfsteller für Freundschaft, Liebe und den freien Rücken.

Abkürzungsverzeichnis

AF	Aktivierungsfunktion
COX	Cyclooxygenase
CDDP	cis-Platin
ct-FCS	charcoal-treated FCS
DES	Diethylstilbestrol
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2	Estradiol
ER	Estrogenrezeptor
ERE	estrogen response element
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
HSP	Hitzeschock-Protein (heat shock protein)
LBD	Ligandenbindende Domäne (ligand binding domain)
OHT	4-Hydroxytamoxifen
PBS	Phosphate Buffered Saline
QSAR	quantitative structure activity relationship
SERM	selective Estrogen Receptor Modulator
SHR	steroid Hormone Receptor
SM	second messenger
TAM	Tamoxifen

Glossar

Begriff

HT29	Kolonkarzinomzelllinie
IC ₅₀	Konzentration, die 50 % aller Zellen inhibieren kann
MCF7	Estrogenabhängige Mammakarzinomzelllinie der Michigan Cancer Foundation
MCF7-2a	Estrogenabhängige Mammakarzinomzelllinie, stabil transfiziert mit ER _{wtc-luc}
MDA	Estrogenunabhängige Mammakarzinomzelllinie
Onkogene	Wachstums fördernde Gen-Sequenzen
Tumorsupressorgene	Wachstums hemmende Gensequenzen
Zellzyklus	Zyklischer Ablauf von Ereignissen in einer eukaryotischen Zelle von einer Zellteilung zur nächsten Zellteilung
Neoplasien	Neubildungen von Geweben

Für meine
Familie

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Glossar.....	V
Kapitel 1: Einleitung.....	1
Kapitel 1.1 Krebs und Brustkrebs.....	1
Kapitel 1.2 Die Estrogenrezeptoren	2
Kapitel 1.3 Die Liganden des Estrogenrezeptors.....	5
Kapitel 2: Selektive Estrogenrezeptormodulatoren und Problemstellung.....	7
Kapitel 2.1 Die Rolle von Selektiven Estrogenrezeptormodulatoren in der Therapie des Mammakarzinoms	7
Kapitel 2.2 Die Entwicklung von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen aus bekannten SERMs	10
Kapitel 2.3 Problemstellung.....	13
Kapitel 3.1 Synthesen von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen.....	14
Kapitel 3: Synthese und Substanzübersicht	
Kapitel 3.1: Synthesen.....	14
Kapitel 3.1.1 Synthese von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen über 2,4-Diazapentadiene:.....	14
Kapitel 3.1.2 (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole über 1,2-Diarylethandiamine:.....	18
Kapitel 3.1.3 Weiterführende Synthesen.....	22
Kapitel 3.1.3.1 N – Alkylierungen von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen.....	23
Kapitel 3.1.3.2 Etherspaltung von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(methoxyphenyl)-4,5-dihydroimidazolen.....	24
Kapitel 3.1.3.3 Einführung basischer Seitenketten in phenolische 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole.....	25
Kapitel 3.2 Substanzübersicht.....	27
Monosubstituierte Verbindungen:.....	27
Mehrfachsubstituierte Verbindungen:.....	28
N-Alkylierte Verbindungen:.....	29
Verbindungen mit basischen Seitenketten	30
Kapitel 4: Untersuchungen zu Identität und Stabilität.....	31
Kapitel 4.1 Untersuchungen zur Identität.....	31
4.1.1 1H-NMR-Spektroskopie.....	31
4.1.2 Massenspektroskopie.....	40
Kapitel 4.2 Untersuchungen zur Stabilität	42
Kapitel 5: Pharmakologische Testung und Ergebnisse.....	44
5.1 Allgemeines - Testungen von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen.....	44
5.1.1 Agonismus und Antagonismus am Estrogenrezeptor	44
5.1.1.1 Agonismus.....	44
5.1.1.2 Antagonismus.....	44
5.1.2 Zytotoxizität.....	45
5.1.2.1 Zweipunktbestimmung.....	45
5.1.2.2 Zeitabhängige Bestimmung der Zytotoxizität.....	46
5.1.2.3 Bestimmung der IC50-Werte.....	46
5.1.2.4 Veränderungen der Zellmorphologie.....	46
5.1.3 Verwendete Zelllinien.....	47
5.1.3.1 hormonabhängige Mammakarzinomzellen (MCF7).....	47
5.1.3.2 hormonunabhängige Mammakarzinomzellen (MDA-MB 231).....	47
5.1.3.3 Kolonkarzinomzellen (HT29).....	47
5.1.3.4 Reporterplasmid-transfizierte MCF7 Zellen (MCF7-2a).....	47
5.2 Diskussion der Testergebnisse:.....	48

5.2.1 Agonismus und Antagonismus am Estrogenrezeptor	48
5.2.1.1 Allgemeines.....	48
5.2.1.2: Einfluss der Substituenten in den Aromaten.....	50
5.2.1.3: Einfluss der N-Alkylierung.....	51
5.2.1.4: Einfluss von basischen Seitenketten auf phenolische (4R/5S),(4S/5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole.....	53
5.2.2 Proliferationshemmende Eigenschaften von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen.....	56
Bedeutung des Substitutionsmusters am Aromaten	58
Einfluss der Substituenten in den Aromaten.....	60
Einfluss der N-Alkylierung.....	66
Einfluss von O-gebundenen basischen Seitenketten.....	69
5.3 Mögliche Wirkmechanismen für (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole.....	70
5.3.1 Die Zellmembran.....	72
5.3.2 Die Cyclooxygenasen (COX1/COX2).....	75
5.3.3 Das humane oder murine double minute protein (HDM2/MDM2).....	78
5.3.4 Der Purinorezeptor P2X7.....	81
5.4 Zusammenfassung.....	82
Kapitel 6: Methoden	84
Kapitel 6.1: Materialien.....	84
Kapitel 6.2: Chemische Methoden.....	86
Synthesen für 2,4-Diazapentadiene.....	86
Kapitel 6.3 Pharmakologische Methoden.....	89
Kapitel 7: Substanzdaten	94
Kapitel 7.1: Vorstufen der 2,4,5-Triaryl-4,5-Dihydro-1H-imidazole.....	94
Kapitel 7.2: 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole.....	99
Literaturverzeichnis.....	113
Persönliches.....	116
Lebenslauf.....	116
Wissenschaftliche Beiträge.....	117
Anhang I: Estrogenität von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen.....	120
Anhang II: Zytotoxische Eigenschaften von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen.....	122

Kapitel 1 Einleitung

Kapitel 1.1 Krebs und Brustkrebs

Mann und Frau gehn durch die Krebsbaracke

[...]

Komm, sieh auf diese Narbe an der Brust.

Fühlst du den Rosenkranz von weichen Knoten?

Fühl ruhig hin. Das Fleisch ist weich und schmerzt nicht.

[..]

Gottfried Benn [1]

Gottfried Benn, zugleich Dichter und Arzt, wusste, wovon er schrieb. Nachdem seine Mutter an Brustkrebs gestorben war, trat er 1912 eine Stelle als Assistenzarzt in Berlin an. Hier arbeitete er in der Pathologie und konnte die Auswirkungen von Tumorerkrankungen auf Menschen unmittelbar mit verfolgen. Diese Erfahrungen schlugen sich in seinem Gedichtband „Morgue“ nieder.

Der Begriff „Tumor“ war zuerst wertfrei und bezeichnet auch heute noch eine örtlich begrenzte Zunahme des Gewebevolumens [2]. Das kann zum Beispiel durch die Einlagerung von Flüssigkeit passieren oder durch eine lokale Fehlsteuerung des Wachstums körpereigener Zellen. Letzteres wird als Neoplasie bezeichnet. Diese Fehlbildungen können sowohl benigne als auch maligne sein. Maligne Tumore oder Neoplasien unterscheiden sich von benignen Tumoren durch drei Merkmale: Invasivität, Metastasierung und Destruktion des umliegenden Gewebes.

Heutzutage nimmt man an, dass Tumorwachstum - im Sinne von Neoplasie - ein multifaktorielles Geschehen unter Mitwirkung verschiedener Gene ist [3]. Die dafür verantwortlichen Onkogene, Tumorsuppressorgene und Reperaturgene kommen in allen Zellen vor. In Wechselwirkung miteinander regulieren sie natürlicherweise den Lebenszyklus der Zellen. In entarteten Zellen ist dieses fein abgestimmte Gleichgewicht aus Wachstum, Wachstumshemmung und Reparatur geschädigter DNA-Abschnitte nicht mehr gegeben.

Mittlerweile sind Tumorerkrankungen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern. Man geht davon aus, dass in Deutschland jährlich bis zu 500 000 Menschen an Krebs, also an einem Tumor, erkranken [3]

Mitteilungen des Robert-Koch-Institutes zufolge [3] ist Brustkrebs die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen. Fast ein Drittel aller Krebserkrankungen bei Frauen lassen sich auf diese Unterart zurückführen. Deshalb ist es von immenser Bedeutung, selektive und wirksame dagegen Arzneistoffe zu entwickeln. Dabei sind die Besonderheiten dieser Krebsart zu beachten.

Brustkrebs lässt sich in zwei Hauptgruppen einteilen: Hormonunabhängiger und hormonabhängiger Brustkrebs. Letzterer macht etwa zwei Drittel dieser Neoplasien aus. Hierbei wird das Wachstum der Tumorzellen von Estrogenen gefördert. Man geht sogar davon aus, dass Hormone wie Estradiol über seine Wechselwirkung mit kernständigen Rezeptoren durch erhöhte Replikationsraten die Wahrscheinlichkeit genomischer Mutationen und damit das Krebsrisiko erhöhen. Neuere Untersuchungen gehen auch von nichtgenomischen Wirkungen des Estradiols aus [4]. Hier diskutiert man die Toxizität von Estrogen-Oxidationsprodukten und von Wirkungen, die über membranständige Estrogenrezeptoren vermittelt werden. Aus diesem Grund ist das Verständnis der Estrogenrezeptoren von Bedeutung.

Kapitel 1.2 Die Estrogenrezeptoren

Diese Familie nukleärer Rezeptorproteine (der Klasse NR3I, d.h. Subfamilie 3, Gruppe I) besteht aus einer Mischung von konservierten und flexiblen Domänen. Letztere erlauben eine Einteilung der Rezeptoren in die Estrogenrezeptor-Subtypen ER α und ER β [5]. Diese Rezeptorsubtypen sind nicht nur in unterschiedlichen Geweben für verschiedene Aufgaben verantwortlich, sondern werden auch durch andere Gene auf getrennten Chromosomen exprimiert. Beide ER – Subtypen besitzen folgende Domänen:

- eine ligandenbindende Domäne (LBD), verantwortlich für die Bindung des physiologischen Liganden Estradiol (E2)
- eine DNA-bindende Domäne (DBD), die über Zinkfinger mit den dafür vorgesehenen DNA-Abschnitten, den sogenannten Estrogen Response Elements (ERE) reagiert.
- eine Aktivierungsfunktion (AF1), lokalisiert am N-Terminus des Proteins
- eine andere Aktivierungsfunktion (AF2), lokalisiert am C-Terminus,

Dabei sind beide AF für die Rekrutierung von sogenannten Koregulatoren verantwortlich. Diese Koregulatoren können den Estrogenrezeptor in seiner Wirkung entweder unterstützen oder behindern, so

dass man eine Unterteilung nach Koaktivatoren und Korepressoren treffen kann. Durch gezieltes Ansprechen der Koaktivatoren und/oder Korepressoren kann eine selektive Wirkung erzielt werden.

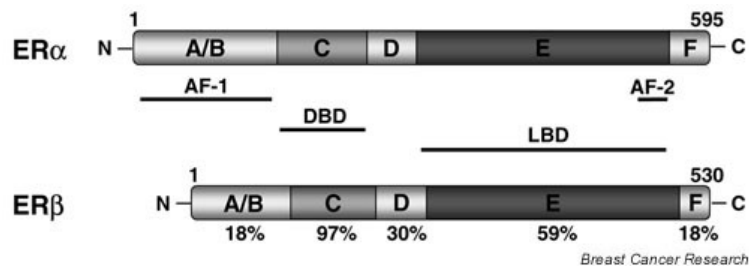


Abbildung 1.1: Aufbau von ERα und ERβ [5]

Abbildung 1.1 vergleicht die ERα und ERβ. Die größte Homologie weisen die beiden Rezeptoren innerhalb der DNA-bindenden Domäne (DBD) auf, die ligandenbindende Domäne zeigt nur eine Homologie von 59 %.

Auch wenn seit einiger Zeit die Existenz eines membranständigen Estrogenrezeptors diskutiert wird, kommt der Hauptteil der Estrogenrezeptoren zytosolisch vor [6]. Dabei liegt der Rezeptor an ein schützendes Hitzeschockprotein (HSP90) gebunden vor. Für die Signaltransduktion muss das HSP 90 abdiffundieren. Danach kann die Wirkung ligandenabhängig oder ligandenunabhängig vermittelt werden (Abbildung 1.2).

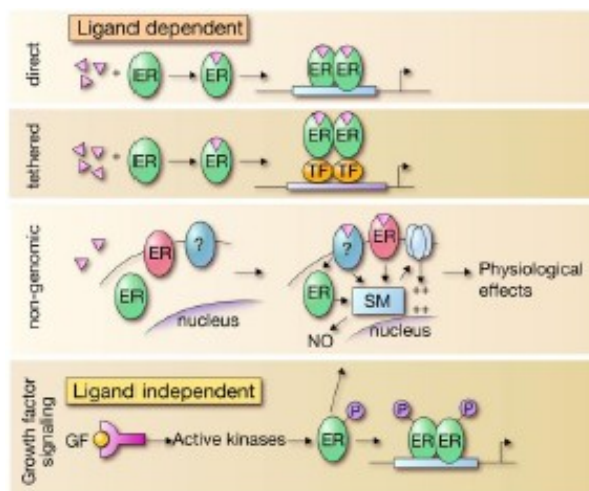


Abbildung 1.2: Möglichkeiten zur Signaltransduktion über den Estrogenrezeptor [7]

Der natürliche Ligand mit der höchsten Rezeptoraffinität ist Estradiol (E2). Da die Bindungstasche des ER relativ großvolumig und damit auch anderen Liganden zugänglich ist, ist hier ein guter Ansatz für die Rezeptormodulation gegeben. Nach Bindung eines Liganden an den Estrogenrezeptor verändert sich dessen Konformation und das HSP90 diffundiert ab. Dadurch wird die Dimerisierungsstelle (eine weitere Bindungsstelle) frei, die mit einem anderen Rezeptor-Ligand-Komplex interagiert. Es ergibt sich also ein Dimer, das sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer (Dimer aus verschiedenen Rezeptorsubtypen) bestehen kann. Dieses Dimer kann seine Effekte auf verschiedenen Wegen vermitteln [7].

Das jeweilige Dimer wandert in den Kern und bindet dort mit bestimmten Abschnitten der DNA, den EREs. Diese Art der Estrogenwirkung bezeichnet man als „klassisch“ (Abbildung 1.2).

Andererseits kann dieses Rezeptordimer auch an andere Transkriptionsfaktoren binden und damit Teile der DNA erreichen, die nicht als ERE fungieren (Abbildung 1.2).

Zusätzlich ist der Estrogenrezeptor-Ligand-Komplex in der Lage, second messenger (SM) zu aktivieren und damit nicht-genomische Effekte auszulösen (Abbildung 1.2).

Außerdem können Wachstumsfaktoren den ER über aktivierte Kinasen phosphorylieren. Ein natürlicher Ligand ist hierbei nicht beteiligt, aber auch hier erfolgt dann Dimerisierung, Translokation und Transkription (Abbildung 1.2).

Diese vier Arten der Signaltransduktion [7] ermöglichen eine große Bandbreite an Signalen und somit erklärt sich die Vielfalt genomischer und nicht-genomischer Wirkungen von estrogen wirksamen Substanzen.

Kapitel 1.3 Die Liganden des Estrogenrezeptors

Die LBD des ER wird zwar als flexibel und relativ groß beschrieben [8], dennoch sind einige strukturelle Voraussetzungen für die Bindung eines Liganden zu beachten. Diese ergeben sich aus dem Aufbau der LBD. Die LBD wird aus 12 helikalen Einheiten aufgebaut.

Dabei formen die Helices H3, H6, H8, H11 und H12 sowie die Schleifenregion zwischen den Helices H7 und H8 die ligandenbindende Domäne [8,9] Daraus resultiert eine charakteristische räumliche Struktur, die die Ligandenerkennung über eine spezifische Kombination von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen reguliert. Für die erforderlichen Wasserstoffbrückenbindungen sind sowohl die Aminosäuren Glutaminsäure (Glu353), Asparaginsäure (Arg394) und ein strukturell konserviertes Wasser als auch ein einzelner Histidinrest (His534) verantwortlich. Dazwischen wird die LBD von hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet. Die LBD wird dabei von 12 Aminosäureketten gebildet, die durch β -Faltblattstrukturen voneinander getrennt sind. Diese Aminosäureseitenketten und deren Position entscheiden über die Rekrutierung von Koaktivatoren und Korepressoren [10] und somit über die Wirkungen des Rezeptordimers. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Helix 12 (in der Abbildung 1.3 purpur eingefärbt). Die veränderte Position der Helix 12 kontrolliert die Funktion der AF1.

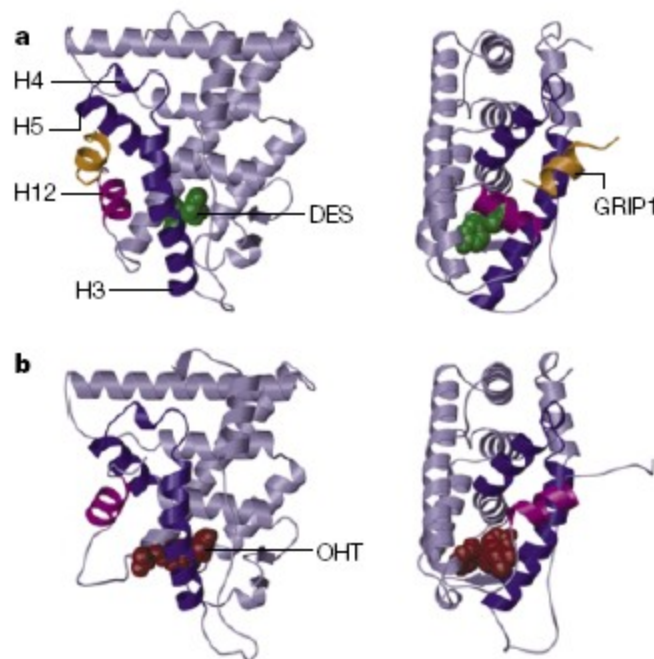


Abbildung 1.3: Die LBD des Estrogenrezeptors alpha [11]

a: Position der Helix 12 nach Bindung eines Agonisten (DES)

b: Position der Helix 12 nach Bindung eines partiellen Antagonisten (OHT)

Die veränderte Lage der Helix 12 (purpur) ist deutlich zu erkennen

Die Helix 12 verschiebt sich unter Einwirkung eines SERMs und öffnet eine weitere Bindungstasche mit der Möglichkeit zur Bindung an die Aminosäure Asparaginsäure (Asp351) [15]. So erzielt z.B. der SERM Raloxifen seine Wirksamkeit. Aufgrund der Verschiebung von H12 durch eine basische Seitenkette wird die Rekrutierung von Kofaktoren und/oder Korepressoren durch eine Konformationsänderung der AF1 verändert.

Daraus resultieren eine variable Transkription und die spezifische Wirkung dieses Arzneistoffs. Für eine selektiv den Estrogenrezeptor modulierende Wirkung ist deshalb eine basische Seitenkette erforderlich. Diese Erkenntnisse bildeten die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole mit zwei phenolischen Gruppen und einer basischen Seitenkette.

Kapitel 2 Selektive Estrogenrezeptormodulatoren in der Therapie des Mammakarzinoms und Problemstellung

Kapitel 2.1 Die Rolle von Selektiven Estrogenrezeptormodulatoren in der Therapie des Mammakarzinoms

Die generelle Therapie von Tumoren beruht auf drei Prinzipien: Bestrahlung, Operation und Behandlung mit Chemotherapeutika [16]. Primäres Ziel ist die vollständige Entfernung des entarteten Gewebes. Mit Hilfe von Biopsiematerial wird beim Mammakarzinom zuerst der Hormonstatus bestimmt, denn hormonabhängige Neoplasien können durch diese im Wachstum gefördert werden. Hierbei wird bestimmt, ob der Tumor Rezeptoren für diese Hormone besitzt. Lässt sich zum Beispiel der Estrogenrezeptor in einem Tumor nachweisen, bezeichnet man diesen als „rezeptorpositiv“ (ER+).

Bei estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen ist eine Therapie mit selektiven Rezeptormodulatoren (SERMs) sinnvoll. Die Tatsache, dass bestimmte Substanzen aufgrund unterschiedlicher Rekrutierung von Kofaktoren in bestimmten Geweben agonistisch und in anderen Geweben antagonistisch wirken können, eröffnete neue Möglichkeiten in der Therapie. So kann das Wachstum von entartetem, estrogenabhängigen Gewebe vermindert werden. SERMs dienen somit zur Minimierung der Tumorgöße (für eine anschließende Operation), zum Schutz vor einer schnelleren Proliferation von eventuellen Metastasen nach der Operation des Primärtumors und zur Prophylaxe einer Wiederkehr des Tumors. [11,16]

Eine der ersten Substanzen, die für diese Zwecke eingesetzt wurden, war Diethylstilbestrol (DES). DES (siehe Abbildung 2.1) wurde ab 1941 zur Behandlung der Vaginalentzündung, postmenopausaler Beschwerden und zur Verhinderung der Brustvergrößerung nach einer Schwangerschaft eingesetzt. Letztere Indikation führte auch zur Anwendung von DES in der Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms. Ab 1960 galt DES 20 Jahre lang als Mittel der Wahl gegen diese Krebsart [17].

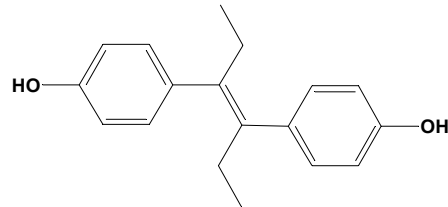


Abbildung 2.1: **Diethylstilbestrol**

Aufgrund der agonistischen Aktivität von DES ist aber das Risiko für Vaginalkrebs und Brustkrebs sogar in den noch folgenden Generationen erhöht [17]. Deshalb wurde nach selektiven Estrogenrezeptormodulatoren gesucht. Dies führte zur Entwicklung von Tamoxifen (TAM) [18] (Abbildung 2.2).

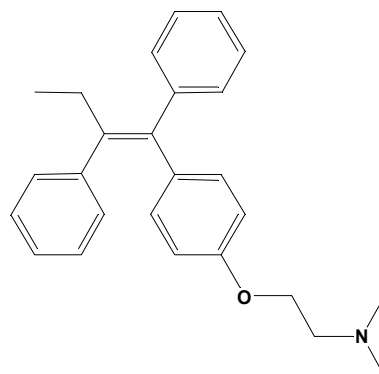


Abbildung 2.2 **Tamoxifen**

Ursprünglich sollte TAM als „Pille danach“ entwickelt werden, aber seine Wirkung gegen Brustkrebs wurde schnell klar. Obwohl TAM eine durch seine geringeren Nebenwirkungen deutliche Verbesserung gegenüber DES darstellt, weist es immer noch eine leichte agonistische Wirkung auf, die das Risiko eines Endometriumkarzinoms erhöht. Mittlerweile findet Tamoxifen ein breites Anwendungsspektrum in der Therapie von Brustkrebs, der Prävention der Wiederkehr von Brustkrebs und der Behandlung von Infertilität [19].

TAM ist ein Prodrug. Im Körper wird es mit Hilfe der Isoenzyme CYP2D6 und CYP3A4 zu der Wirkform 4-Hydroxytamoxifen (OHT) umgesetzt. Diese basische Seitenkette interagiert mit der schon erwähnten Asparaginsäure (Asp351, vergleiche Abbildung 1.3) und ist somit fähig, die Lage der Helix 12 [18,19] zu beeinflussen.

Wie bereits erwähnt, weist TAM nicht nur antagonistische, sondern auch agonistische Wirkungen auf. Diese agonistischen Wirkungen erhöhen das Risiko eines Endometriumkarzinoms und den Triglyceridspiegel im Blut, was in Einzelfällen schon zu sogenannten „Fettlebern“ geführt hat. Zusätzlich können sich gegen Tamoxifen Resistenzen entwickeln, die durch die Downregulation der Estrogenrezeptoren, einem veränderten Verhältnis der ER α / β und einer gesteigerten Aromataseaktivität hervorgerufen werden können [18].

Aufgrund der Häufigkeit von Brustkrebs und der damit verbundenen Resistenzentwicklung gegenüber Tamoxifen ist deshalb die Entwicklung von weiteren selektiven, nebenwirkungsarmen Estrogenrezeptormodulatoren als Tumorthapeutika von immenser Bedeutung. In vorhergehenden Arbeiten konnten 4,5-Diaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole als Liganden des Estrogenrezeptors und selektive Estrogenrezeptormodulatoren [12, 13, 14] bestätigt werden.

Kapitel 2.2 Die Entwicklung von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen aus bekannten SERMs

DES war einer der ersten Estrogenrezeptorliganden ohne Steroidstruktur. Weitergehende Entwicklungen gingen deshalb häufig von dieser Grundstruktur aus. Aus dem DES wurde das Hexestrol abgeleitet [20].

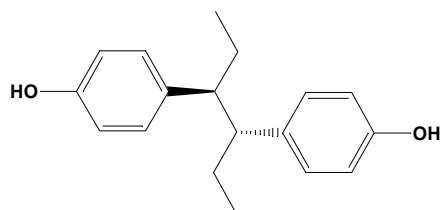


Abbildung 2.3 Hexestrol

Von diesem Molekül ausgehend wurden die 1,2-Diarylethandiamine synthetisiert. Diese erwiesen sich als wirksam am Estrogenrezeptor, allerdings mit einer schwächeren relativen Bindungsaffinität als die Mutterverbindung Hexestrol. Die estrogene Wirkung dieser Verbindungen war an eine hohe Lipophilie durch eingeführte Halogene an den Aromaten gebunden, sowie an die N-Alkylierung oder die N,N'-Dialkylierung [21].

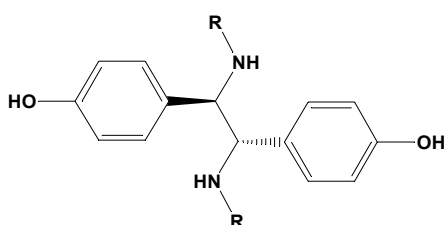


Abbildung 2.4: Grundstruktur der estrogen wirksamen N,N'-Dialkyl-1,2 bis(hydroxyphenyl)ethandiamine

Da bekannt war, dass bei 75% aller Mammakarzinome eine erhöhte Expression von Estrogenrezeptoren vorliegt [3], sollte die Affinität der Diamine zum Estrogenrezeptor ausgenutzt und mit einer zytostatischen Wirkkomponente belegt werden. Eine wichtige Leitstruktur für eine zytostatische Wirkkomponente ist das cis-Platin. (Abbildung 2.5) In den daraus entwickelten Platinkomplexen ist die zytotoxische $PtCl_2$ -Einheit mit einem ER-affinen Neutralliganden vereint.

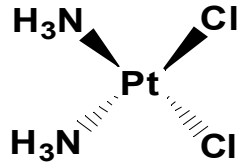


Abbildung 2.5

Cis – Platin (CDDP) [22]

Die Komplexierung von 1,2 -Diarylethandiaminen mit Platinsalzen ergab zum Beispiel den Chlor-[1-(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-2-phenylenethandiamineplatin(II) - Komplex aus Abbildung 2.6. Obwohl sich durch die Komplexierung der 1,2-Diarylethandiamine mit Platin die relative Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor verringerte, nahm die Genaktivierung zu.

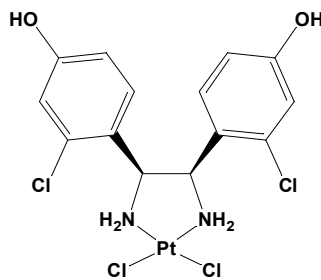


Abbildung: 2.6

Aus einem 1,2-Diaryl-1,2-ethandiamin abgeleiteter Platin(II)komplex [59]

Als die cis-Platinpartialstruktur formal gegen eine Methingruppe [14] ausgetauscht wurde, ergaben sich 4,5-Dihydro-1H-imidazole, die eine vergleichbare Raumstruktur aufwiesen und trotz geringer Affinität zum Estrogenrezeptor eine estrogenvermittelte Genaktivierung auslösen konnten. Diese Strukturen konnten als Estrogene vom Typ II (siehe oben) bestätigt werden.

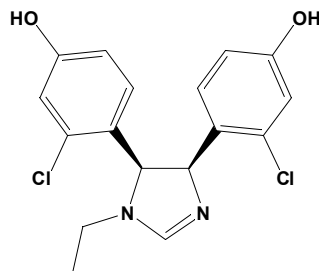


Abbildung 2.7: (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-bis(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-N-ethyl-4,5-dihydroimidazol

Die Einführung einer basischen Seitenkette ergab hingegen leicht antiestrogen wirksame 4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazole. Diese erwiesen sich als selektiv antagonistisch an ER α und stellen somit selektive Estrogenrezeptormodulatoren dar.

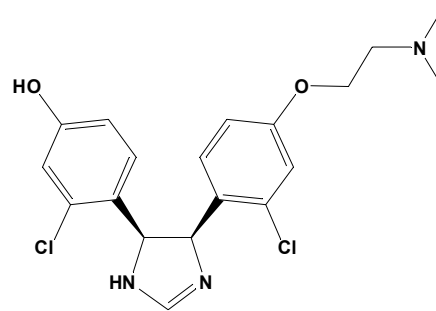


Abbildung 2.8 (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-4-(2-Chlor-4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl)-5-(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazol [14]

Kapitel 2.3 Problemstellung

Diese Antiestrogenität sollte durch Einführung eines dritten Aromaten moduliert und verstärkt werden (siehe Abbildung 2.9).

In der LBD des ER α tritt eine der OH-Gruppen des 4,5-Di(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazolgrundgerüsts analog zu Typ-I Estrogenen in H-Brückenbindung zu den Aminosäuren Arg394, Glu353 und einem Wassermolekül. Die zweite Hydroxygruppe kann mit Asp351 oder Thr 347 interagieren. Durch einen zusätzlichen Aromaten am C2 des Grundgerüsts könnte eine Interaktion mit His524 möglich sein. Dadurch soll die Bindungsaffinität erhöht und die Genaktivierung gesteigert werden.

Ein Aromat in C2 des 4,5-Dihydroimidazolringes verändert die räumliche Struktur eines potentiellen Liganden. Auf diesem Wege könnte eine optimierte Positionierung in der LBD erfolgen und essentielle Kontakte von basischen Seitenketten vermittelt werden.

Insbesondere sollten SERMs synthetisiert werden, die eine hohe Selektivität zu ER α , der hauptsächlich im Brustgewebe vorkommt, aufweisen.

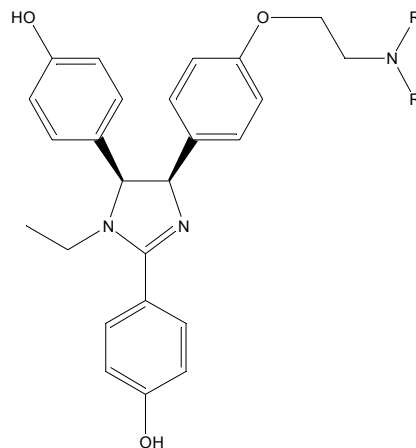


Abbildung 2.9: 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole als potentielle SERMs

Kapitel 3 Synthese und Überblick über synthetisierte Verbindungen

Kapitel 3.1 Synthesen von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen

In der vorliegenden Arbeit wurden (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole und ihre N-alkylierten Analoga synthetisiert. Zentrale Synthesebausteine dieser Verbindungen sind die entsprechend substituierten Aldehyde, die mit verschiedenen Stickstoffverbindungen umgesetzt werden. Dabei ergeben sich für die 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole zwei wichtige Syntheserouten

1. über Diazapentadiene als Zwischenstufen
2. über 1,2-Diarylethandiamine als Zwischenstufen

Kapitel 3.1.1 Synthese von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen über 2,4-Diazapentadiene:

Über diesen Syntheseweg werden symmetrisch substituierte 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole hergestellt.

Schon 1837 wurde festgestellt, dass Benzaldehyd in wässriger ammoniakalischer Lösung zu einem Trimer reagiert, das später als Diimin oder Diazapentadien identifiziert wurde [24,25]. Einfache mono- oder disubstituierte aromatische Aldehyde lassen sich problemlos umsetzen. Hierbei reicht einfaches Rühren bei Raumtemperatur in gesättigter, wässriger oder ethanolischer Ammoniaklösung aus. Bei dieser Reaktion ist die Art der Substitution von Bedeutung. Substituenten (in Position 3 oder 4 des Aromaten) mit einem +M-Effekt (-OCH₃ oder -Cl) reagieren nahezu quantitativ. In Position 2 substituierte Aldehyde sind für diese Art der Reaktion sterisch gehindert und ergeben daher geringere Ausbeuten als die vergleichbaren in Position 4 substituierten Aldehyde.

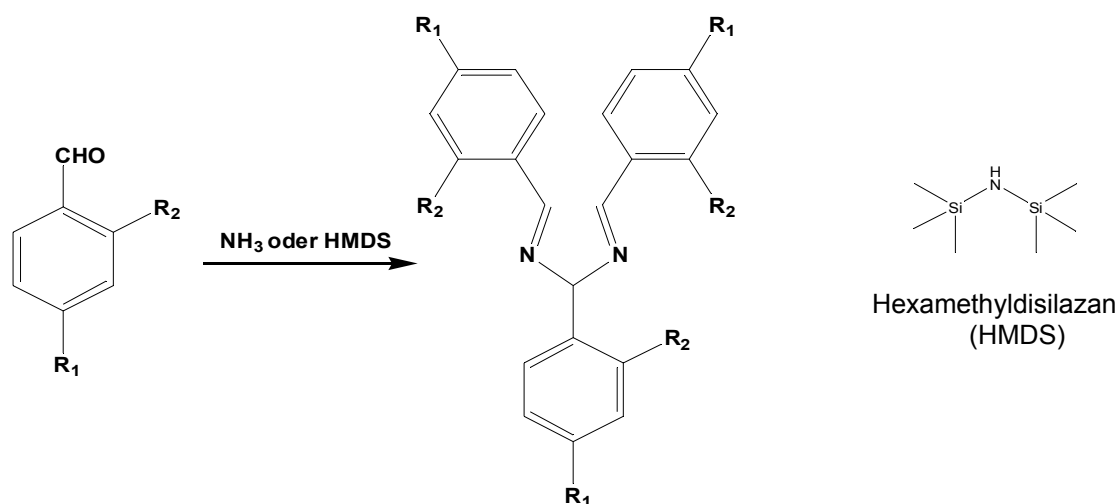


Abbildung 3.1: Bildung von 2,4-Diazapentadienen aus aromatischen Aldehyden [25,26,27]

$R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{F}$ oder Cl

Die abgebildeten 2,4-Diazapentadiene lassen sich nicht nur mit wässriger oder ethanolischer Ammoniaklösung synthetisieren, sondern auch mit Hexamethyldisilazan (HMDS, siehe Abbildung 3.1 rechts). Hierbei wird der Aldehyd zusammen mit HMDS (das gleichzeitig auch als Lösemittel fungiert) und basischem Al_2O_3 über 6h bei 120°C gehalten. Diese Methode eignet sich insbesondere für sterisch gehinderte Aldehyde.

Durch Umsetzung der 2,4-Diazapentadien-Vorstufen mit einer Base lassen sich symmetrisch substituierte (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole synthetisieren. Die dabei ablaufende Reaktion wird als perizyklisch und disrotatorisch beschrieben [26]. Der Begriff „pericyclisch“ beschreibt, dass zwischen den Enden eines konjugierten Systems ein Ring geöffnet oder geschlossen wird. Bindungsbruch und Bindungsbildung finden hierbei gleichzeitig statt. Eine starke Base deprotoniert zuerst das Diazapentadien. Im Anschluss daran findet ein disrotatorischer Ringschluss über ein Carbanion statt. Die Substituenten an den C-Termini des Diens rotieren beim Ringschluss in entgegengesetzte Richtungen. Das abstrahierte Proton wird nach dem Ringschluss wieder an das Molekül angelagert, somit verläuft die Reaktion unter Basenkatalyse. (Abbildung 3.3)

Auch die Tatsache, dass die Reaktion temperaturabhängig ist (für die (R/S)/(S/R)-Konfiguration waren Temperaturen unter 0°C entscheidend), weist auf eine disrotatorische Reaktion hin, denn durch das intermediär gebildete Carbanion befinden sich $4n+2$ Elektronen in dem System, was nach den Woodward-Hoffman-Regeln [28] bei einer thermischen Reaktionskontrolle zu einer suprafacialen Positionierung der Substituenten führt.

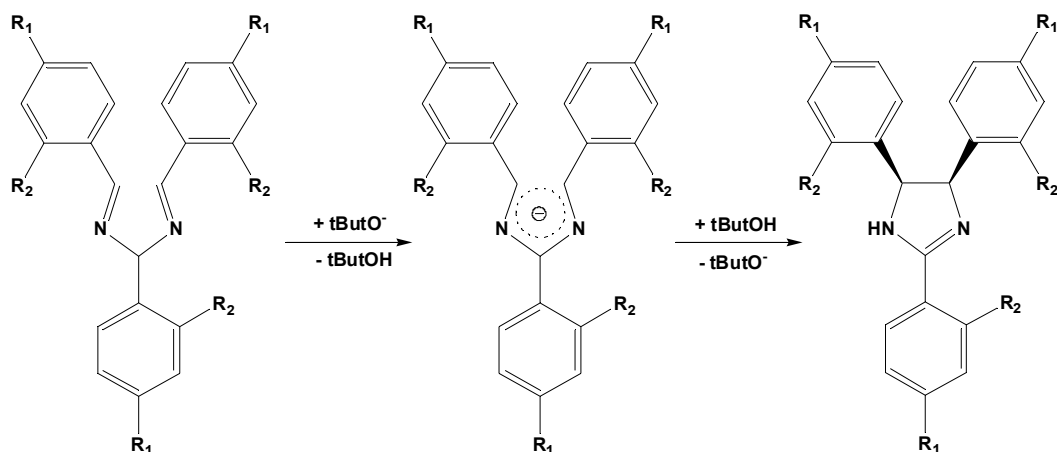


Abbildung 3.2: Zyklisierung des 1,3,5-Triaryl-2,4-diazapentadiens mit Hilfe einer Base zum 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazol [29]

Das intermediär gebildete Carbanion (Abbildung 3.3 Mitte, Literatur: [25,26]) zeichnet sich durch eine intensive blaue bis violette Farbe aus und dient zur Reaktionskontrolle. Ist die intensive Farbe des Carbanions zu dem hellen Gelb des Produktes (Lösung in THF, vergleiche Abbildung 3.2 rechts, Literatur: [29]) verblasst, ist die Reaktion beendet und kann abgestoppt werden.

So ist es möglich, besonders zeitsparend zu arbeiten. Durch Verwendung einer starken, räumlich gehinderten Base (tButOK) in absolutem Tetrahydrofuran (THF), gelang es in der vorliegenden Arbeit, das gewünschte (4R,5S)/(4S,5R)-Produkt isomerenrein (Kriterium: ¹H-NMR-Spektroskopie) zu isolieren. Die Stereochemie des Produktes ist dabei von folgenden Faktoren abhängig: Dem Lösemittel, der verwendeten Base und der Temperatur.

Bei einer Reaktionstemperatur von > 0° C resultierten Diastereomergemische. Deshalb musste immer mit einem Eis-Kochsalzgemisch (3 Teile Eis und 1 Teil Kochsalz) gekühlt werden.

Des weiteren konnte die Selektivität in der vorliegenden Arbeit auch bei Verwendung des Lösemittels THF und der Base tButOK aufrecht erhalten werden. Bei der Verwendung von anderen Lösemitteln (Petrolether, Diethylether) und anderen Basen (NaH; EtONa) konnte die angestrebte Stereoselektivität nicht erreicht werden. Das zeigte sich an uneinheitlichen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren an der Position der benzylicchen Protonen.

Bei Substituenten mit einem $-I$ -Effekt (CN, Verbindung 5, siehe Kapitel 3.2) reicht die Carbonyllaktivität nicht aus, um mit NH_3 die Diazapentadien-Vorstufe zu bilden. Daher muss man drastischere Methoden wie zum Beispiel die Reaktion mit Hexamethyldisilazan bei 120°C anwenden [27]. Allerdings verläuft diese Reaktion mit diesem Substituenten direkt vom Aldehyd zum (4R,5S),(4S,5R)-Dihydro-2,4,5-triaryl-4,5-dihydroimidazol (Abbildung 3.3).

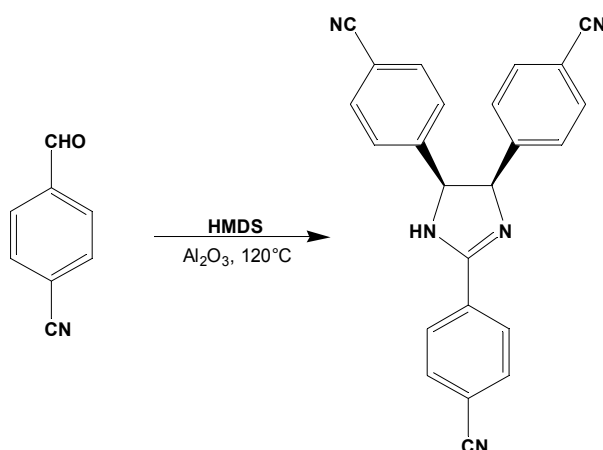


Abbildung 3.3: Die direkte Zyklisierung von 4-Cyanobenzaldehyd mit Hilfe von HMDS zum 2,4,5-Tris(4-cyanophenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol (5) [32]

Die Aufreinigung der so synthetisierten symmetrischen (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole geschieht folgendermaßen:

Zuerst wird die Reaktionslösung in einen mindestens dreifachen Überschuss an Wasser gegeben. Dabei wird die Reaktion abgestoppt; zum anderen vermischen sich das relativ hydrophile THF und die Base mit dem Wasser. Die Triaryl-4,5-dihydroimidazole sind sehr viel schlechter wasserlöslich und fallen aus. Am Anfang sind diese Verbindungen noch ölig – amorph, kristallisieren aber relativ schnell aus und lassen sich dann abfiltrieren. Für die Isolierung ist die Menge an Wasser entscheidend, da sich THF und Base vollständig darin lösen und somit vom Produkt abtrennen sollen.

Zur Aufreinigung werden die 4,5-Dihydroimidazole aus einem Gemisch von Ethylacetat und Hexan umkristallisiert. Dabei wird das 4,5-dihydroimidazol zuerst in einem Teil Ethylacetat gelöst und dann Hexan in steigenden Anteilen unter Schwenken zugegeben, bis das (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazol ausfällt und abfiltriert werden kann. Das Verhältnis von Ethylacetat und Hexan wird notiert. Das Produkt wird noch einmal mit einer geringen Menge an kaltem Hexan gewaschen und anschließend getrocknet. Sollte es noch notwendig sein, schliesst sich daran eine säulenchromatographische Aufreinigung mit Hilfe von Kieselgel und dem zuvor notierten Ethylacetat/Hexan-Lösemittelgemisch an.

Bei den hydrophileren Verbindungen wie zum Beispiel dem (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-amidophenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol **9** ist die Aufarbeitung durch Ausfällung aus einer wässrigen Lösung nicht möglich. Trotzdem ist es notwendig, diese Verbindungen von der Base und weiteren hydrophilen Verbindungen durch Zugabe von Wasser zu trennen. Hier wird die Reaktionslösung zwar auch in die dreifache Menge Wasser gegeben, die resultierende Lösung aber dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der Dichlormethanlösung mit Natriumsulfat wird das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Hilfe der Chromatographie aufgetrennt. Hier bietet sich besonders die zirkuläre Chromatographie („Chromatotron“) oder die Säulenchromatographie mit Aluminiumoxid als stationärer Phase an. Als Fließmittel wurden hier Dichlormethan/Methanol-Gemische gewählt. Das Verhältnis der geeigneten Dichlormethan/Methanol -Gemische wird zuerst durch Wirtschaftsgeographie ermittelt.

Kapitel 3.1.2 (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole über 1,2-Diarylethandiamine:

Über Diazapentadiene lassen sich nur symmetrisch substituierte (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole herstellen. Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, mehrere Aldehyde in einem Gemisch zur Reaktion kommen zu lassen und dieses Gemisch dann aufzuarbeiten, aber es stellte sich heraus, dass in dieser Reaktion ein Aldehyd bevorzugt reagiert und auch nur ein Produkt in signifikanten Mengen entsteht. Dies könnte auf die unterschiedlichen Carbonylaktivitäten der Aldehyde und auf sterische Hinderungen zurückzuführen sein. Daher wurde dieser Ansatz als ungeeignet verworfen.

1,2-Diarylethandiamine sind ein wichtiger Synthesebaustein für die Synthese von unsymmetrischen 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen.

Die dafür benötigten (1S,2R)/(1R,2S)-1,2-Diarylethandiamine können durch eine Synthese nach Vögtle [30] hergestellt werden, in dem man zuerst Benzil und Salicylaldehyd mit wässriger, gesättigter Ammoniaklösung zu N,N'-Dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethandiamin umsetzt (Abbildung 3.4).

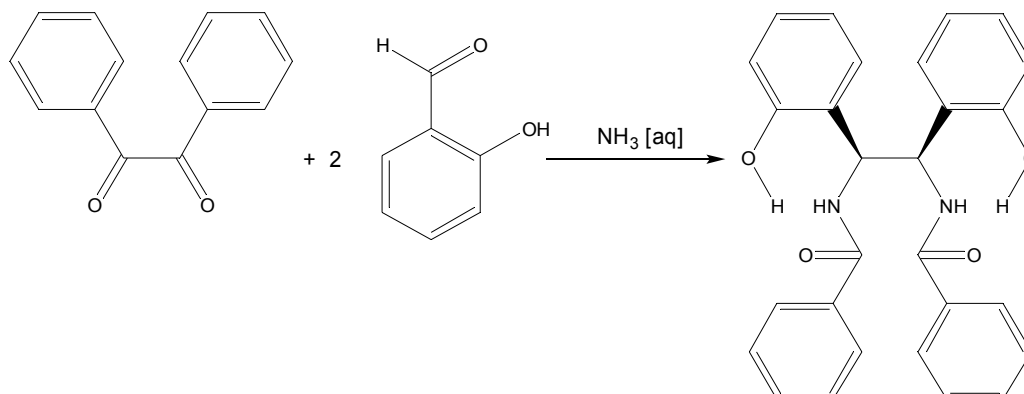


Abbildung 3.4: Reaktion von Benzil mit Salicylaldehyd in wässriger, ammoniakalischer Lösung [30]

Das resultierende aufgereinigte N,N'-Dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan-1,2-diamin wird im nächsten Schritt mit Hilfe von Acetanhydrid O-acetyliert und an N-umacetyliert. Acetanhydrid dient hierbei als Reagenz und als Solvens (Abbildung 3.5)

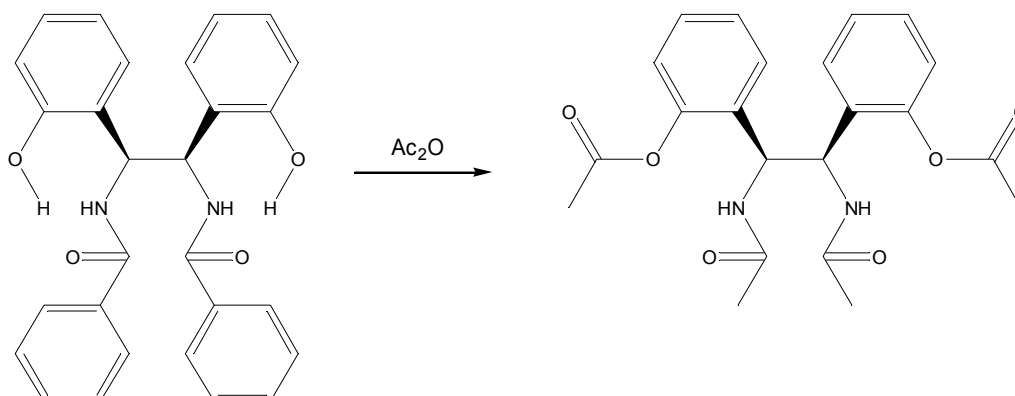


Abbildung 3.5: Acetylierung des N,N'-Dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethandiamins

Das acetylierte Diamin (Abbildung 3.5) kann mit Hilfe von konzentrierter Bromwasserstoffsäure zu (1S,2R)-1,2-Bis(2'-hydroxyphenyl)ethandiamin umgesetzt werden (Abbildung 3.6).

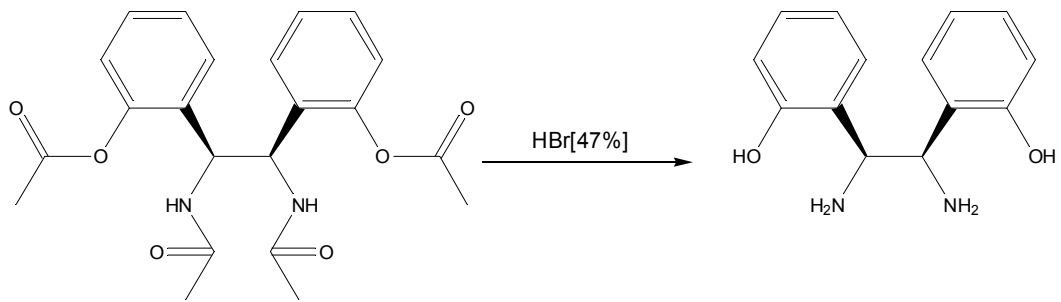


Abbildung 3.6: Spaltung zum (1S,2R)-1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethandiamin mit Hilfe von HBr (47%)_{aq}

Dieses Produkt wird nun mit den entsprechend methoxylierten Benzaldehyden im Rahmen einer Diaza-Cope-Umlagerung umgesetzt (Abbildung 3.7).

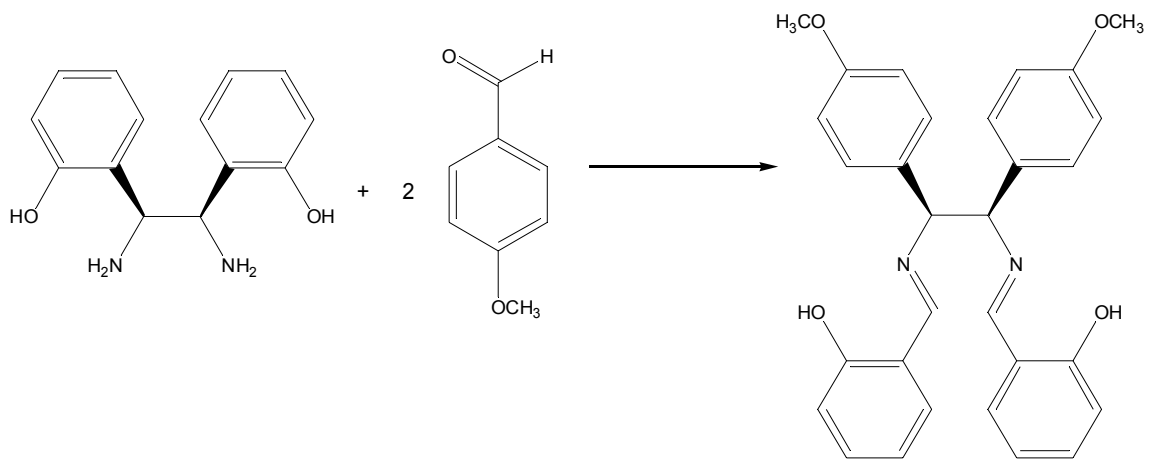


Abbildung 3.7: Bildung der N,N'-Disalicyliden-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethandiamine

Die gewünschten (1R,2S)/(1S,2R)-1,2-Diarylethandiamine werden durch Spaltung mit 6N H₂SO₄ erhalten. Um eine quantitative Umsetzung zu erreichen, wird der frei werdende Salicylaldehyd dem System mittels Wasserdampfdestillation entzogen (Abbildung 3.8).

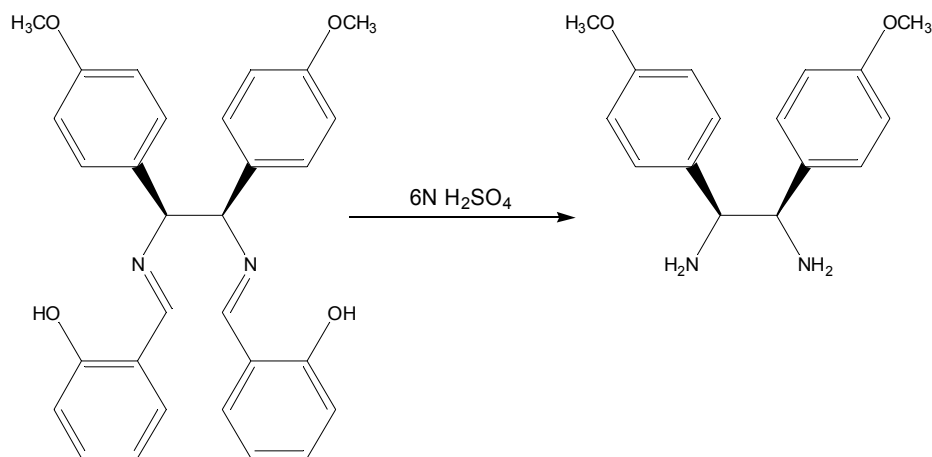
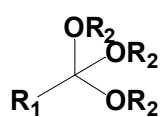


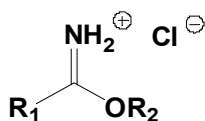
Abbildung 3.8: Die Spaltung der N,N'-Disalicyliden-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethandiamine zu 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethandiaminen

Die dabei entstandenen Hydrosulfate werden mit 2N NaOH in die freien Basen umgesetzt und können anschließend zu 4,5-Dihydro-1H-imidazolen zyklisiert werden.

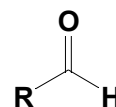
Der Ringschluss kann mit verschiedenen Aldehyden und Aldehydderivaten (Abbildung 3.9) erfolgen.



Orthoester



Iminoether



Aldehyd

Abbildung 3.9: Verschiedene Aldehydderivate zur Zyklisierung von Diaminen zu 4,5-Dihydro-1H-imidazolen

4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazole lassen sich mit Orthoestern und den vorstehend beschriebenen Diaminen herstellen [12,14]. Für die sterisch anspruchsvolleren 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole können Iminoether [31] verwendet werden. Iminoether können durch die sogenannte Pinner – Reaktion (das Produkt – Iminoetherhydrochlorid – wird auch als Pinner – Salz bezeichnet) aus Nitrilen, einem Alkohol und HCl_g hergestellt werden [31]. Die Herstellung von Iminoethern aus Aldehyden kennzeichnet sich durch mehrere Arbeitsschritte und verminderte Ausbeuten, daher wurde nach einer einfacheren Komponente für die Herstellung der Triaryl-4,5-dihydroimidazole gesucht. Als einfachere Komponente wurde ein Aldehyd ausgewählt.

Neuere Literaturangaben [32,33,34] beschreiben, dass sich 4,5-Dihydro-1H-imidazolderivate durch die gemeinsame Oxidation von Diaminen und Aldehyden mit Hilfe des Oxidationssystems $KI/I_2/K_2CO_3$ [34] herstellen lassen. In der ursprünglichen Veröffentlichung wurde von Ethandiamin ausgegangen und Wasser als Lösemittel verwendet. In der vorliegenden Arbeit konnte aus dem 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethandiamin und in Position 2' substituierten Aldehyden erfolgreich 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1Himidazole hergestellt werden. Da sich aber das 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethandiamin nicht in Wasser löst, wurde für diese Reaktion als Lösemittel Methanol verwendet. So konnten 4,5-Dihydroimidazole hergestellt werden, die einen im Vergleich zu den Aromaten des 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethandiamin unterschiedlich substituierten Aromaten in Position 2 des 4,5-Dihydroimidazolrings tragen.

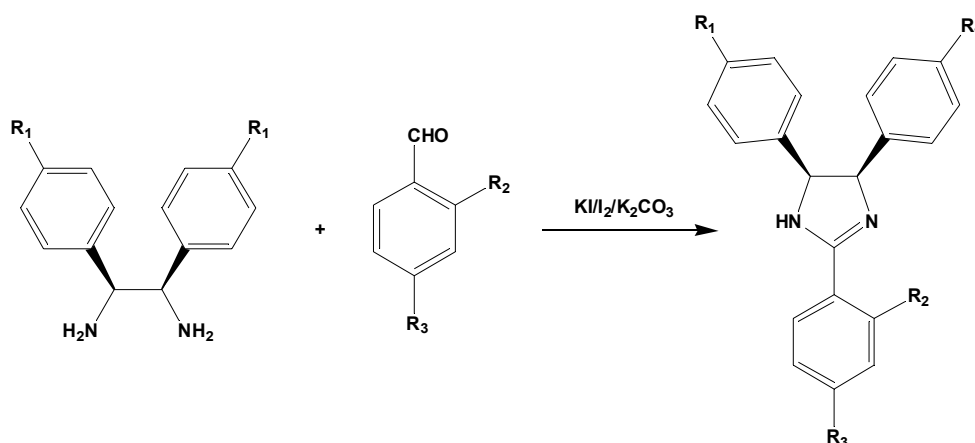


Abbildung 3.10: Zyklisierung eines 1,2-Diarylethandiamins und eines Aldehyds mit Hilfe des Oxidationssystems $KI/I_2/K_2CO_3$ zu 1,3,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen[34]

Kapitel 3.1.3 Weiterführende Synthesen

Die 2,4,5-Tris(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole sind Ausgangspunkt für weitere Derivatisierungen:

- N-Alkylierungen (Alkylgruppen, Propargylsubstituent)
- Spaltung der Ethergruppen
- Veretherung der resultierenden Phenolgruppen mit Seitenketten mit basischen Funktionen

Kapitel 3.1.3.1 N – Alkylierungen von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen

Eine weitere wichtige Variation von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen ist die Substitution der Stickstoffe N1 oder N1 und N3 mit je einem Alkylrest. Da die Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole als schwache Säuren reagieren können [12], lassen sie sich in aprotischen Medien durch Zusatz starker Basen deprotonieren. Die Deprotonierung ist begünstigt, weil das gebildete 4,5-Dihydroimidazolid seine negative Ladung über beide Stickstoffe delocalisieren kann [12, Abbildung 3.11].

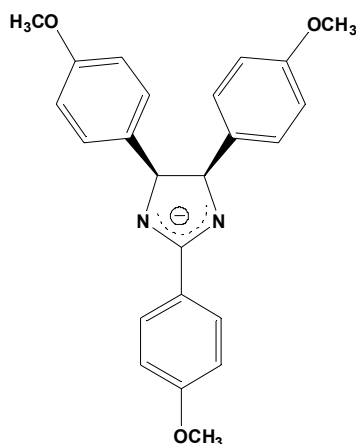


Abbildung 3.11: Deprotoniertes 2,4,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydroimidazol

Fügt man anschließend ein Alkylhalogenid hinzu, so wird das Molekül an den Stickstoffen substituiert. Da die Reaktion nach einem S_N2 -Mechanismus verläuft, sind primäre Alkylhalogenide gegenüber sekundären oder tertiären Alkylhalogeniden begünstigt. In der vorliegenden Arbeit gelang es durch den Einsatz ausgewählter Basen, sowohl Mono- als auch Dialkylierungen selektiv durchzuführen. Mit Hilfe der N-Alkylierung erzielt man lipophilere Moleküle ohne basisches N1 und kann gleichzeitig die Auswirkungen funktioneller Gruppen auf (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole untersuchen [35]

Der Einsatz von n-Butyllithium als Base ermöglichte die Synthese der monoalkylierten Form. n-Butyllithium ist eine metallorganische Verbindung, deren charakteristische Eigenschaften von der deutlichen Elektronegativitätsdifferenz zwischen Kohlenstoff (2,55) und Lithium (0,98) herrühren. Diese Differenz bewirkt, dass der Kohlenstoff im Molekül eine negative Partialladung besitzt und deshalb in der Lage ist, als starke Base zu wirken. Hierbei war es von besonderer Bedeutung, die Reaktion wasserfrei und unter Schutzgasung (Argon) in absolutem THF durchzuführen.

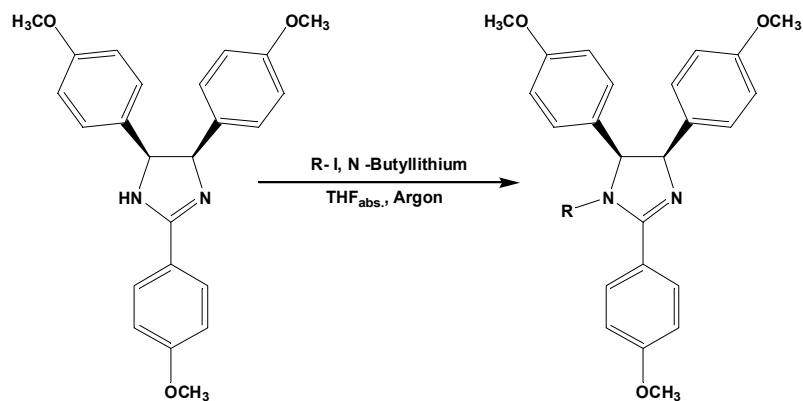


Abbildung 3.12: Monoalkylierung von 2,4,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydroimidazol (6)

Die dialkylierte Form ergab sich bei Verwendung von K_2CO_3 als Base und dem Kronenether 18-Krone-6. Letztere Verbindungsklasse zeigt gute Löslichkeiten in polaren und unpolaren Medien und ist gleichzeitig in der Lage, bestimmte Ionen zu komplexieren. Dabei weist sie eine charakteristische Affinität für ein spezielles Kation auf. 18-Krone-6 schließt bevorzugt Kaliumionen ein, weshalb bei der Zugabe von Kaliumcarbonat zu einer Lösung von 18-Krone-6 in Acetonitril ein sogenanntes „nacktes“ Carbonation (ein Ion ohne Hydrathülle) entsteht. Dieses nackte Carbonation fungiert in diesem aprotischen System als starke Base und ist dementsprechend in der Lage, das 4,5-Dihydro-1H-imidazol zu deprotonieren. Bei dieser Reaktion entsteht die permanent positiv geladene dialkylierte Verbindung, die mit Iodid zusammen ein Salz bildet.

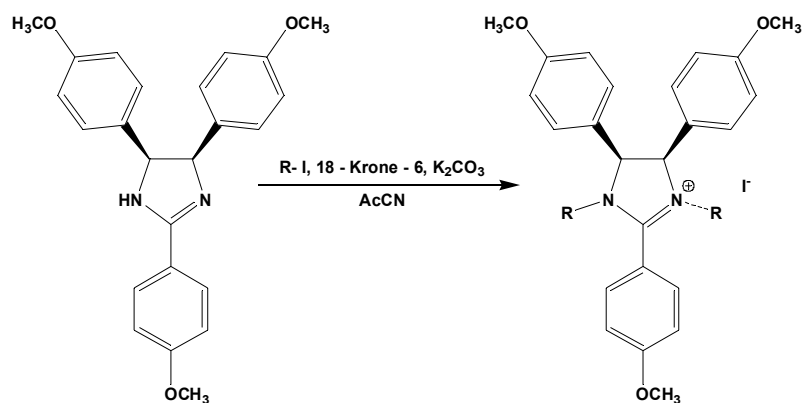


Abbildung 3.13: Dialkylierung von 2,4,5 -Tris-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol (8)

Kapitel 3.1.3.2 Etherspaltung von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(methoxyphenyl)-4,5-dihydroimidazolen

Hydrophile Gruppen in para-Position der Arylsubstituenten lassen sich durch Etherspaltung der Methoxygruppen mit Hilfe von Bortribromid [12] erzielen. Diese starke Lewis-Säure ist besonders gut zur schonenden Spaltung von Alkylarylethern geeignet, wie sie hier vorliegen. Dabei resultieren Phenolgruppen, die wiederum Ausgangspunkt für die Einführung weiterer funktioneller Gruppen sind. Mit Hilfe von BBr_3 gelang es auch, Methoxygruppen unsymmetrischer 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1*H*-imidazole mit basischen Seitenketten zu entschützen, ohne dass die ebenfalls als Ether vorliegende basische Seitenkette zerstört wird (Verbindung 37, siehe Kapitel 3.2). Dies scheint an der längeren O-Alkylkette zu liegen.

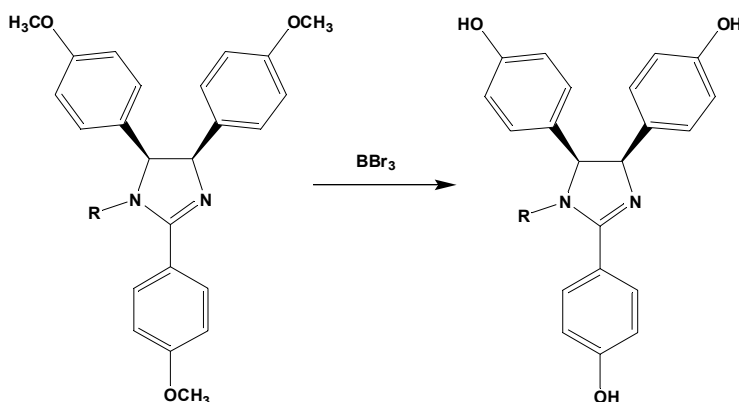


Abbildung 3.14: Spaltung der Methoxygruppen des Aromaten mit Hilfe von BBr_3
Methode nach [12]

Kapitel 3.1.3.3 Einführung basischer Seitenketten in phenolische 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole

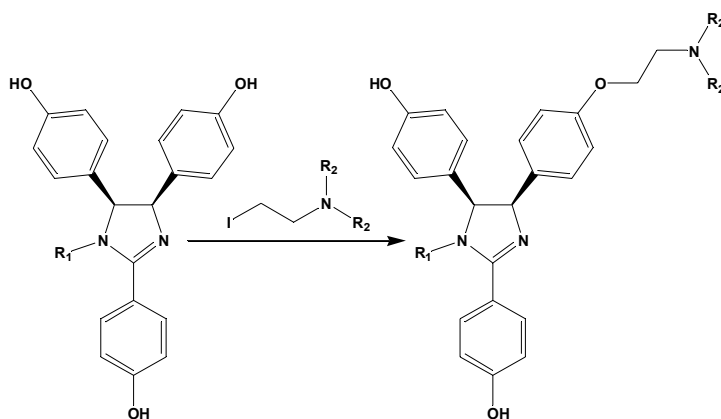


Abbildung 3.15: Einführung basischer Seitenketten in 2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazole

Für die Einführung basischer Seitenketten (siehe Abbildung 3.15) wird die Reaktivität von Phenolgruppen im Rahmen einer Williamson-Ether-Synthese genutzt. Dabei kann man durch gezielte Auswahl der Basen (entweder Natriumethanolat oder tButOK) und Alkylhalogenide eine große Auswahl an Verbindungen erzielen.

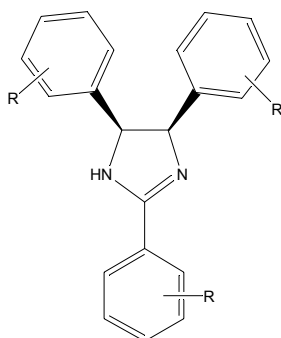
Für diese Reaktionen ist es notwendig, in absolutem Ethanol unter Schutzgas zu arbeiten. Zwar ist diese Reaktion unselektiv und man erzielt ein Gemisch aus mindestens 6 Isomeren in verschiedenen Mengenanteilen, aber durch sorgfältige Trennung kann man gleichzeitig verschiedene Isomere isolieren.

Dabei werden zuerst aus dem ethanolischen Reaktionsgemisch mit Hilfe von etherischer HCl die Edukte ausgefällt und das resultierende Isomerengemisch anschließend sorgfältig getrocknet. Danach wird das Gemisch mit Hilfe des Chromatotrons und einem Dichlormethan/Methanolgradienten getrennt. Man beginnt mit reinem Dichlormethan. Ab 9 Teilen Dichlormethan und 1 Teil Methanol wird dem Gradienten ein kleiner Anteil Triethylamin (0,01 Teil) zugesetzt und bis zum reinen Methanol mit 0,01 Teil Triethylamin fortgesetzt. Die Fraktionskontrolle erfolgt per Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und Dünnschichtchromatographie. So erhält man ein breites Spektrum an Verbindungen und kann die Bedeutung des Substitutionsortes besser klären.

Eine Übersicht der synthetisierten Verbindungen findet sich in Kapitel 3.2

Kapitel 3.2 Substanzübersicht.

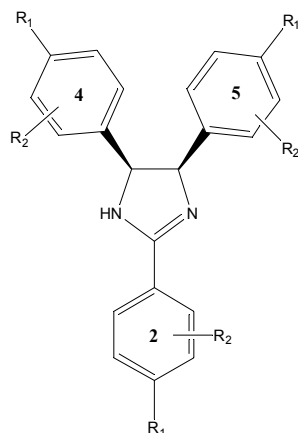
Monosubstituierte Verbindungen:



Verbindung	Stereochemie	Position am Aromaten	R =
1	(4R,5S)/(4S,5R)	-alle-	H
2	"	4	F
3	"	4	Cl
4	"	4	CH ₃
5	"	4	CN
6	"	4	OCH ₃
7	"	4	SCH ₃
8	"	4	OH
9	"	4	CONH ₂
10	"	3	Cl
11	"	3	OCH ₃
12	"	2	F
13	"	2	Cl
14	"	2	OCH ₃
15	"	2	OH

Tabelle 1: An den Aromaten einfach substituierte 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole

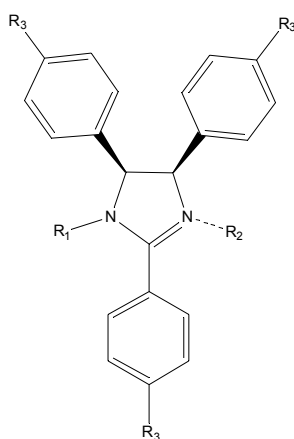
Mehrfach substituierte Verbindungen:



Verbindung	Stereochemie	R ₁ =	R ₂ =	Position von R ₂ =
16	(4R,5S)/(4S,5R)	OCH ₃	F (2,4,5)	2'
17	"	OCH ₃	Cl (2,4,5)	2'
18	"	OH	F (2,4,5)	2'
19	"	OH	Cl (2,4,5)	2'
20	"	OCH ₃	OCH ₃ (2,4,5)	3'
21	"	OCH ₃	H (4,5) F (2)	2'
22	"	OH	H (4,5) F (2)	2'

Tabelle 2: An den Aromaten mehrfach substituierte 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole (die Zahlen in den Klammern bezeichnen die Position des Aromaten am 4,5-Dihydroimidazol)

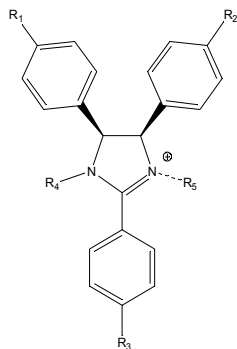
N-Alkylierte Verbindungen:



Verbindung	Stereochemie	R ₁ =	R ₂ =	R ₃ =
23	(4R,5S)/(4S,5R)	C ₂ H ₅	---	OCH ₃
24	"	C ₃ H ₇	---	OCH ₃
25	"	C ₃ H ₃	---	OCH ₃
26	"	C ₂ H ₅	---	OH
27	"	C ₃ H ₇	---	OH
28	"	C ₃ H ₃	---	OH
29	"	CH ₃	CH ₃	OCH ₃
30	"	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	OCH ₃
31	"	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	OCH ₃
32	"	CH ₃	CH ₃	OCH ₃
33	"	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	OH
34	"	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	OH

Tabelle 3: N-alkylierte und N,N'-Dialkylierte (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole

Verbindungen mit basischen Seitenketten



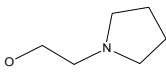
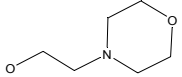
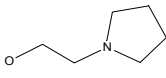
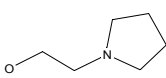
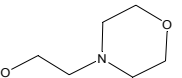
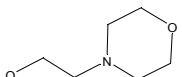
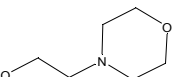
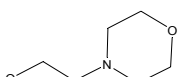
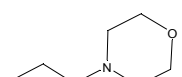
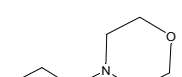
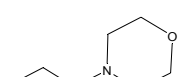
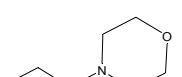
Verbindung	Stereochemie	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
35	(4R,5S)/(4S,5R)	OH		OH	H	---
36	"	OH		OH	H	---
37	"	OCH ₃	OCH ₃		H	---
38	"	OH	OH		H	---
39	"	OH	OH		H	---
40	"	OH			H	---
41	"	OH		OH	C ₂ H ₅	---
42	"	OH		OH	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅
43	"				H	---

Tabelle 4: (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole mit basischen Seitenketten

Kapitel 4 Analytischer Teil

Kapitel 4.1 Untersuchungen zur Identität

Die Identität der Verbindungen wurde mittels NMR- und Infrarotspektroskopie sowie Massenspektrometrie bestätigt.

4.1.1 ^1H -NMR-Spektroskopie

Die Identität organischer Verbindungen kann am besten durch ^1H -NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Im Folgenden werden exemplarisch einige charakteristische Spektren der jeweiligen Verbindungsklassen dargestellt und diskutiert.

1,3,5-Triaryl-2,4-diazapenta-1,4-diene

Abbildung 4.1 (oben) zeigt das ^1H -NMR Spektrum des 1,3,5-Tris(4-methoxyphenyl)-2,4-diazapenta-1,4-diens **V6**. Aufgrund der symmetrischen Struktur des Diazapentadiens sind die Aromaten in Position 1 und 5 chemisch und magnetisch äquivalent und erzeugen identische Signalgruppen. Diese sind aufgrund der direkten Bindung an die Doppelbindung im Vergleich zum C3-ständigen Aromaten zu tieferem Feld verschoben. Dies trifft besonders auf die ortho-Protonen zu.

Bedingt durch den additiven Effekt von Aromaten und Doppelbindung sind die Methinprotonen in Position 1 und 5 des Diazapentadiens an Position $\delta = 8,6$ versetzt. Auch das Methinproton an C3 ist diamagnetisch verschoben ($\delta = 6,90$). Dafür ist die unmittelbare Nähe der Doppelbindungen, zweier stark elektronegativer Stickstoffe und der Aromat verantwortlich. Im Vergleich zu den Protonen an C1/C5 fehlt aber hier der direkte Anisotropieeffekt der Doppelbindung.

Die Methoxygruppen befinden sich, wie erwartet, bei etwa $\delta = 3,8$, wobei die Methoxygruppe des Aromaten an C3 des Diazapentadiens bei tieferem Feld liegt, als die Methoxygruppen der Aromaten in Position 1 und 5.

Symmetrische, am Stickstoff nicht substituierte 4,5-Dihydro-1H-imidazole

Durch den Ringschluss von **V6** zum Tris(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol **6** (Abbildung 4.1, unteres Spektrum) ändert sich die Zahl der Protonen nicht, jedoch ergeben sich im Spektrum durch die damit verbundenen veränderten elektronischen Parameter charakteristische Verschiebungen.

Deutlich ist im Spektrum von **6** das NH-Signal bei $\delta = 7,6$ zu erkennen.

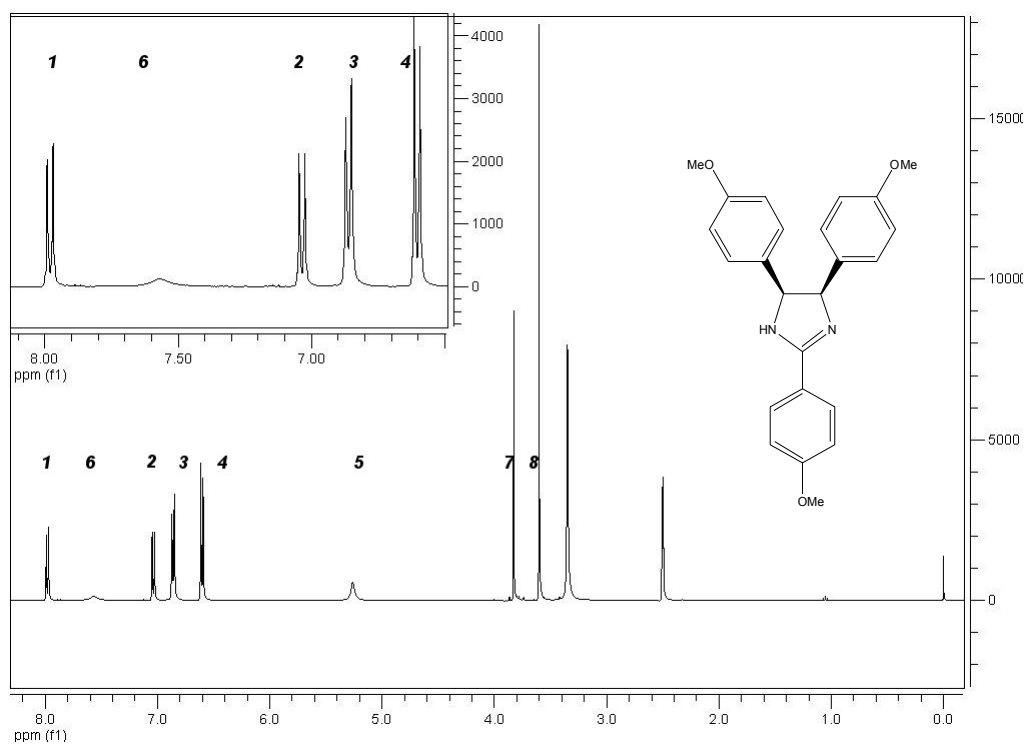
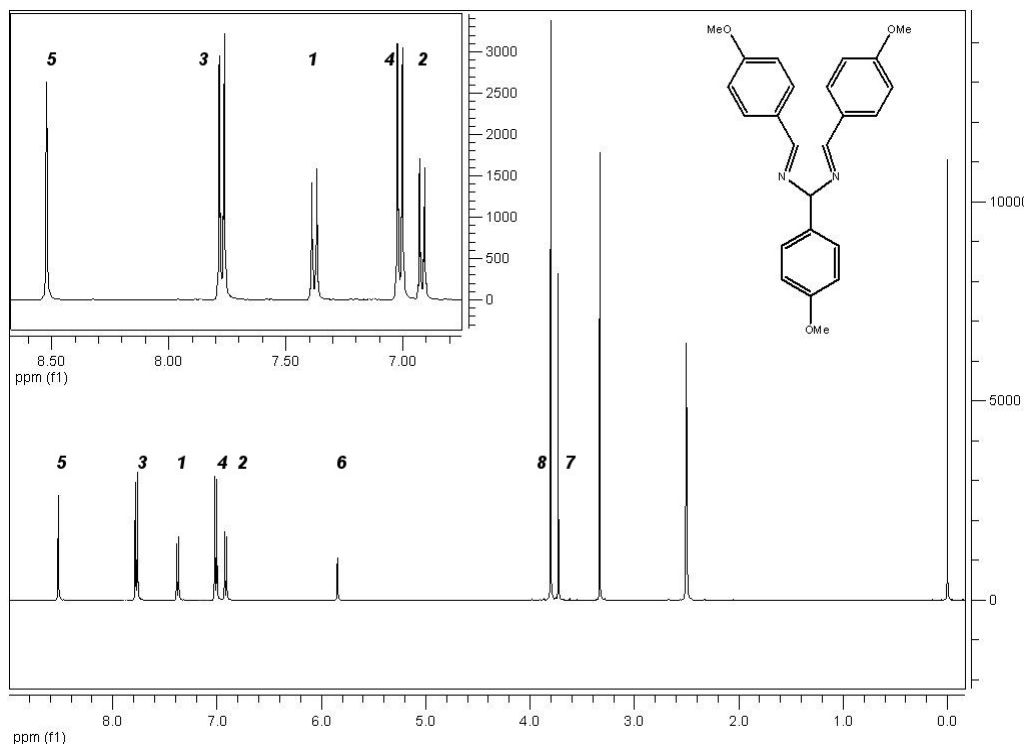


Abbildung 4.1: Spektren des 1,3,5-Tris(4-methoxyphenyl)-2,4-diazapenta-1,4-dien V6 in dms0-d₆ (oben) und des (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydroimidazols 6 in dms0-d₆ (unten). Die Zahlen entsprechen den in Tabelle 4.2 aufgeführten Protonen (siehe dort)

Durch Vergleich mit dem Spektrum des 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)dihydroimidazols (einer bereits bekannten Struktur [1,4,19]) kann eine Zuordnung der Signale der Verbindung **6** erfolgen. Die chemisch äquivalenten Aromaten in 4,5-Position erzeugen ein AA'BB'-Spektrum bei $\delta = 6,71$ und $6,95$, der C2-ständige Aromat bei $\delta = 7,09$ und $8,03$ ppm. Damit erfahren die in **V6** am Imin gebundenen Aromaten bei Ringschluss eine deutliche Hochfeldverschiebung, während die weiteren Aromatensignale nahezu unverändert bleiben. Ebenfalls chemisch und magnetisch äquivalent sind die benzyliischen Protonen, die ein Singulett bei $\delta = 5,20$ erzeugen, was mit den Untersuchungen von Lozsinskaya [29] und Wiglenda [31] übereinstimmt.

Thomas Wiglenda [31] hat Verbindung **6** mit Hilfe eines Iminoetherhydrochlorids und des isomerenreinen (1S,2R)/(1R,2S)-1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethan-1,2-diamins hergestellt. Verbindung **6** weist für die benzyliischen Protonen die gleiche chemische Verschiebung wie die entsprechende Verbindung von Thomas Wiglenda [53] auf. Daher kann die (4R,5S)/(4S,5R) – Konfiguration für die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Verbindungen als bestätigt erachtet werden.

Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die Veränderung der Verschiebung. Die Nummern 1-8 in Tabelle 4.2 geben in Abbildung 4.1 die Position der einzelnen Protonen an.

Signal Nr.	Vorstufe zu Verbindung 6: V6		Verbindung 6	
1	H _{(1)AA'}	7.39 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz)	H _{1AA'}	8,03 (d, 2H, ³ J=8,7 Hz)
2	H _{(1)BB'}	6.92 (d, 2H, ³ J = 8.6 Hz)	H _{(1)BB}	7,09 (d, 2H, ³ J=8,7Hz)
3	H _{(2)AA'}	7.78 (d, 4H, ³ J = 8.3 Hz)	H _{(2)AA'}	6,95 (d, 4H, ³ J=8,9Hz)
4	H _{(2)BB'}	7.01 (d, 4H, ³ J = 8.4 Hz)	H _{(2)BB'}	6,71 (d, 4H, ³ J=9,0Hz)
5	H ₃	8.52 (s, 2H)	H ₃	5,31 (s, br, 2H)
6	H ₄	5.85 (s, 1H)	H ₄	7,58 (s,br,1H)
7	OCH ₃₍₁₎	3.93 (s, 3H)	OCH ₃₍₁₎	3,87 (s, 3H)
8	OCH ₃₍₂₎	3.80 (s, 6H)	OCH ₃₍₁₎	3,65 (s, 6H)

Tabelle 4.2: Veränderung der chemischen Verschiebung bei Umsetzung von V6 zu 6

(Die Zahlen links in der Tabelle korrelieren mit den Signalen in den Spektren von Abb. 4.1)

Einfluss der N-Monoalkylierung auf das Spektrum

Wird Verbindung **6** am Stickstoff in Position 1 alkyliert, sind die Aromaten in Position 4 und 5 nicht mehr chemisch gleich und ergeben unterschiedliche Signale. Demzufolge sind, wie das Beispiel **23** (N-Ethylierung) zeigt, im Bereich von 6,5 bis 8 ppm sechs Aromatensignale zu erkennen (Abb. 4.3). Die Signale unter 7 ppm können den 4,5-ständigen Aromaten, die Signale über 7 ppm dem C2-ständigen Aromaten zugeordnet werden.

Aufgrund der Nähe zu einem Stereozentrum sind die Methylenprotonen der Ethylgruppe diastereotop aufgespalten und ergeben 2 verschiedene Signale bei $\delta = 2,7$ und $3,3$. Das Triplett der CH_3 -Gruppe findet sich bei $1,5$ ppm.

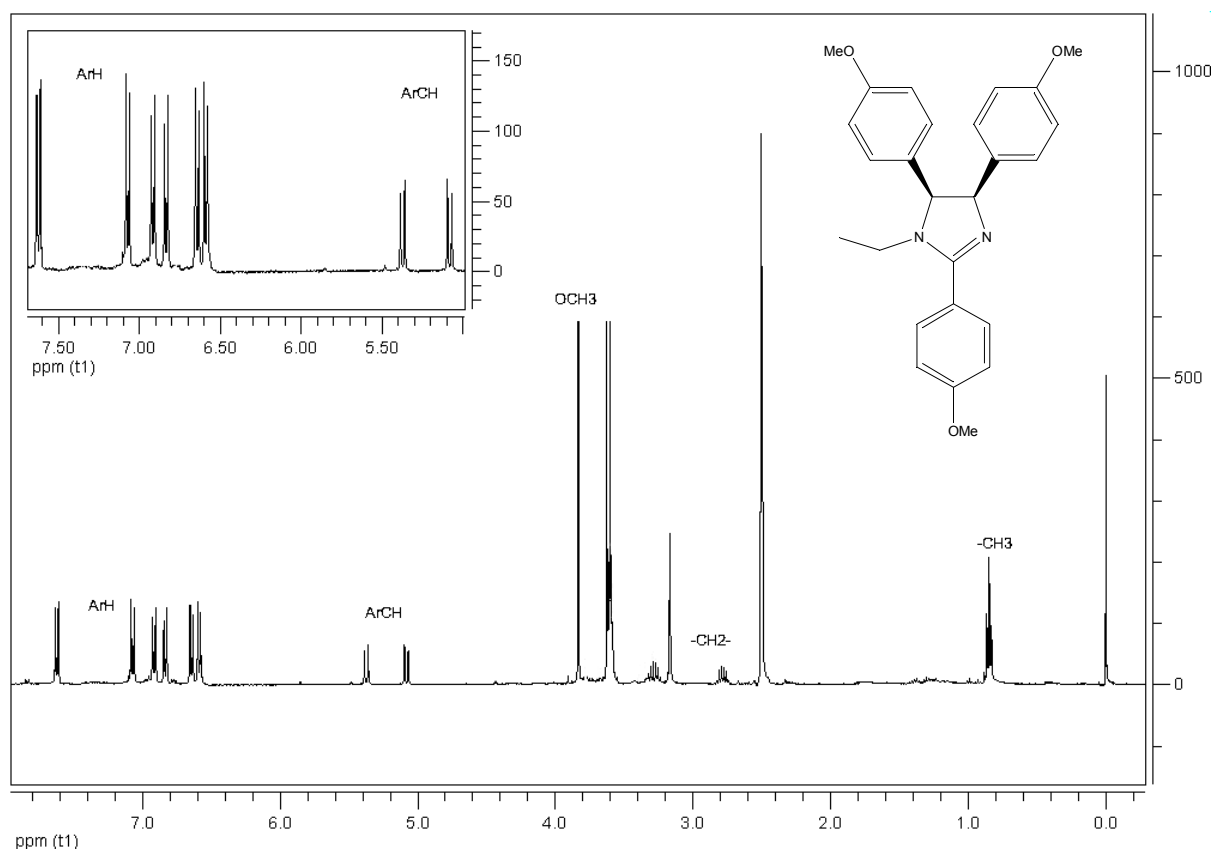


Abbildung 4.3: Spektrum des (4R,5S)/(4S,5R)-N-ethyl-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazols (23**) in DMSO-d_6**

Die chemisch und magnetisch nicht äquivalenten benzylichen Protonen spalten in zwei Dubletts. Die Kopplungskonstante beträgt $^3J = 10,8$ Hz und ist mit Kopplungskonstanten ähnlich substituierter 4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazole [12] vergleichbar. Mit Hilfe von MestreJ[®] kann unter Zugrundelegung der Karplus-Beziehung ein Torsionswinkel von ungefähr 29° berechnet werden, was näherungsweise auch für die Aromaten gilt. Es muss aber erwähnt werden, dass es sich um einen gemittelten Wert handelt, da der Dihydroimidazolring kein starres Molekül darstellt und einer gewissen Dynamik unterliegt, die die Position der Aromaten beeinflusst.

Einfluss der N,N'-Dialkylierung auf das Spektrum:

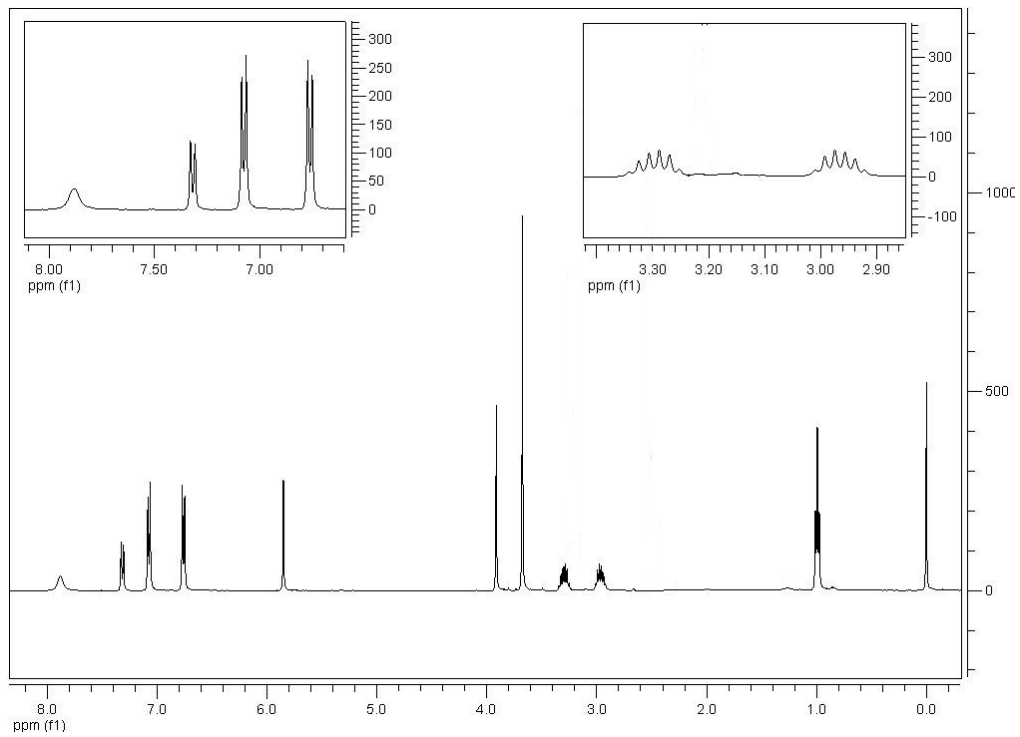


Abbildung 4.4 a): Verbindung 30 in dms0-d₆, gemessen bei 40 °C

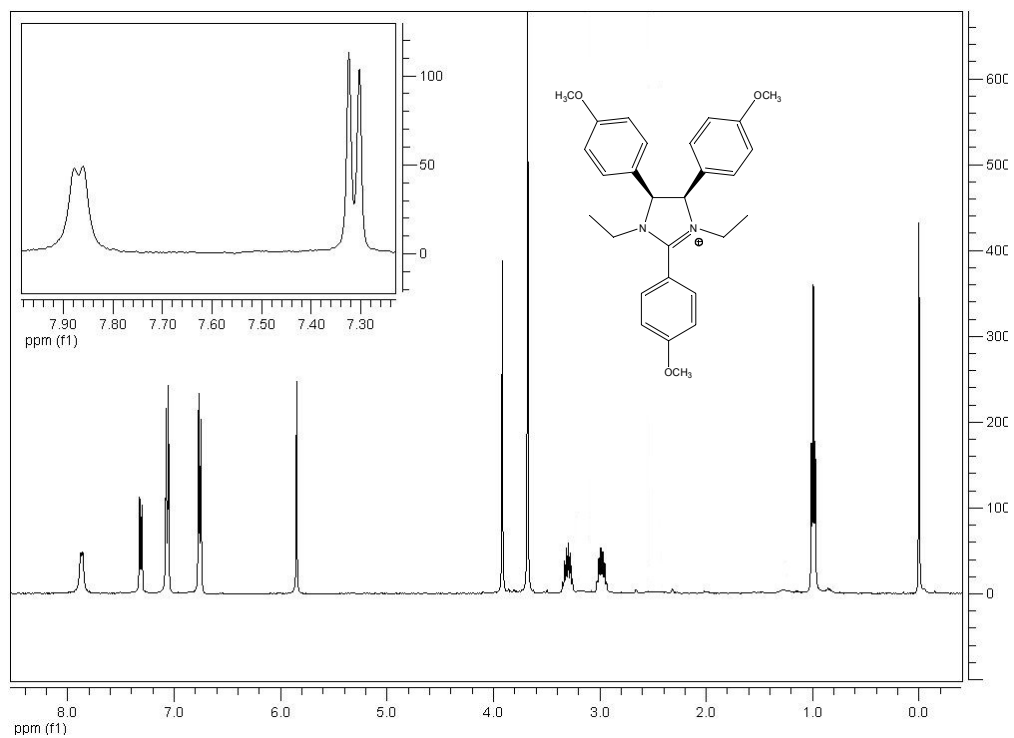


Abbildung 4.4 b): Verbindung 30 in dms0-d₆, gemessen bei 50 °C

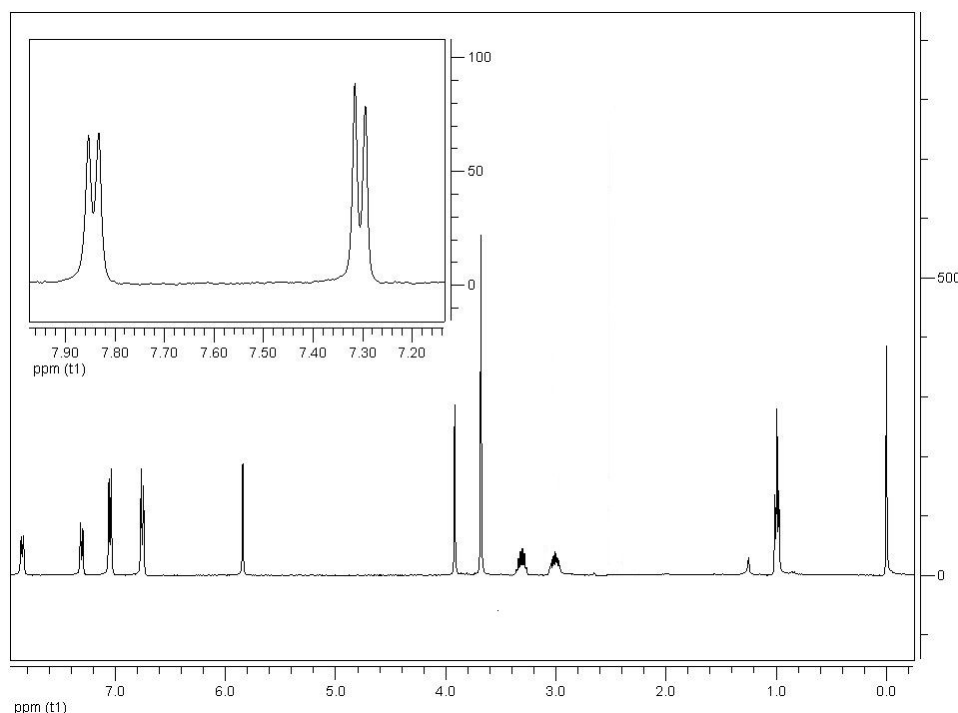


Abbildung 4.4 c): Verbindung 30 in dms0-d₆, gemessen bei 70 °C

Eine N,N'-Dialkylierung vereinfacht das Spektrum wieder (Verbindung 30; Abbildung 4.4). Die Aromaten an C4 und C5 des 4,5-Dihydro-1H-imidazols haben wieder eine identische chemische Umgebung und ergeben deshalb wieder ein gemeinsames Signal. Die chemische Äquivalenz gilt ebenfalls für deren Methoxygruppe und die benzyliischen Protonen.

Die Doppelbindung des Heterozyklus ist über die N-C-N Bindungen delokalisiert, sodass die Stickstoffe des 4,5-dihydro-1H-imidazolgerüst als partiell sp^2 – hybridisiert betrachtet werden können. Somit wird das 4,5-Dihydro-1H-imidazolgerüst teilweise zu einer planaren Einheit. Trotzdem sind die Protonen der Ethylgruppe diastereotop und spalten in Multipletts auf (siehe Abbildung 4.4 rechts oben).

Die permanente positive Ladung führt zu einer deutlichen Entschirmung der benzyliischen Protonen und teilweise auch der Protonen der Aromaten. Die N,N' –Dialkylierung führt aber nicht nur zu einer Änderung der elektronischen Gegebenheiten, sondern beeinflusst auch die Dynamik des C2-Aromaten. Im Spektrum ist eine deutliche Verbreiterung der Signale, insbesondere der ortho-Protonen zu beobachten. Dies deutet auf eine eingeschränkte Rotation des Aromaten hin.

Deshalb wurden von Verbindung **30** Spektren bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Bei 40° C (Abbildung 4.4 a) zeigt sich der Peak bei $\delta = 7,9$ noch als breites Singulett, das zwei Protonen entspricht. Erst bei 70°C (Abbildung 4.4 c) kann ein deutliches AA'BB'-System erkannt werden, das für eine nahezu ungehinderte Rotation spricht.

Einfluss der Etherspaltung auf das Spektrum:

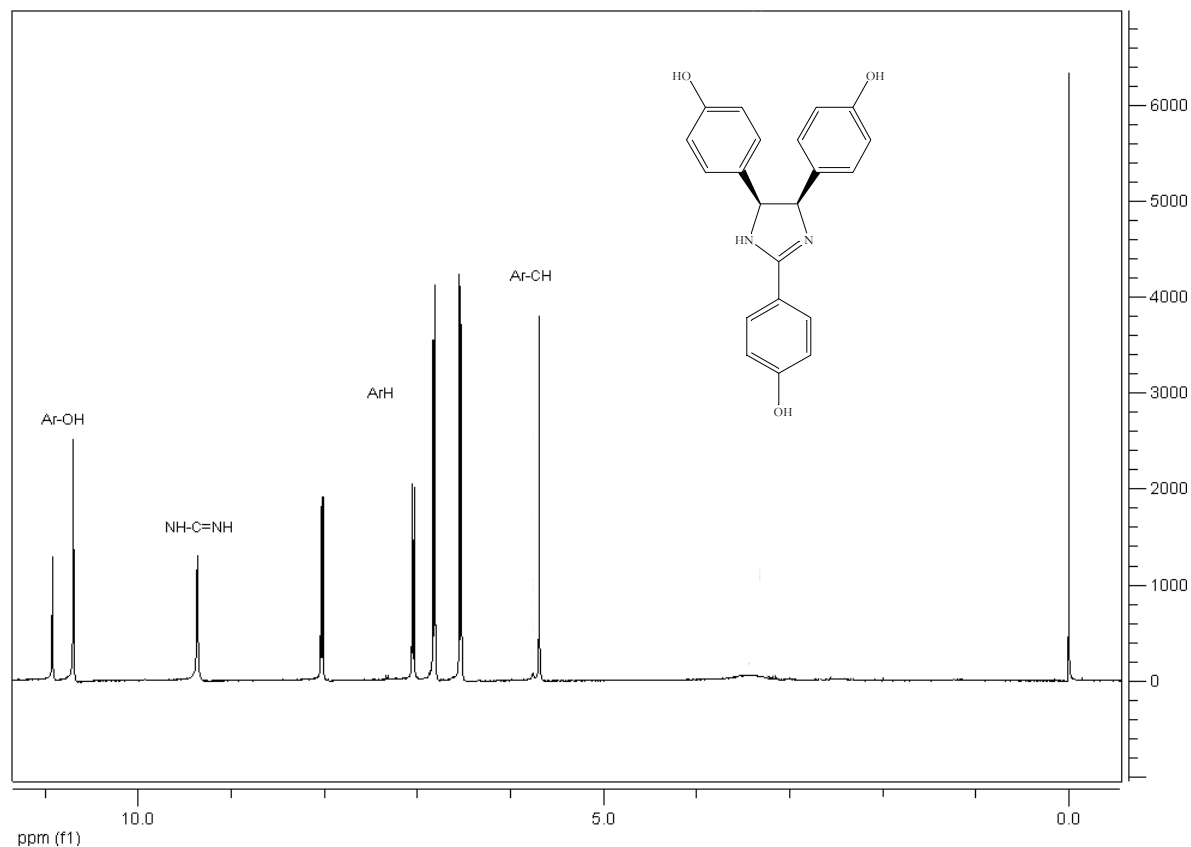


Abbildung 4.5: (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol (**8**) in dmsO-d₆

Die Etherspaltung hat nur geringen Einfluss auf die Lage der Signale im Spektrum (Vergl. 4.1 mit 4.7). Die Signale der OH-Gruppen des 2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazols **8** finden sich bei tiefem Feld ($\delta = 10,8$ und $11,0$).

Die benzylichen Protonen erzeugen im Vergleich zu Verbindung **6** ein Signal bei tieferem Feld. Diese Effekte resultieren aus der Protonierung des Heterozyklus in Fall von **8** (die Protonierung ist erkennbar am Signal der Amidgruppe bei 9,6 ppm mit einem Integral, das der Zahl von zwei Protonen entspricht).

Wird **8** in die freie Base übergeführt, sind die benzylichen Protonen bei $\delta = 5,69$ [53] lokalisiert, was gegenüber **6** einer Verschiebung von 0.44 ppm entspricht.

Einfluss der Alkylierung des Sauerstoffes in Position 4 des Aromaten an Position 5 des Dihydroimidazols:

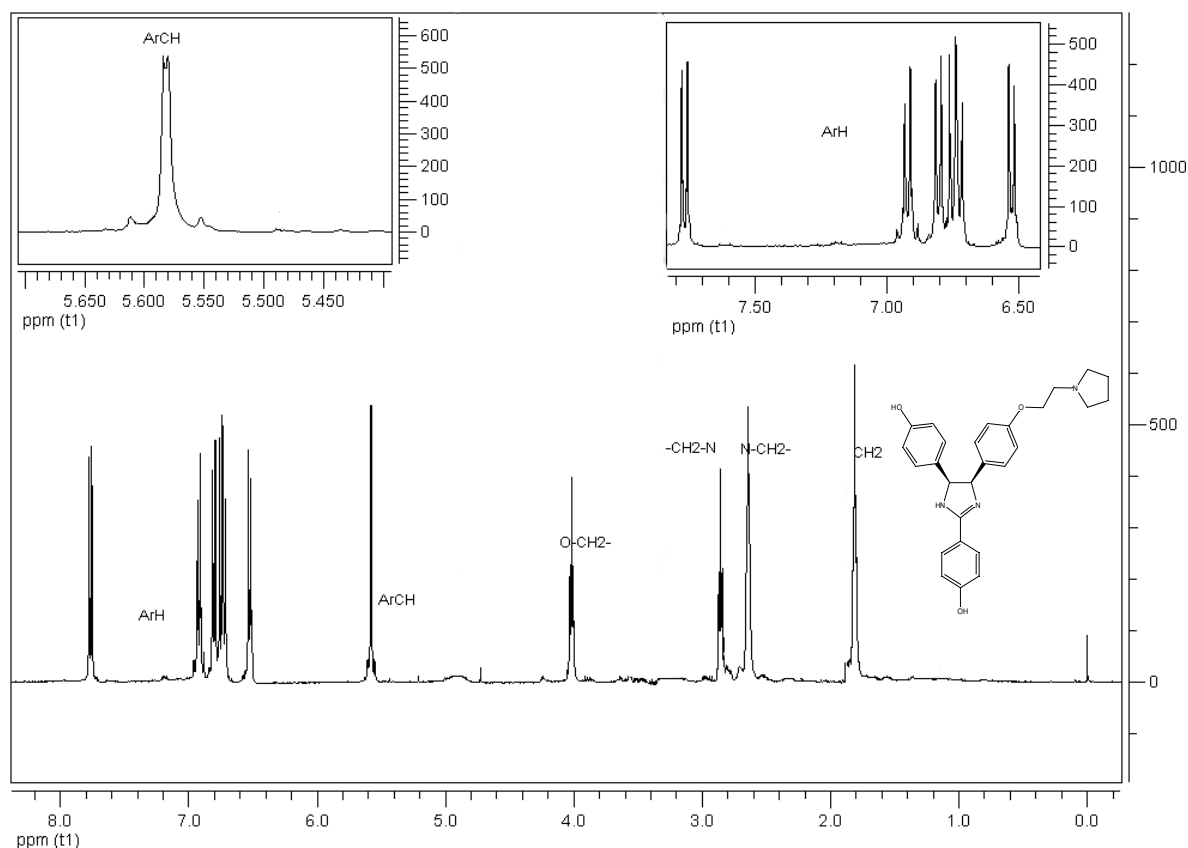


Abbildung 4.6: Spektrum des (4R,5S)/(4S,5R)-2,4-Bis(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyrrolidinylethoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazols **35**

Das Pyrrolidinylethoxyphenyl-Derivat **35** stellt ein unsymmetrisches Molekül dar, wie aus dem ¹H-Spektrum zu entnehmen ist. Damit ist auch die Alkylierung eines der beiden 4,5-ständigen Aromaten bestätigt (siehe Abbildung 4.6 und 4.7).

Die basische Seitenkette erzeugt Signale bei $\delta = 2,88$ und $4,06$. Die Aromaten an C2 und C4 sind nahezu unbeeinflusst, während der Pyrrolidinylethoxyphenylring Signale bei $\delta = 1,85$ und $2,68$ erzeugt.

Die benzylichen Protonen spalten in ein AB-System ($\delta = 5,56$ und $5,60$, siehe aufgespreitetes Spektrum in Abbildung 4.6 oben) mit einer Kopplungskonstanten von $11,03$ Hz auf, die etwas höher liegt als bei der einfach N-alkylierten Verbindungen (**26**; $^3J = 10,8$ Hz). Im Vergleich zu **26** ist die chemische Umgebung der Methinprotonen deutlich geringer ausgeprägt ($\Delta\delta = 5,72$ und $\Delta\delta = 5$ bei Verbindung **26**).

Einfluss der O'-Alkylierung des Aromaten in Position 2 des 4,5-Dihydro-1H-imidazolringes:

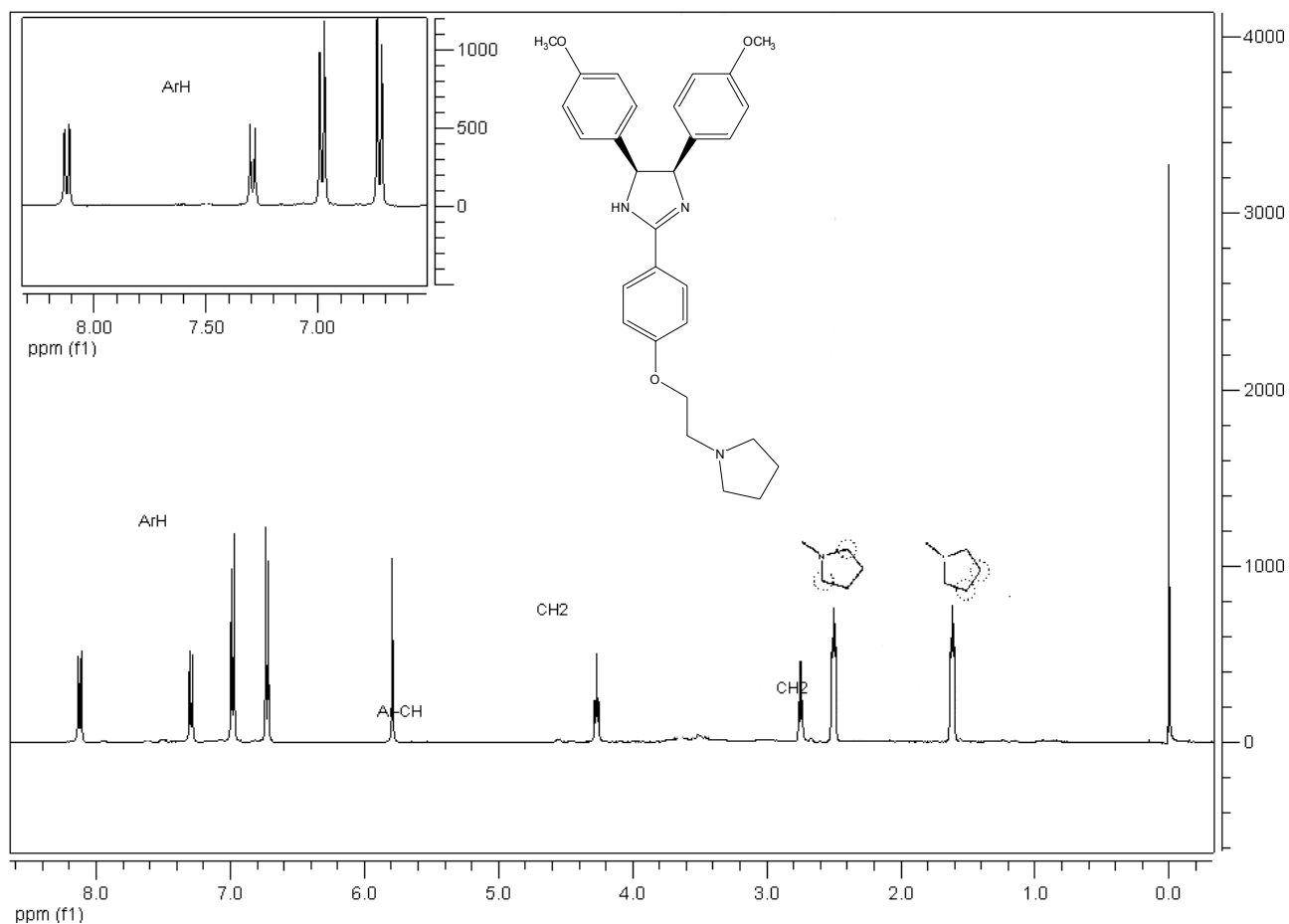


Abbildung 4.7: (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-(4-pyrrolidinylethoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol 37

Wird die basische Seitenkette an die OH-Gruppe des C2-ständigen Aromaten von **8** substituiert, bleibt der symmetrische Charakter des Moleküls erhalten. Die Protonen der Aromaten in C4/C5 ergeben wieder identische Signalgruppen und die benzylicischen Protonen spalten nicht auf. Gegenüber dem nicht alkylierten 4,5-Dihydro-1H-imidazol **8** sind die Signale nicht signifikant verschoben. Nur die Protonen des C2-Aromaten erfahren eine leichten Tieffeldshift von ~ 0,3 ppm im Vergleich zu **8**.

4.1.2 Massenspektroskopie

Die Massenspektroskopie basiert auf dem charakteristischen Verhalten von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld. Die jeweiligen Substanzen werden ionisiert und nach ihrer Masse im elektrischen Feld getrennt. Das Zerfallsmuster der Moleküle ist charakteristisch und bietet daher die Möglichkeit der Strukturaufklärung.

Abbildung 4.8 zeigt das Massenspektrum von Verbindung **6**. Anhand dieses Beispiels können die Fragmentationen von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen beschrieben werden.

Kennzeichnend für viele 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole sind die drei Fragmente, die bei Verbindung **6** den Massen 280, 253 und 238 g/mol entsprechen. Diese Fragmente bilden deshalb die Grundlage der Identifizierung aller Triaryl-4,5-dihydroimidazole. Die entsprechenden Reaktionen sind bekannt [35].

Alle Spektren der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Elektronenstoßionisation aufgenommen. Unter diesen Bedingungen scheint auch eine Oxidation zum 2,4,5-Triarylimidazol aufzutreten. Bei nicht N-alkylierten Verbindungen ist diese Oxidation nur in geringem Ausmasse zu erkennen (Molekülfragment mit der Masse 386 g/mol und 2,81 % rel. Intensität, siehe Abbildung 4.8). Je höher der Grad der N-Alkylierung, desto besser ist das 2,4,5-Triarylimidazol im Spektrum zu erkennen. Aus diesem bildet sich das 4,5-Diarylimidazol ($M_r = 280,1$ g/mol, rel. Int. = 1,1%, Abbildung 4.8). Auch dieses Fragment ist mit steigender N-Alkylierung besser zu erkennen.

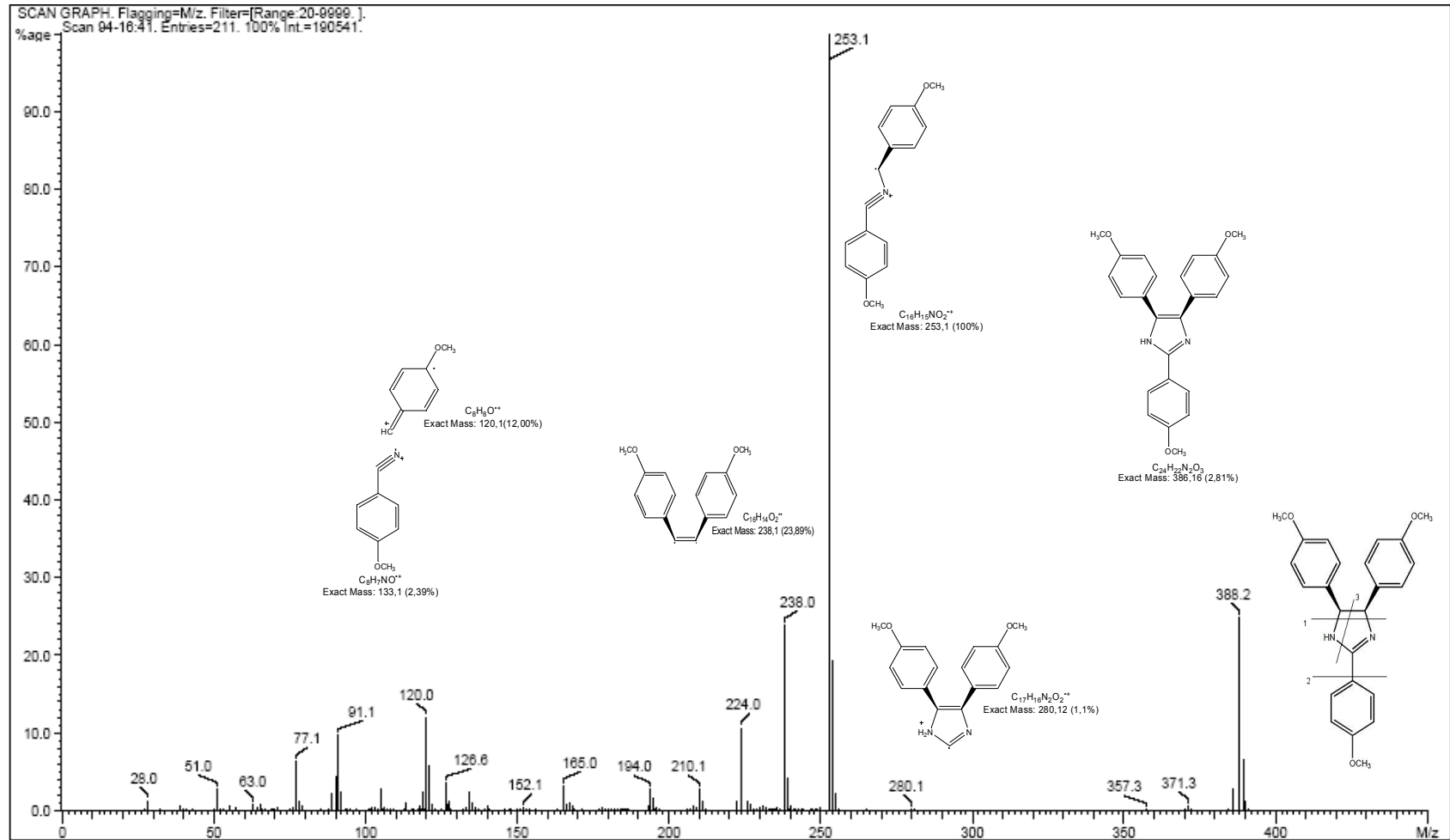


Abbildung 4.8: Fragmentationsschema von Verbindung 6

Kapitel 4.2 Untersuchungen zur Stabilität

Es ist bekannt, dass 4,5-Dihydro-1H-imidazole sowohl im Sauren als auch im basischen hydrolysieren können, da sie zyklische Amidine darstellen [12, 14, 36]. Deshalb wurde eine Verbindung exemplarisch bestimmten Abbaubedingungen unterworfen.

Aus der Literatur ist folgendes bekannt:

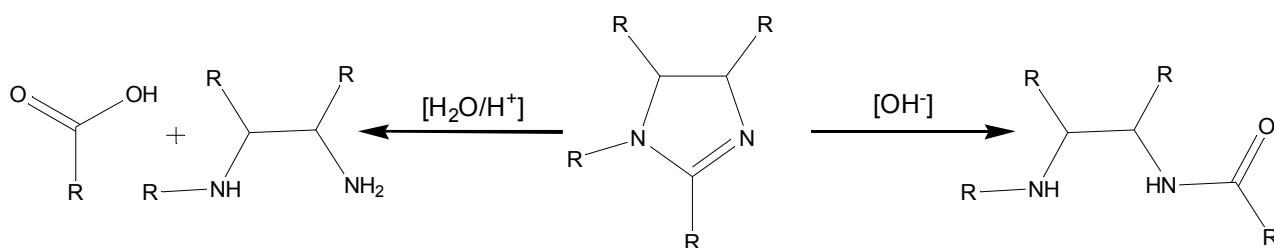


Abbildung 4.10 Hydrolyse von 4,5-Dihydroimidazolen [36]

Die alkalische Hydrolyse eines Dihydroimidazols erfolgt, nachdem ein Hydroxidion nukleophil am C2 des 4,5-Dihydroimidazolringes angreift. Es entsteht zunächst ein Zwischenprodukt mit Halbacetalstruktur, das im darauf folgenden Schritt zum Amid geöffnet wird. Dabei kann die Amidpartialstruktur durch N1 oder N3 gebildet werden.

Bei der sauren Hydrolyse fungiert ein Wassermolekül als Nukleophil. Diese Hydrolyse kann laut Literatur [12,36] nur in stark saurem Milieu bei erhöhter Temperatur beobachtet werden und setzt sich über das Amid als Zwischenstufe bis zur Carbonsäure und dem Diamin fort.

Die Einführung eines Aromaten in Position 2 des 4,5-Dihydroimidazolringes sollte den Grundkörper durch seine -I/+M – Effekte stabilisieren. Um dies zu überprüfen, wurde das 4,5-Dihydro-1H-imidazol **3** in der ausgewählten Konzentration (10 mmol/L) in 0,1 N HCl oder 0,1 N NaOH und PBS suspendiert und für 24, 48 und 72 h bei Raumtemperatur gerührt.

Dieses 4,5-Dihydroimidazol wurde für die Stabilitätsprüfung ausgewählt, weil es sich in der Zytotoxizitätsprüfung als wirksam erwies. Es sollte also geprüft werden, ob das 4,5-Dihydroimidazol diese Wirkungen verursacht und nicht etwa sein Hydrolyseprodukt.

Zu den entsprechenden Zeitpunkten (24,38 und 72 h) wurde die Lösung über Dünnschichtchromatographie untersucht. Zeigte sich ein zweiter Substanzfleck, so wurde der Ansatz einrotiert und das resultierende Gemisch per Säulenchromatographie getrennt. Dabei sollten die verschiedenen Hydrolyseprodukte analysiert werden und ihr prozentualer Anteil bestimmt werden.

Für das untersuchte 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazol (3) ergab sich:

Nach 24 Stunden war in keinem der Ansätze eine Zersetzung zu sehen. Nach 48 Stunden verfärbte sich die 0,1 N NaOH-Lösung leicht. Nach dünnschichtchromatographischer Auswertung war kein zweiter Substanzfleck zu sehen. Nach 72 h jedoch war die Lösung bräunlich verfärbt und es zeigte sich im Dünnschichtchromatogramm ein zweiter Substanzfleck. Die Trennung des Gemisches per Säulenchromatographie ergab, dass immer noch zu 78 % das ursprüngliche 4,5-Dihydroimidazol vorhanden war. Als Abbauprodukt ließ sich als Triarylimidazol identifizieren. Die Auswertung erfolgte über NMR – Spektroskopie. Das garantiert eine Nachweisgrenze von 5 -10% und wurde für diese Arbeit als ausreichend betrachtet.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Triaryl-4,5-dihydroimidazole stabil genug sind, um als Arzneistoffe eingesetzt zu werden. Die Einführung eines dritten Aromaten erwies sich also, wie bereits vermutet, als stabilitätsfördernd.

Der bevorzugte Abbau war also nicht eine hydrolytische Öffnung des Heterozyklus, sondern eine Oxidation zum Imidazol. Es kann also angenommen werden, dass die 4,5-Dihydroimidazole auch unter physiologischen Bedingungen Hydrolyse-unempfindlich sind und als Wirkform zu betrachten sind.

5 Pharmakologische Testergebnisse

5.1 Allgemeines - Testungen von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen

5.1.1 Agonismus und Antagonismus am Estrogenrezeptor

5.1.1.1 Agonismus

MCF7-2a Zellen (Beschreibung siehe 5.1.3) werden unter Standardbedingungen kultiviert und mit Lösungen der zu untersuchenden Substanzen im Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-5} M inkubiert. Eine Lösung von Estradiol (im Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-13} M) dient dabei als Positivkontrolle. Für die Negativkontrolle wird das entsprechende Lösemittel verwendet. Binden die Substanzen an den ER, kommt es zur Dimerisierung des ER $_{\alpha}$. Dieses Rezeptordimer bindet an das ERE des Reporterplasmids, wodurch es zur Luciferaseexpression kommt. Am Ende des Versuchs (nach 48h) wird die Luciferase-Aktivität (in RLU = relative light units) bestimmt. Durch Korrelation mit der Zellmasse (bestimmt im Kristallviolett-Assay) kann schließlich die relative Aktivierung des Estrogenrezeptors (unter Berücksichtigung von Positiv- und Negativkontrolle) berechnet werden. Die für die untersuchten Verbindungen erhaltenen Graphen befinden sich -soweit bei der Diskussion der einzelnen Verbindungen nicht gezeigt- im Anhang II.

5.1.1.2 Antagonismus

Die Untersuchung auf Antagonismus verläuft analog der Beschreibung unter 5.1.1.1, jedoch unter gleichzeitiger Inkubation eines potentiellen Antagonisten (in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-5} M) mit Estradiol in einer Konzentration von 10^{-9} M. Antagonistisch wirksame Substanzen hemmen die E2-vermittelte Luciferase-Expression, was in einer Abnahme der RLU dokumentiert werden kann.

5.1.2 Zytotoxizität

Zur Beurteilung der zytotoxischen Wirkung einer Verbindung wird ein Testsystem verwendet, das sich in drei Versuche unterteilen lässt:

- Die Zweipunktbestimmung, in der ein Screening zur Vorauswahl durchgeführt wird. Verwendet werden Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-5}$ M und $2 \cdot 10^{-5}$ M.
- Der zeitabhängige Zytotoxizitätstest, bei dem die Substanzeffekte über einen längeren Zeitraum (bis zu 144 Stunden) quantifiziert werden. Dieser Test erlaubt Aussagen zum Wirkungseintritt und der Entwicklung möglicher Resistenzen gegenüber den Verbindungen im Laufe der Inkubation.
- Bestimmung des IC_{50} -Wertes, der einen Vergleich der Zytotoxizität verschiedener Substanzen erlaubt.

5.1.2.1 Zweipunktbestimmung

Die Zellen werden 48 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgt der Wechsel zu substanzhaltigem Medium ($1 \cdot 10^{-5}$ M und $2 \cdot 10^{-5}$ M) und es wird weitere 96 Stunden inkubiert. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen gewaschen, das Chromatin mit Kristallviolett angefärbt und mit Glutardialdehyd fixiert. Nach Lösen des gebundenen Farbstoffes in Ethanol wird dieser photometrisch quantifiziert. Die Messwerte korrelieren mit der Zellmasse und geben somit Auskunft über den Einfluss der Substanzen auf das Zellwachstum.

Durch Korrelation mit der Negativkontrolle (Lösungsmittel, hier dms0) kann die relative prozentuale Wachstumshemmung (T/C_{corr} [%]) berechnet werden:

$$T/C_{\text{corr}} [\%] = [(T-C_0)/(C-C_0)] \times 100$$

Die Hemmung des Zellwachstums wird folgendermaßen beurteilt:

1. $T/C_{\text{corr}} > 80 \%$ keine proliferative Wirkung
2. $T/C_{\text{corr}} < 80 \%$ antiproliferative Wirkung
3. T/C_{corr} 20-0% zytostatische Wirkung
4. $T/C_{\text{corr}} < 0\%$ zytozide Wirkung

Zur Berechnung der zytoziden Wirkung wird die Zellmasse der Testverbindung (T) nicht auf die Kontrolle (C) sondern nur auf die initiale Zellmasse C_0 bezogen:

$$T/C_{\text{corr}} [\%] = [(T-C_0)/C_0] \times 100$$

Lag der T/C_{corr} Wert bei einer Konzentration von 10 μ M unter 50%, wurde von dieser Verbindung die zeitabhängige Zytotoxizität bestimmt. Verwendet werden die hormonabhängige MCF7 Zelllinie, die hormonunabhängige MDA-MB 231 Zelllinie und die Kolonkarzinomzelllinie HT29 (siehe 5.1.3)

5.1.2.2 Zeitabhängige Bestimmung der Zytotoxizität

Die Zellen werden -wie unter 5.1.2.1 beschrieben- kultiviert und dann mit der Substanz über (einen im Vergleich zur Zweipunktbestimmung) größeren Konzentrationsbereich (meist 0,63 μM bis 10 μM , in seltenen Fällen 1,25 bis 20 μM) weiter inkubiert. Nach jeweils 48, 72, 96, 120, 144 h wird das Zellwachstum abgestoppt und das Chromatin mit Kristallviolett angefärbt. Aus der Korrelation T/C_{corr} [%] gegen Zeit (h) ergeben sich dann aussagekräftige Zeit-Wirkungskurven.

Verwendet werden für diesen Versuch ausschließlich MCF-7 Zellen. Die genaue Versuchsvorschrift findet sich in Kapitel 6; die Schaubilder, soweit bei der Diskussion der Verbindungen nicht gezeigt, in Anlage II.

5.1.2.3 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Die Zellen werden wie unter 5.1.2.2 kultiviert und nach 48h mit 5 oder 6 verschiedenen Konzentrationen an Substanz für 96h weiter inkubiert. Die Quantifizierung der Zellzahl erfolgt wie bereits beschrieben. Als Lösungsmittel dient dmsO, als Positivkontrolle wird routinemäßig CDDP verwendet. Wie in der zeitabhängigen Bestimmung der Zytotoxizität wird der IC_{50} -Wert an MCF7-Zelllinien bestimmt.

Die Auswahl des Konzentrationsbereiches und der Anzahl der Konzentrationen erfolgt nach den Ergebnissen des zeitabhängigen Zytotoxizitätstests (5.1.2.2). Sind die dort verwendeten Konzentrationen bereits optimal gewählt, erfolgt daraus die Berechnung der IC_{50} -Werte.

Die genaue Versuchsvorschrift findet sich in Kapitel 6; die Schaubilder, soweit bei der Diskussion der Verbindungen nicht gezeigt, in Anlage II.

5.1.2.4 Veränderungen der Zellmorphologie

Bei in dieser Arbeit vorgestellten hoch zytotoxischen Verbindungen ist sehr oft zu beobachten, dass bereits nach 48h das Maximum der Wirkung erreicht ist. In diesen Fällen kann versucht werden, das Messintervall zu verkürzen, jedoch ist die Aussagekraft deswegen nicht unbedingt erhöht.

Sinnvoller ist deshalb eine visuelle Beurteilung der Zellmorphologie. Dazu werden MCF7 - Zellen ausgesät, charakteristische Zellgruppen markiert und in Zeitabständen von 0, 12, 16, 24 und 48 h nach der Substanzzugabe photographisch dokumentiert.

5.1.3 Verwendete Zelllinien

5.1.3.1 *hormonabhängige Mammakarzinomzellen (MCF7)*

Die MCF7-Zelllinie stammt aus dem malignen Pleuraerguss einer 69 Jahre alten Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom und wurde in den 1970er Jahren isoliert [37]. Zuvor war die Patientin mit Strahlentherapie und Hormontherapie vorbehandelt worden. Diese Zelllinie zeichnet sich durch einen relativ hohen Differenzierungsgrad aus. Dieser Zelltypus weist einen hohen Gehalt an ER α (70 - 90 fmol / mg Protein) auf und gilt somit als hormonabhängig [1].

5.1.3.2 *hormonunabhängige Mammakarzinomzellen (MDA-MB 231)*

Die MDA-MB 231 Zellen stammen ebenfalls von einer Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom aus den 1970er Jahren. Auch diese Patientin wurde mit Strahlentherapie vorbehandelt. Charakteristisch ist das Fehlen von Estrogen- und Progesteronrezeptoren, so dass diese Zelllinie als hormonunabhängig angesehen wird [38]. Die Generationszeit der MDA-MB 231 Zelllinie liegt unter der der MCF7 - Zelllinie.

5.1.3.3 *Kolonkarzinomzellen (HT29)*

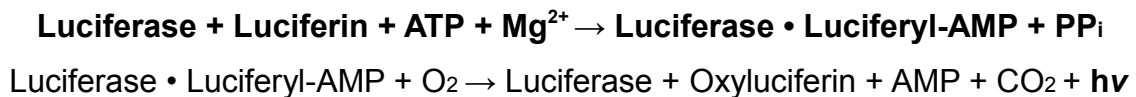
Diese Zelllinie entstammt einem humanem Kolonkarzinom und somit einer der häufigsten Krebsarten. Der Ursprung dieses Zelltypus ist unbekannt, stammt aber wahrscheinlich ebenfalls aus den 1970er Jahren, da Charakteristiken dieser Zelllinie erstmals 1975 [39] beschrieben wurden. Diese Zellen sind undifferenziert und wachsen schnell.

5.1.3.4 *Reporterplasmid-transfizierte MCF7 Zellen (MCF7-2a)*

MCF7-2a Zellen wurden aus den bekannten MCF7 Zellen erhalten, indem man diese ER α -haltigen Zellen mit einem Reporterplasmid, dem ERE_{wtc}Luc stabil transfizierte. Das Plasmid codiert für Luciferase und enthält als Enhancersequenz das ERE der DNA [40].

Die Methode zeichnet sich im Vergleich zu Wettbewerbsassays mit radioaktiv markierten Substanzen durch eine höhere Selektivität und eine ungefährlichere Handhabung aus. In der vorliegenden Arbeit wurde die hormonabhängig gebildete Luciferase mittels Luciferin des amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* [41] quantifiziert.

Zunächst reagiert das Substrat Luciferin mit Mg^{2+} und ATP zu Luciferyl-Adenylat. Das Luciferyl-Adenylat wird daraufhin durch molekularen Sauerstoff oxidiert; dabei entstehen als Zwischenprodukte ein zyklisches Peroxid (das Peroxyluciferin) mit Dioxetanonpartialstruktur und ein Molekül AMP. Das Dioxetanon wird im Folgenden durch eine intramolekulare Umstrukturierung decarboxyliert; daraus resultiert eine Enol- oder Ketoform des Oxiluciferin, die sich in einem elektronisch angeregten Zustand befindet. Der Übergang des angeregten Oxiluciferin zum energetischen Grundzustand ist mit Lichtemission der Wellenlänge 560-562 nm verbunden [41]:



Damit kann mit MCF7-2a Zellen eine Bindung an $ER\alpha$ nachgewiesen werden. Die Stärke der Lichtemission bei einer bestimmten Konzentration gibt direkt Auskunft über die estrogenen Potenz der jeweiligen Verbindung, die mit der estrogenen Wirkung an juvenilen Mäusen korreliert. Als Positiv-Vergleich dient Estradiol [1, 51].

5.2 Diskussion der Testergebnisse:

5.2.1 Agonismus und Antagonismus am Estrogenrezeptor

5.2.1.1 Allgemeines

Estrogene sind Hormone, die eine breite Vielfalt von Wirkungen im Körper entfalten. Eine ihrer Hauptwirkungen ist die Proliferation von geschlechtsspezifischen Geweben [7]. Das Wachstum von Neoplasien dieser Gewebe kann deshalb durch Estrogene gefördert werden.

Die Auswahl der getesteten Substanzen erfolgte aufgrund theoretischer Vorüberlegungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen in Bezug auf die Grundbedingungen zur estrogenen Wirkung (siehe Kapitel 1). Gleichzeitig sollte auch die Art des Substitutionsmusters der Aromaten und von N-Alkylketten an (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen auf die Rezeptoraktivierung untersucht werden.

Es gelten folgende allgemein anerkannte Bedingungen: Ein lipophiler Kern bildet das Grundgerüst, um zwei essentielle OH-Gruppen in einem passenden Abstand voneinander zu halten.

So genannte klassische (Typ I-) Estrogene benötigen einen O-O-Abstand von 12 Å. Der lipophile Kern des Moleküls sollte dabei relativ planar sein. In den vergangenen Jahren wurden jedoch Moleküle gefunden, die dieser klassischen Definition nicht unterliegen. So begann man, estrogen wirksame Moleküle in Typ I – und Typ II– Estrogene zu unterteilen (Vergleiche Kapitel 1).

Typ II– Estrogene sind gewinkelte Moleküle und besitzen außerdem einen geringeren Abstand zwischen den Hydroxygruppen. Dazu gehören 4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazole [12,14,35] die in vorhergehenden Arbeiten bereits eingehend untersucht wurden. Die in dieser Arbeit synthetisierten 2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazole können aufgrund der möglichen Orientierung der OH-Gruppen (Abb. 5.1) sowohl den Typ I- als auch den Typ II-Estrogenen zugeordnet werden.

Verbindung **26** wurde dreidimensional dargestellt, mittels MM2 energieminiert und der Abstand zwischen den einzelnen Hydroxygruppen berechnet (Abbildung 5.1).

Einerseits kann man einen O-O-Abstand berechnen, der zwischen 11,92 und 12,06 Å liegt, also einem klassischen Typ-I Estrogen entspricht. Zum anderen ist das Molekül stark gewinkelt und der Abstand zwischen den OH – Gruppen der Aromaten in Position 4 und 5 am Dihydroimidazol-Grundgerüst beträgt, laut Berechnungen, 6,13 Å, also Kriterien für ein Estrogen vom Typ II.

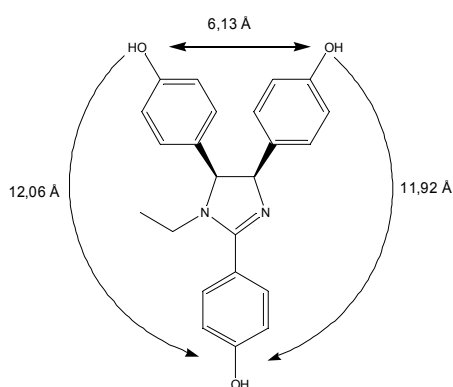
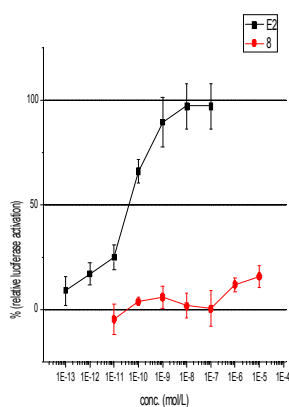
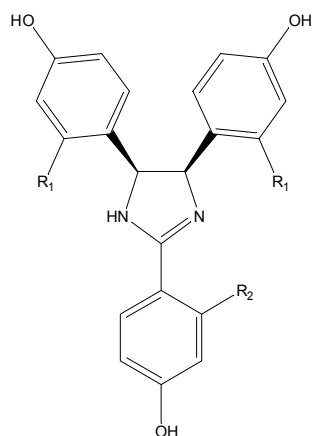


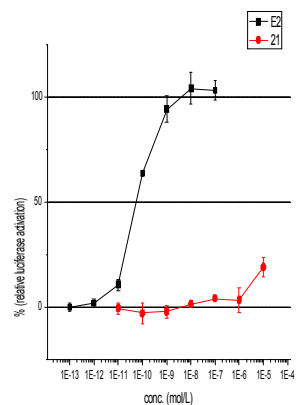
Abbildung 5.1: Abstände zwischen den Hydroxy-Gruppen (Verbindung 26)

Somit konnte erwartet werden, dass die (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazole entweder analog zu Typ-I oder Typ-II Estrogenen in der LBD interagieren. Neben dem O-O-Abstand sind -wie Studien am (4R/5S)/(4S,5R)-4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazol [12,14,35] zeigten- N-Alkylgruppen oder lipophile Substituenten in den Aromaten für eine Wirkungsverstärkung wichtig.

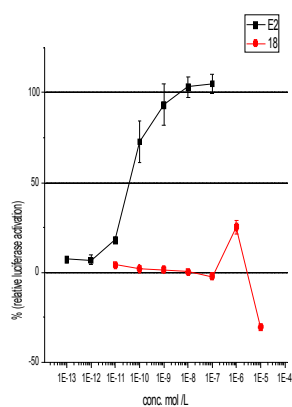
5.2.1.2: Einfluss der Substituenten in den Aromaten



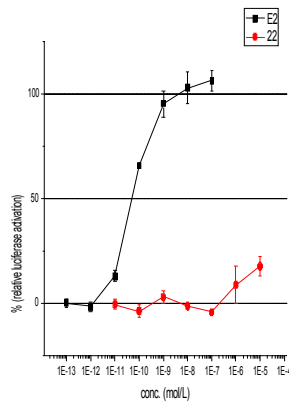
Verbindung 8
 $R_1 = R_2 = H$
 Aktivierung bei 10^{-5} M:
 $12,8 \pm 3,2\%$



Verbindung 21
 $R_1 = H$ $R_2 = F$
 Aktivierung bei 10^{-5} M:
 $17,5 \pm 4,5\%$



Verbindung 18
 $R_1 = R_2 = F$
 Aktivierung bei 10^{-5} M:
 $-30,5 \pm 0,3\%$



Verbindung 22:
 $R_1 = H$ $R_2 = Cl$
 Aktivierung bei 10^{-5} M:
 $13,8 \pm 0,6\%$

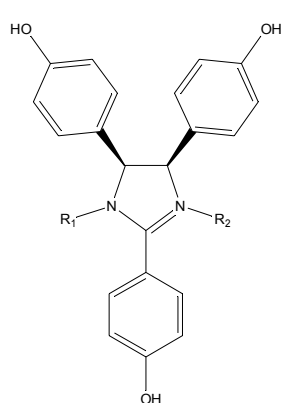
Abbildung 5.2: Estrogenität von halogenierten (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazolen

In vorherigen Arbeiten [12,14] hatte sich gezeigt, dass eine ortho-Halogenierung der Aromaten vorteilhaft für die Estrogenität ist.

Das (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazol **8** ist nahezu hormonell inaktiv. Ein F-

Substituent im C2-Arylring (Verbindung **21**) erhöht die Genaktivierung nur geringfügig ($1 \cdot 10^{-5}$ M: 17,5% Aktivierung). Dieser Effekt wird bei zusätzlicher 2-F-Substitution in den 4,5-ständigen Aromaten (**18**) schon in einer Konzentration von 10^{-6} M ($25,1 \pm 4,1\%$ Aktivierung) erzielt. In höheren Konzentrationen bewirkt **18** starke negative Aktivierung, die auf eine reduzierte Zellzahl und damit auf Zytotoxizität der Verbindung zurückzuführen ist (Zeitabhängiger Zytotoxizitätstest siehe Anhang I und Kapitel 5.3). Wird Fluor gegen Chlor im C2-Aromaten ausgetauscht (Verbindung **21** → Verbindung **22**), ergibt sich keine signifikante Erhöhung der estrogenen Wirkung.

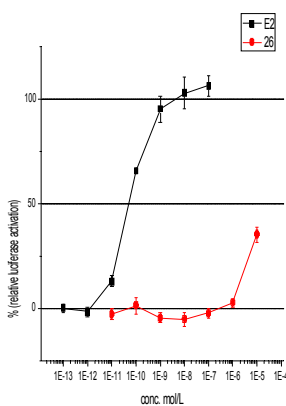
5.2.1.3 Einfluss der N-Alkylierung



Verbindung 8

$R_1 = H$
 $R_2 = \text{---}$

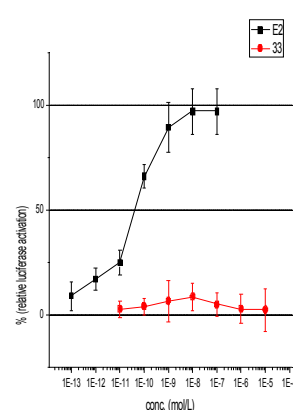
Aktivierung bei 10^{-5} M : $12,8 \pm 3,2\%$



Verbindung 26

$R_1 = C_2H_5$
 $R_2 = \text{---}$

Aktivierung bei 10^{-5} M: $26,8 \pm 2,9\%$



Verbindung 33

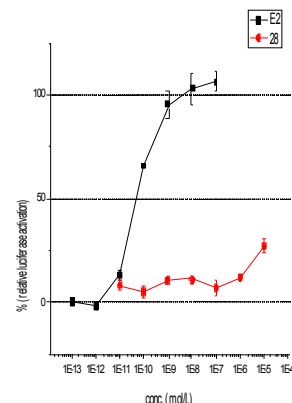
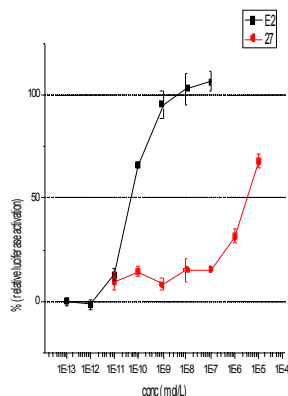
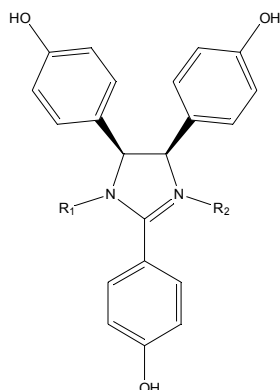
$R_1 = C_2H_5$
 $R_2 = C_2H_5$

keine Aktivierung bei 10^{-5} M

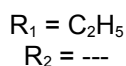
Abbildung 5.3: Einfluss der N-Alkylierung auf die Estrogenität von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazolen

Nachdem die Halogenierung der Aromaten nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde versucht, durch N-Alkylierung die ER-Interaktion zu erhöhen. Tatsächlich konnte für die N-Ethyl Verbindung **26** in der höchsten Konzentration von 10^{-5} M eine Aktivierung von 26,8% festgestellt werden.

Wird an Position N1 und N3 alkyliert (Verbindung **33**) geht die estrogenen Wirkung vollständig verloren. Es muss jedoch erwähnt werden, dass **33** im Gegensatz zu **8** und **26** ein permanentes Kation darstellt.

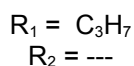


Verbindung 26



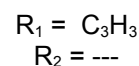
Aktivierung bei 10^{-5} M:
26,8% ± 2,9%

Verbindung 27



Aktivierung bei 10^{-5} M:
68% ± 0,9%
 $EC_{50} = 1,5 \cdot 10^{-6}$ M

Verbindung 28



Aktivierung bei 10^{-5} M:
35 % ± 1,7%

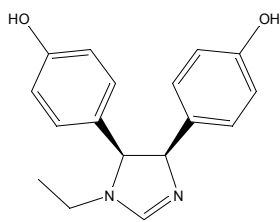
Abbildung 5.4: Einfluss der Kettenlänge auf die Estrogenität

Die Verlängerung der Alkylkette an Position N1 um eine Methylen-Gruppe (**26** → **27**) hat eine deutliche Steigerung der estrogenen Aktivität zur Folge. Die Aktivierung steigt von 27% auf 68%. Für Verbindung 27 errechnet sich ein EC_{50} -Wert von $1,5 \cdot 10^{-6}$ M.

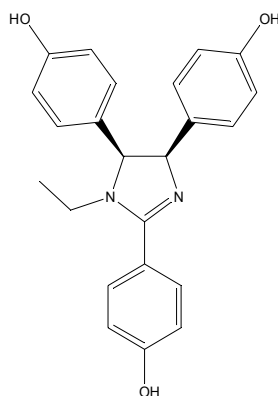
Führt man in die Propylkette eine Dreifachbindung ein (**27** → **28**), sollte sich der hydrophobe Charakter des Moleküls erhöhen und die Wechselwirkung in der Bindungstasche verstärkt werden. Es zeigte sich aber, dass **28** deutlich schlechter wirksam ist. Dies kann auf die eingeschränkte Flexibilität der Propargylgruppe (im Vergleich zur Propylgruppe) und damit auf eine schlechtere Einpassung in die Bindungstasche zurückzuführen sein.

Vergleicht man Verbindung **26** mit dem analogen (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-1-ethylimidazol **MR 85** [4,19] (Abbild, so lässt sich erkennen, dass für die Wirkungssteigerung in hohen Konzentrationen (10^{-5} mol/L) der C2-Arylring verantwortlich sein muss (vergleiche Abbildung 5.5). **MR 85** zeigt in allen getesteten Konzentrationen keine estrogenen Aktivität.

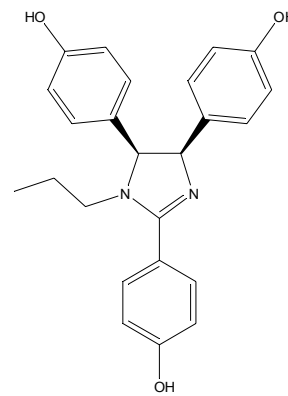
Es sollte erwähnt werden, dass die hier diskutierten Effekte zwar reproduzierbar sind, es sich aber nur um sehr schwache Genaktivierungen handelt.



MR 85
Estrogene Aktivierung bei 10^{-5} M
-4%



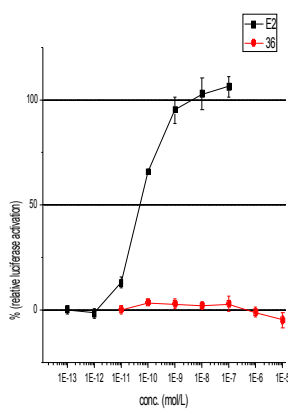
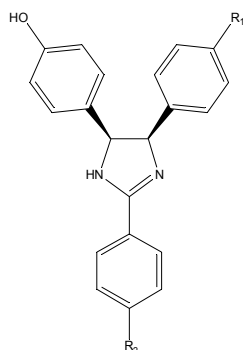
Verbindung 26
Estrogene Aktivierung bei 10^{-5} M
2%



Verbindung 27
Estrogene Aktivierung bei 10^{-5} M
31%

Abbildung 5.5: Vergleich von Diaryl-4,5-dihydroimidazol MR85 mit 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen

5.2.1.4 Einfluss von basischen Seitenketten auf phenolische (4R/5S),(4S/5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole

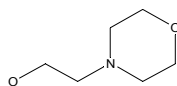


$R_1 = R_2 = OH$

Verbindung 8

Leichte estrogene Aktivierung
bei 10^{-5} M : $12,8 \pm 3,2\%$

$R_1 =$



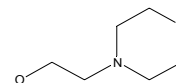
$R_2 = OH$

Verbindung 36

keine estrogene Aktivierung
keine antiestrogene Wirkung

$R_1 = OH$

$R_2 =$



Verbindung 39

leichte estrogene Aktivierung bei
 10^{-5} M : $24,5 \pm 0,2\%$
keine antiestrogene Wirkung

Abbildung 5.6: Einfluss der Position einer basischen Seitenkette auf die Estrogenität

In einem weiteren Schritt wurde in die Verbindungen eine basische Seitenkette eingeführt.

Bindet man einen N-Ethylmorpholino-Rest an den Sauerstoff des C5-ständigen Aromaten des (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazols (Verbindung **36**), geht die geringfügige Aktivierung von Verbindung **8** verloren.

Wird hingegen die basische Seitenkette in den Aromaten an Position 2 des 4,5-Dihydroimidazols eingeführt (Verbindung **39**), so ergibt sich eine vergleichbare estrogene Aktivierung wie bei Verbindung **8**.

Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die 4-Hydroxygruppe in den 4,5-ständigen Aromaten des 4,5-Dihydroimidazols essentiell für die estrogene Aktivität ist. Demzufolge können die (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole als Typ II Estrogene klassifiziert werden. Für eine genaue Aussage sind aber weitere Untersuchungen unerlässlich.

	Verbindung 8	Verbindung 35
	$R_1 = R_2 = \text{OH}$ Aktivierung bei 10^{-6} M: $12,8 \pm 3,2\%$ keine antiestrogene Wirkung nachweisbar	$R_1 =$ $R_2 = \text{OH}$ keine Aktivierung bei 10^{-6} M keine antiestrogene Wirkung nachweisbar
Verbindung 36	Verbindung 38	Verbindung 39
$R_1 =$ $R_2 = \text{OH}$ keine Aktivierung bei 10^{-6} M keine antiestrogene Wirkung nachweisbar	$R_1 = \text{OH}$ $R_2 =$ Aktivierung bei 10^{-6} M: $8,9 \pm 1,3\%$ keine antiestrogene Wirkung nachweisbar	$R_1 = \text{OH}$ $R_2 =$ Aktivierung bei 10^{-6} M: $9,6 \pm 2,8\%$ keine antiestrogene Wirkung nachweisbar

Abbildung 5.7: Einfluss von verschiedenen basischen Seitenketten auf Estrogenität und Antiestrogenität

Die Orientierung der Typ II- Estrogene in der LBD erfolgt ähnlich der SERM Tamoxifen und Raloxifen [24]. Die basische Seitenkette müsste deshalb für eine antagonistische Wirkung am C5-ständigen Aromaten von

8 lokalisiert sein. Dann ist eine essentielle Wechselwirkung mit der Aminosäure Asparaginsäure 352 in ER α möglich. Aus diesem Grund wurde neben einem Morpholin (**36**, **39**) auch Pyrrol (**35**, **38**) als basische Komponente eingesetzt. Eine Pyrrolidinylethylfunktion findet sich z.B. bei den selektiven Estrogenrezeptormodulatoren Ormeloxifen und Lasofoxifen.

Wie aus Abb. 5.19 ersichtlich wird, vermitteln die beiden Reste weder estrogenen noch antiestrogenen Wirkungen. Die Schaubilder finden sich in Anhang II. Deshalb wurde versucht, analog zu der Reihe **8**, **26** und **33** (siehe Abbildung 5.3) durch zusätzliche N-Alkyl-Reste die Wirkung, d.h. die Interaktionen in der LBD von ER α zu optimieren (vergleiche Abbildung 5.8). Leider führt auch diese strukturelle Modifikation nicht zum Ziel. Sowohl die N-Ethyl (**41**) als auch die N,N'-Diethyl-Verbindung (**42**) zeigten weder eine Aktivierung der Luciferaseexpression in MCF-7-2a Zellen, noch konnte der Effekt von E2 antagonisiert werden.

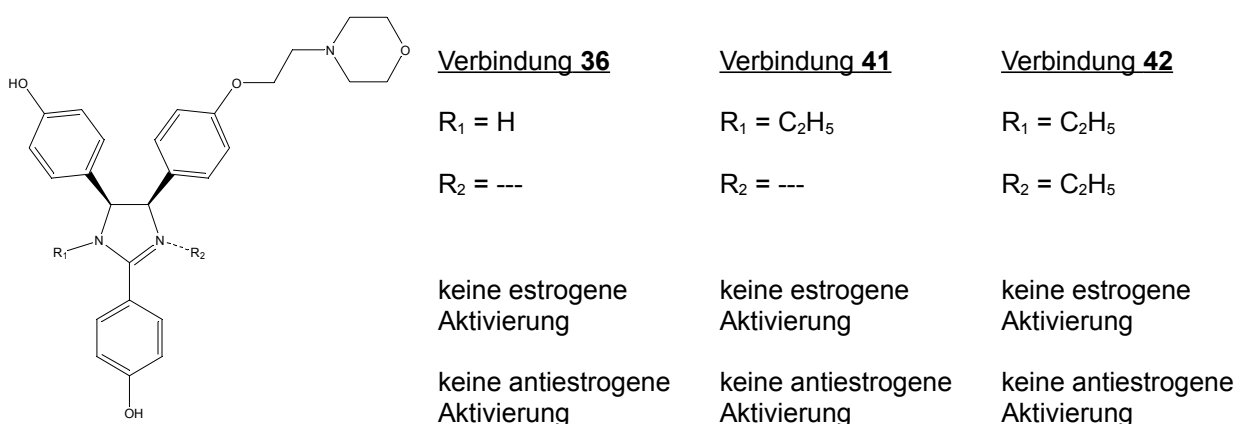


Abbildung 5.8: N-Alkylierte 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole mit basischen Seitenketten

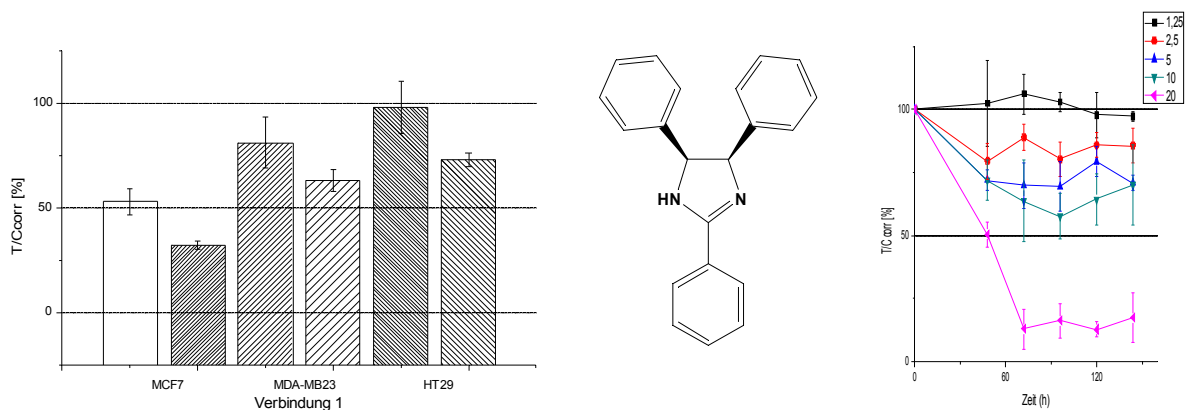
Eine Halogenierung der Aromaten der (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazole führt nicht zu einer signifikanten Steigerung der estrogenen Aktivität gegenüber der nicht halogenierten Verbindung **8**. Jedoch gelingt dies durch Alkylsubstitution des Stickstoffes N1. Durch basische Seitenketten konnten keine antagonistischen Effekte bewirkt werden. Generell sind die hormonellen Effekte an MCF-7-2a Zellen als gering einzustufen.

Wie bei den 4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazolen [14,35] ist der Einfluss des Substituenten an N1 (Verbindungen **26** - **28**) größer als die Bedeutung des Substituenten an C2 für die Estrogenität (vergleiche Aktivierung von Verbindung **8** gegenüber Verbindung **18** und **19**). Anhand der Verbindungen **18** und **19** konnte allerdings auch gezeigt werden, dass mit der Halogensubstitution zwar die hormonelle Wirkung, aber auch die Zytotoxizität stark ansteigt.

5.2.2 Proliferationshemmende Eigenschaften von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen

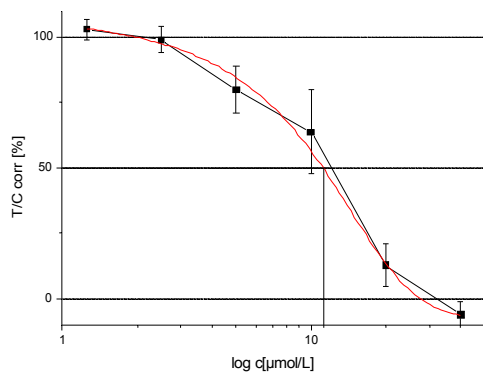
In diesen Untersuchungen sollte der Zusammenhang zwischen Zytotoxizität und Struktur der (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole ermittelt werden. Dabei war von Interesse, inwieweit die Aromaten und deren Substitutionsmuster die zytotoxische Wirkung beeinflussen.

Als Leitstruktur und Ausgangspunkt dieser Struktur-Wirkungs-Studien diene das (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazol **1**, das in einer ersten Untersuchung auf proliferationshemmende Eigenschaften überprüft wurde.



a) Antiproliferative Wirkung von $10 \cdot 10^{-6}$ M /L und $20 \cdot 10^{-6}$ M von **1** an MCF7, MDA-MB-231 und HT29-Zellen

b) Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Zeit

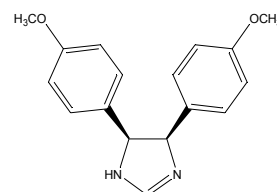
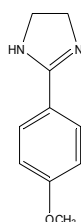
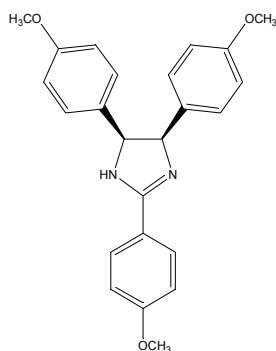


c) Konzentrations--Wirkungskurve an MCF7-Zellen zur Bestimmung des IC₅₀ - Wertes von **1** (IC₅₀= $11,2 \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$ M)

Verbindung **1** zeigte bei der Zweipunktbestimmung Abb. 5.2 (a) an der MCF7-Zelllinie in den Konzentrationen $10 \cdot 10^{-6}$ M /l und $20 \cdot 10^{-6}$ M /L antiproliferative Wirkungen ($T/C_{\text{corr}} \leq 50\%$). MDA-MB231- und HT-29 Zellen reagierten auf Verbindung **1** deutlich unempfindlicher. Deshalb wurde der zeitabhängige Zytotoxizitätstest für **1** ausschließlich an der MCF-7 Zelllinie im Konzentrationsbereich von $1,25$ bis $20 \cdot 10^{-6}$ M durchgeführt (b). Im Konzentrationsbereich bis $10 \cdot 10^{-6}$ M werden nur schwache antiproliferative Effekte beobachtet ($T/C_{\text{corr}} \geq 50\%$), während mit $20 \cdot 10^{-6}$ M /L eine deutliche zytostatische Wirkung erzielt wurde, die nach 72 h ihr Maximum erreichte. Der IC₅₀-Wert (c) wurde dann mit $11,2 \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$ M ermittelt.

Abbildung 5.9: Proliferationshemmende Eigenschaften von **1**

Im zweiten Schritt wurde die Bedeutung der Aromaten am Dihydroimidazol erfasst. Dabei wurde das (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol **6** verwendet, da das 4,5-Dihydro-2-(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol **6a** (ohne Aromaten an C4 und C5 des Imidazolgrundgerüsts) und das (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-dihydro-4,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol **6b** (ohne Aromaten an C2) bereits zur Verfügung standen.



6

(4R,5S)/(4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol

Zweipunktbestimmung:

T/C_{corr} [%] bei $10 \cdot 10^{-6}$ M = $53 \pm 1,4$
(MCF7)
nach 96 h

IC₅₀ = $9,0 \pm 0,6 \cdot 10^{-6}$ M

6a

4,5-Dihydro-2-(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol¹⁾

Zweipunktbestimmung:

nicht toxisch
(MCF7)
nach 96 h

IC₅₀ > $20 \cdot 10^{-6}$ M

6b

(4R,5S)/(4S,5R)-4,5-dihydro-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol²⁾

Zweipunktbestimmung:

nicht toxisch
(MCF7)
nach 96 h

IC₅₀ > $20 \cdot 10^{-6}$ M

Abbildung 5.10: Bedeutung des C2-Arylringes

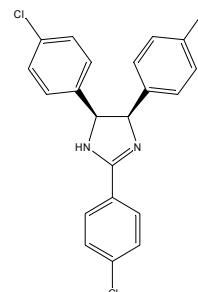
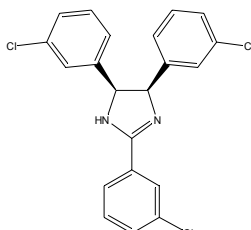
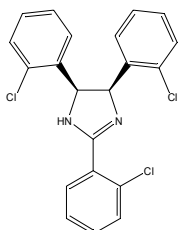
¹⁾ Verbindung 6a ist kommerziell erhältlich.

²⁾ Diese Verbindung wurde mir freundlicherweise von Dr. M. Schlenk zur Verfügung gestellt.

Es zeigt sich deutlich, dass für die zytotoxische Wirkung sowohl die 4,5-ständigen Aromaten, als auch der Aromat an C2 essentiell sind. In der Zweipunktbestimmung wurde durch die Verbindungen 6a und 6b keine Beeinflussung des Wachstums von MCF-7 Zellen beobachtet. Der IC₅₀ liegt über $20 \cdot 10^{-6}$ M und wurde nicht weiter quantifiziert (Abb. 5.10).

Bedeutung des Substitutionsmusters am Aromaten

Nachdem die Bedeutung der drei aromatischen Ringe erkannt wurde, sollte durch Variation der Position der Methoxy-Gruppen der Einfluss auf die antiproliferative Wirkung an MCF-7, MDA-MB 231 und HT29 Zellen quantifiziert werden.



Verbindung 13

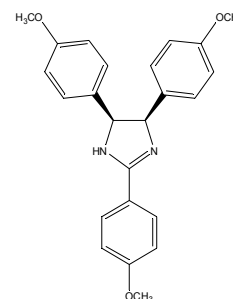
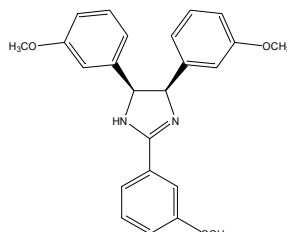
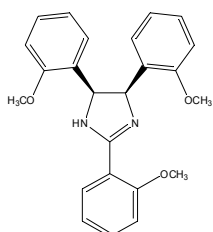
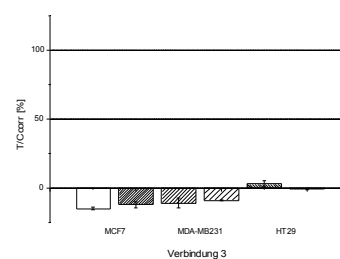
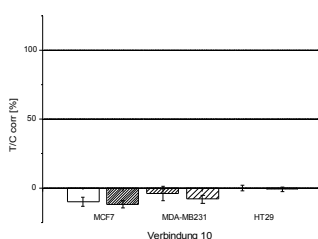
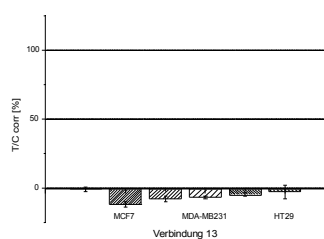
$IC_{50} = 3,0(\pm 0,7) \cdot 10^{-6}$ M (nach 48h)

Verbindung 10

$IC_{50} = 2,7(\pm 0,5) \cdot 10^{-6}$ M (nach 48h)

Verbindung 3

$IC_{50} = 0,85(\pm 0,2) \cdot 10^{-6}$ M (nach 48h)



Verbindung 14

$IC_{50} = 8,6 \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$ M (nach 48h)

Verbindung 11

$IC_{50} = 8,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-6}$ M (nach 48h)

Verbindung 6

$IC_{50} = 9,0 \pm 0,6 \cdot 10^{-6}$ M (nach 48h)

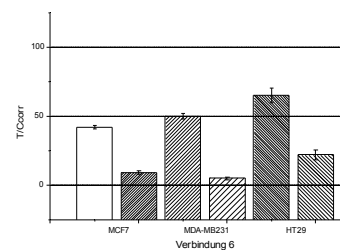
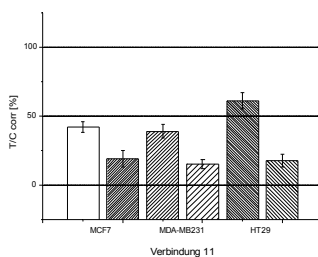
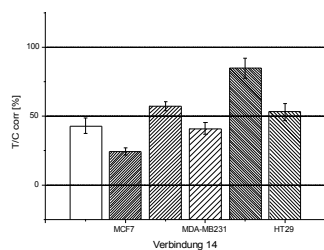


Abbildung 5.11: Auswirkung der Substituenten und Substitutionsmuster auf die Proliferationshemmung (Zweipunktbestimmung)

Wie aus Abb. 5.11 ersichtlich wird, hat die Position der Methoxygruppe nur geringen Einfluss auf die Wirkung. Wiederum waren MCF-7 Zellen etwas sensitiver als die beiden anderen Zelllinien. Die IC_{50} -Werte der Verbindungen **6**, **11** und **14** an dieser Zelllinie liegen im Bereich von $8-9 \cdot 10^{-6}$ M.

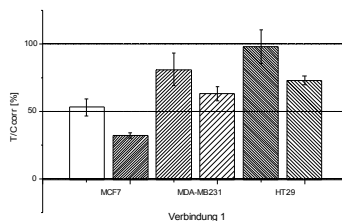
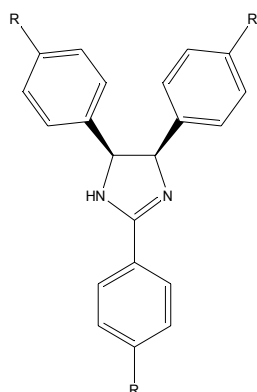
Ersetzt man die Methoxygruppen durch Chlor, erhöht sich die Wirkung auf die Zellen. Die Derivate **3**, **10** und **13** wirken in den Konzentrationen 10 und $20 \cdot 10^{-6}$ M zytozide.

Interessanterweise zeigen die IC_{50} Werte (bestimmt an der MCF-7 Zellen) eine deutliche Präferenz für die para-Position: IC_{50} (**13**, ortho-Chlor) = $3,0 \cdot 10^{-6}$ M; IC_{50} (**10**, meta-Chlor) = $2,7 \cdot 10^{-6}$ M; IC_{50} (**3**, para-Chlor) = $0,85 \cdot 10^{-6}$ M.

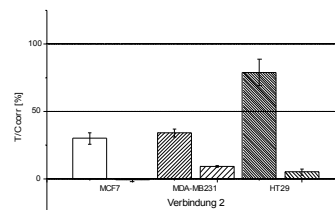
Deshalb wurde im Folgenden der Einfluss von para-Substituenten eingehender untersucht. Gewählt wurden sowohl lipophile als auch hydrophile Substituenten.

Einfluss der Substituenten in den Aromaten

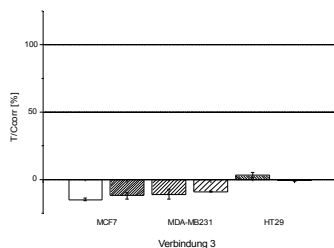
Lipophile Substituenten in Position 4 der Aromaten



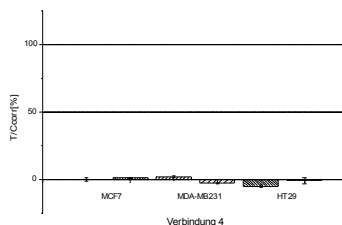
Verbindung 1
R = H
 cLogP = 6,06
 $IC_{50} = 11,2 \pm 0,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
 nach 72 h



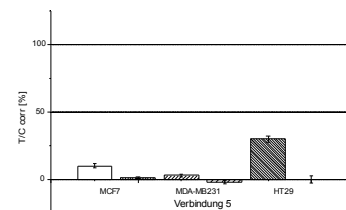
Verbindung 2
R = F
 cLogP = 6,49
 $IC_{50} = 6,8 \pm 0,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
 nach 48 h



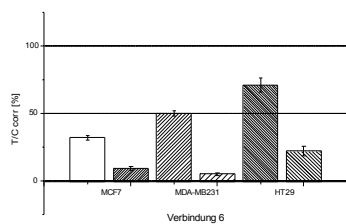
Verbindung 3
R = Cl
 cLogP = 8,20
 $IC_{50} = 0,85 \pm 0,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
 nach 48 h



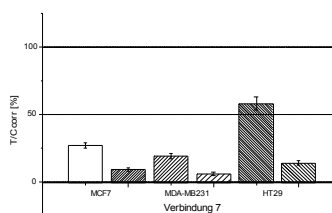
Verbindung 4
R = CH₃
 cLogP = 7,55
 $IC_{50} = 3,9 \pm 0,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
 nach 48 h



Verbindung 5
R = CN
 cLogP = 4,36
 $IC_{50} = 4,9 \pm 0,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
 nach 72 h



Verbindung 6
R = OCH₃
 cLogP = 5,82
 $IC_{50} = 9,0 \pm 0,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
 nach 48 h



Verbindung 7
R = SCH₃
 cLogP = 7,74
 $IC_{50} = 2,2 \pm 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
 nach 48 h

Abbildung 5.12: Bedeutung von lipophilen Substituenten für die zytostatischen Eigenschaften von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen

Wie aus Abbildung 5.12 ersichtlich wird, erhöht jeder lipophile Substituent im Vergleich zur Leitstruktur **1** die Wirkung. Mit Ausnahme von **7**, die etwas stärkere Effekte an der MDA-MB 231 Zelllinie aufweist, wird das Wachstum von MCF7-Zellen am stärksten gehemmt. Die IC₅₀-Werte (Abbildung 5.5) sinken in der Reihe 1 > 6 < 7 < 2 < 5 < 4 < 3. Dies korreliert in etwa mit der Lipophilie der Verbindungen.

Um die Lipophilie besser beurteilen zu können, wurde der logP berechnet und als cLogP wiedergegeben. Die cLogP – Werte der in der Verbindungen wurden per ChemDrawUltra berechnet. Die dafür verwendeten Algorithmen finden sich unter <http://www.biobyte.com/bb/prod/40manual.pdf>. Es wurden die logP-Werte der freien Basen berechnet.

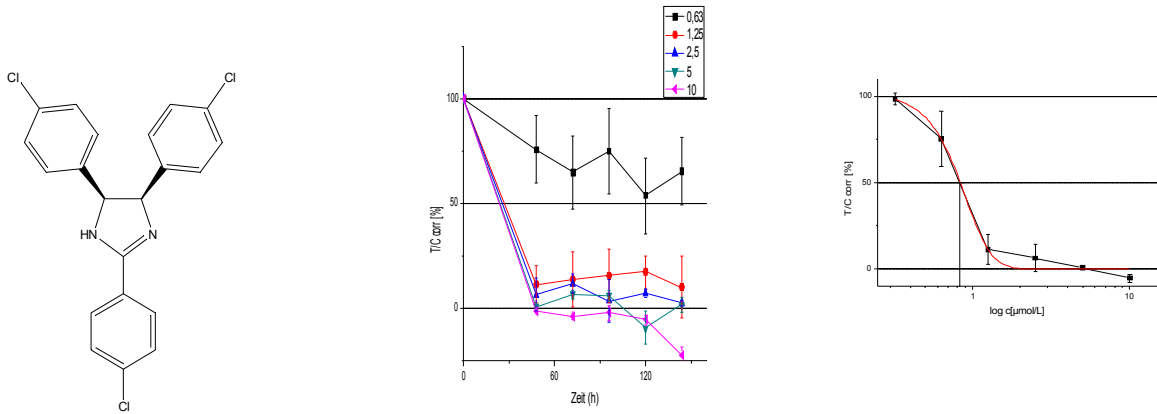
Verbindung **1** hat einen cLogP – Wert von 6,06. Führt man in para-Position der Aromaten Fluor ein (**2**), steigt der cLogP von 6,06 auf 6,49. Noch stärker zeigt sich der Effekt beim Austausch des Fluoratoms durch Chlor (**3**). Der cLogP-Wert beträgt 8,20.

Verbindung **3** ist mit einem IC₅₀ von 0,85 *10⁻⁶ M die potenteste Verbindung der vorliegenden Arbeit. Sie war so stark proliferationshemmend, dass schon bei 0,63 *10⁻⁶ M in der zeitabhängigen Konzentrations-Wirkungskurve eine Beeinflussung des Zellwachstums zu erkennen war (Abbildung 5.13 a). Der IC₅₀ wurde nach 48 h im Konzentrationsbereich von 0,32 *10⁻⁶ M bis 10 *10⁻⁶ M bestimmt (Abbildung 5.13 b)

Eine genauere Analyse der Korrelation der berechneten cLogP-Werte mit der Zytotoxizität findet sich in Kapitel 5.4.

Zusätzlich wurde in einem weiteren Versuch die Veränderung der Zellmorphologie unter dem Einfluss von **3** festgehalten (Abbildung 5.14). Hier zeigte sich, dass erste Veränderungen nach 12 h einsetzen. Bereits nach 24 h sind erste, abgestorbene Zellen zu erkennen. Dabei wirken die Zellen stark deformiert. Deshalb stellte sich die Frage, ob der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose [42] ausgelöst wird. Unter Nekrose versteht man den Tod der Zelle durch chemische oder physikalische Noxen, wohingegen Apoptose der physiologische Zelltod ist, der durch charakteristische Signalketten ausgelöst werden kann. Die Veränderungen der Zellmorphologie erlauben keine eindeutige Zuordnung. Allerdings zeigen sich nach 24 h die Zellen als stark geschrumpfte, aber klar umrissene Einheiten, was auf die Bildung apoptotischer Körperchen hindeuten könnte.

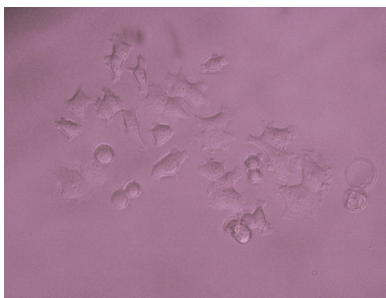
Veränderungen der Zellmorphologie unter dem Einfluss lipophil substituierter (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole:



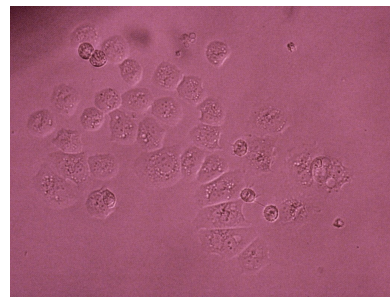
a) zeitlicher Verlauf der Proliferationshemmung

b) Bestimmung des IC₅₀

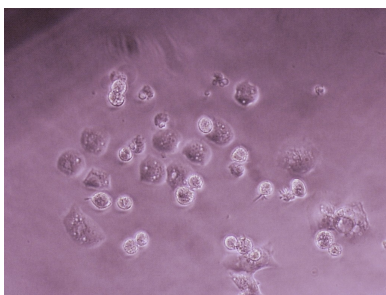
Abbildung 5.13: Eigenschaften von Verbindung 3



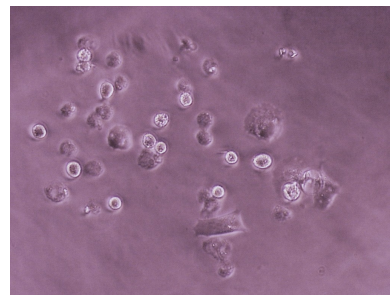
Zellen vor Exposition



12 h nach Exposition



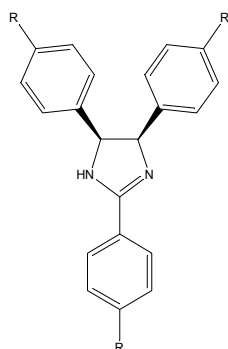
16 h nach Exposition



24 h nach Exposition

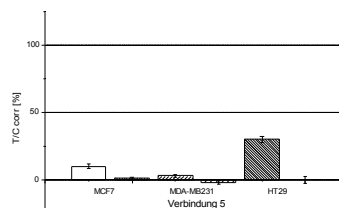
Abbildung 5.14: Veränderung der Zellmorphologie nach Exposition von Verbindung 3

Einfluss von hydrophilen Substituenten in Position 4 der Aromaten der (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole



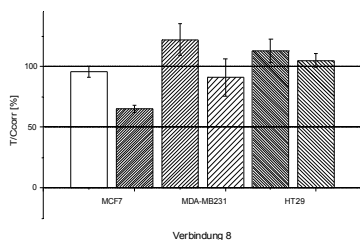
Verbindung 6

R = OCH₃
 cLogP = 6,06
 IC₅₀ = 9 * 10⁻⁶ M (nach 48h)



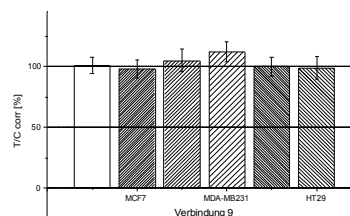
Verbindung 5

R = CN
 cLogP = 4,36
 IC₅₀ = 4,9 ± 0,3 * 10⁻⁶ M (nach 144 h)



Verbindung 8

R = OH
 cLogP = 3,15
 IC₅₀ : > 20 * 10⁻⁶ M



Verbindung 9

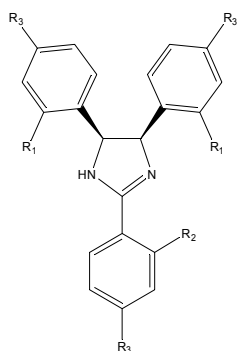
R = CONH₂
 cLogP = 1,59
 kein IC₅₀ bestimmbar

Abbildung 5.15: Einfluss hydrophiler Substituenten auf die Proliferationshemmung

Werden die Methylether von Verbindung 6 gespalten, sinkt die Lipophilie. Die phenolische Verbindung 8 weist einen cLogP-Wert von 3,15 auf und zeigt an keiner Zelllinie signifikante Wachstumshemmung. Nur die MCF-7 Zellen werden in ihren Wachstum in einer Konzentration leicht gehemmt (T/C_{corr} = bei 20 * 10⁻⁶ M /L). Noch drastischer ist der Wirkungsverlust bei Hydrolyse der 4-Cyanogruppen zu Carbonsäureamiden (5 → 9). Der cLogP sinkt auf 1,59 und die Verbindung 9 ist komplett inaktiv.

Aus diesem Grund wurde dann versucht, die Wirkung durch Kombination von hydrophilen 4-Hydroxygruppen und Halogenen in 2-Position zu optimieren. Solche Substitutionsmuster waren bereits in 4,5-Diaryldihydroimidazolen [12,14, 35] sehr effektiv. In Abb. 5.8 sind die Effekte der Strukturmodifikation zusammengefasst.

Einfluss von Halogensubstituenten auf (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole



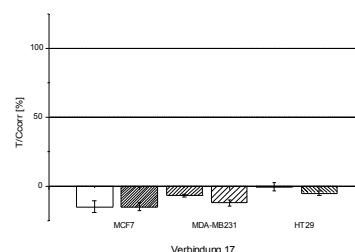
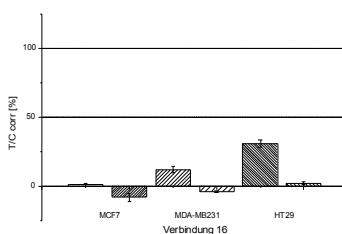
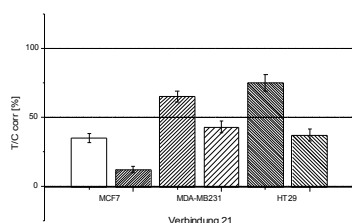
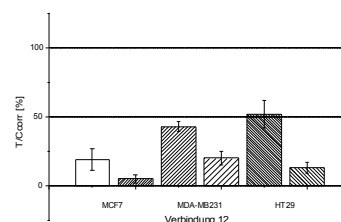
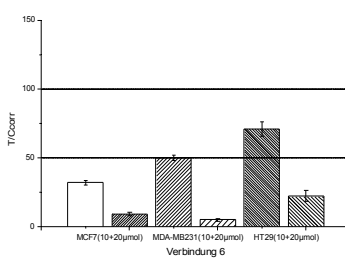
a) allgemeine Struktur

b) $R_1 = R_2 = H$
 $R_3 = OCH_3$

Verbindung 6
 $IC_{50} = 9,0 \pm 0,6 \cdot 10^{-6} M$

c) $R_1 = R_2 = F$
 $R_3 = H$

Verbindung 12
 $IC_{50} = 6,3 \pm 0,4 \cdot 10^{-6} M$



d) $R_1 = H$
 $R_2 = F$
 $R_3 = OCH_3$

Verbindung 21
 $IC_{50} = 8,5 \pm 0,7 \cdot 10^{-6} M$

e) $R_1 = R_2 = F$
 $R_3 = OCH_3$

Verbindung 16
 $IC_{50} = 5,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-6} M / L$

f) $R_1 = R_2 = Cl$
 $R_3 = OCH_3$

Verbindung 17
 $IC_{50} = 0,8 \pm 0,2 \cdot 10^{-6} M$

Abbildung 5.16: Zytotoxische Eigenschaften von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen mit Halogensubstituenten

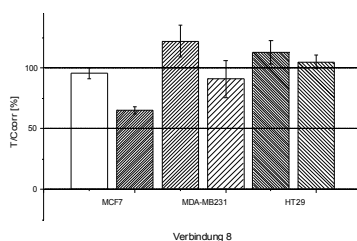
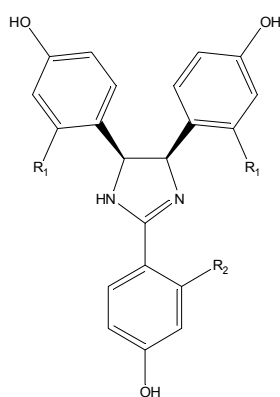
Vereint man die Substitutionsmuster von Verbindung **6** (4-OCH₃) und **12** (2-Fluor) so zeigt sich, dass die Wirkung von den 4,5-ständigen Aromaten dominiert wird. Ein einzelner Fluorsubstituent im C2-Arylring des 2,4,5-Tris(4-methoxyphenyl)dihydroimidazol ändert die Wirkung im Vergleich zu **6** nicht (Zeitabhängiger Verlauf der Zytotoxizität und Konzentrations-Wirkungskurve: siehe Anhang I). Sind alle drei Aromaten in ortho-Position fluoriert (**16**) steigt der Effekt stark an ($IC_{50}=5,4 \cdot 10^{-6} M / L$) und resultiert in einer steileren Konzentrations-Wirkungskurve. Konzentrationen von $20 \cdot 10^{-6} M / L$ wirken zytozide. Die Wirkung auf alle drei Zelllinien verstärkt sich. Ersetzt man dann die Fluorsubstituenten durch Chlor (Verbindung **17** Abbildung 5.8.f) wird die Zytotoxizität noch einmal gesteigert. In der Zweipunktbestimmung zeigten sich bei $10 \cdot 10^{-6} M / L$ und $20 \cdot 10^{-6} M / L$ zytozide Eigenschaften an jeder Zelllinie. Im zeitabhängigen Test erwies sich **17** auch in der geringsten Konzentration von $1 \cdot 10^{-6} M / L$ als proliferationshemmend. Vergleicht man die Effekte von **13** (2-Cl) und **6** (4-OCH₃) mit **17** so kann man von „synergistischen“ Substituenteneffekten sprechen.

Analysiert man den zeitabhängigen Zytotoxizitätstest genauer, fällt auf, dass mit den drei höchsten Konzentrationen sehr ähnliche Kurven erhalten werden. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der geringen Löslichkeit der Substanz im Kulturmedium (DMEM). Die entsprechenden Graphen finden sich in Anhang II. Deshalb war es auch von Interesse, die Wirkung von entsprechenden OH-substituierten Verbindungen mit Halogenen zu optimieren.

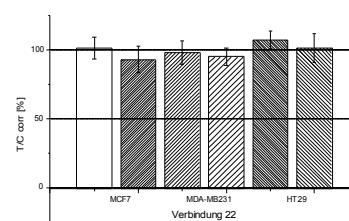
Im Gegensatz zu **6** zeigt sein 4-OH Analogon **8** nur an der MCF-7 Zelllinie geringe Effekte (T/C = ???) in der Konzentration von $20 \cdot 10^{-6}$ M /L. Ein F-Substituent im C2-Phenolring (**22**) reduziert auch diese Wirkung auf Null.

Im Gegensatz zur Methoxyverbindung wird die antiproliferative Wirkung durch ortho-Fluorsubstituenten in den 4,5-ständigen Phenolringen nicht gesteigert. **18** zeigt das gleiche Wirkungsprofil wie **8**. Diese Ergebnisse wurden durch den zeitabhängigen Zytotoxizitätstest bestätigt (siehe 5.9 d). Allerdings scheinen geringere Konzentrationen von **18** das Wachstum nicht zu hemmen, sondern eher leicht zu fördern. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen auf estrogene Potenz (siehe Unterkapitel 5.2)

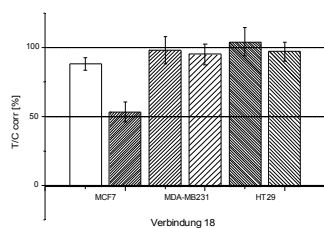
Interessanterweise trifft die geringe Zytotoxizität auch auf die analoge Chlorverbindung **19** zu. Der starke Wirkungsanstieg wie bei **17** beobachtet blieb aus.



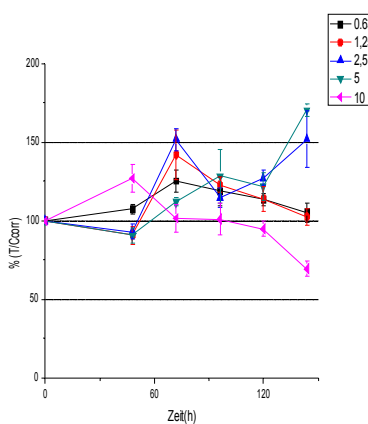
a) Verbindung **8**
 $R_1 = R_2 = H$
 $IC_{50} > 20 \cdot 10^{-6}$ M



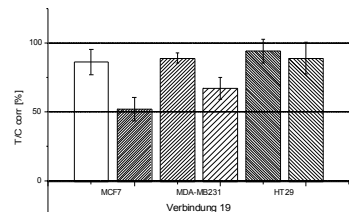
b) Verbindung **22**
 $R_1 = H, R_2 = F$
 kein IC_{50} bestimmbar



c) Verbindung **18**
 $R_1 = R_2 = F$
 $IC_{50} > 20 \cdot 10^{-6}$ M



d) zeitabhängige Testung der Zytotoxizität von Verbindung **18**



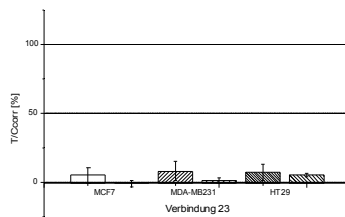
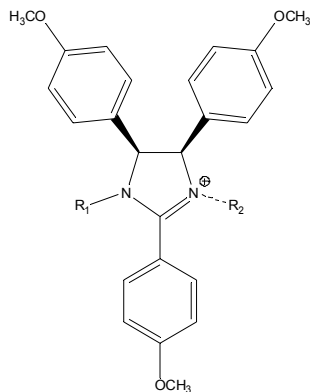
e) Verbindung **19**
 $R_1 = R_2 = Cl$
 $IC_{50} \sim 20 \cdot 10^{-6}$ M

Abbildung 5.17: Zytotoxische Eigenschaften halogener (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazole

Einfluss der N-Alkylierung

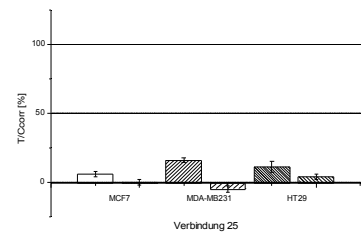
Nachdem es nicht möglich war, in allen Fällen die zytotoxische Wirkung durch Halogene zu optimieren, wurde versucht, durch N-Alkylierung den hydrophoben Charakter der Moleküle zu erhöhen.

Einfluss der N-Alkylierung auf (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydroimidazole



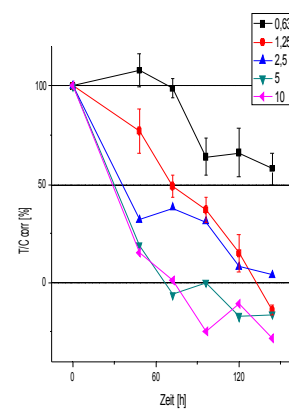
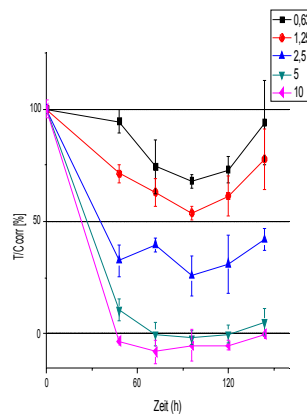
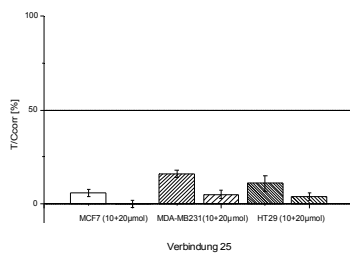
Verbindung 23

$R_1 = C_2H_5$, $R_2 = (-)$
 $IC_{50} = 2,1 \pm 0,3 \cdot 10^{-6} M$
 Maximum nach 96h



Verbindung 30

$R_1 = R_2 = C_2H_5$
 $IC_{50} = 1,8 \pm 0,3 \cdot 10^{-6} M$ (48 h)
 Maximum nach 144 h



Verbindung 25

$R_1 = CH_2C\equiv CH$, $R_2 = (-)$
 $IC_{50} = 1,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-6} M / L$ (72h)
 Maximum nach 72h

zeitlicher Verlauf bei Verbindung
23

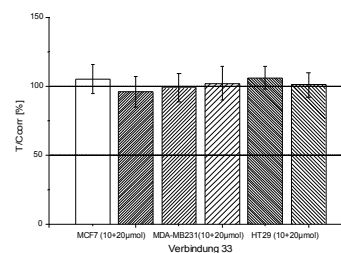
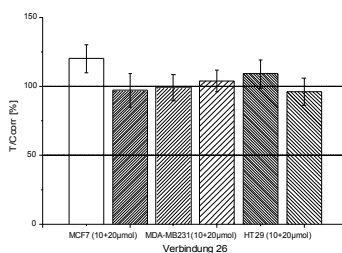
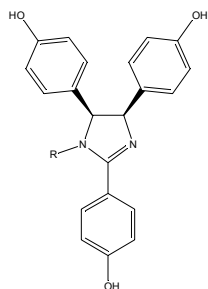
zeitlicher Verlauf bei Verbindung
30

Abbildung 5.18: Einfluss der N-Alkylierung auf die proliferationshemmenden Eigenschaften von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen

Verbindung **23** ist das N-Ethyl Derivat von **6**. Mit dieser Strukturmodifikation konnte ein deutlicher Wirkungsgewinn an allen getesteten Zellen erzielt werden. Der an der MCF-7 Zelllinie ermittelte IC_{50} sinkt von 9,0 auf $2,1 \cdot 10^{-6}$ M. Im zeitabhängigen Wirkungsverlauf kann eine relativ flache Konzentrations-Wirkungskurve abgeleitet werden. Das Wirkmaximum wird in niedrigen Konzentrationen nach 96h, in hohen Konzentrationen bereits nach 48h beobachtet.

Ersetzt man den Ethylrest durch einen Propargylrest (**25**) kann die Wirkung an der MCF-7 Zelllinie noch einmal (allerdings nicht signifikant) gesteigert werden, während die MDA-MB 231 und die HAT-29 Zellen etwas schlechter auf das Derivat **25** reagieren. Ein interessantes Phänomen wird nach N,N'-Dialkylierung beobachtet. Der IC_{50} -Wert sinkt bei einem deutlich unterschiedlichen Verlauf der Zeit-Wirkungskurven auf $1,8 \cdot 10^{-6}$ M /L. Die proliferationshemmenden Effekte setzen langsam ein und erreichen ihr Maximum erst am Ende des Versuchs nach 144h. Dies ist sicherlich in der Tatsache begründet, dass **30** als permanentes Kation in anderer Weise oder zumindest in anderer Kinetik in die Zellen aufgenommen wird. Diese Ergebnisse sollten in weiterführenden Untersuchungen genauer erforscht werden.

Der Einfluss der N-Alkylierung auf (4R,5S)/(4S,5R)-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazole



Verbindung 8

$R_1 = H$

$R_2 = ---$

$IC_{50} > 20 \cdot 10^{-6} M$

Verbindung 26

$R_1 = C_2H_5$

$R_2 = ---$

keine Hemmung des
Zellwachstums erkennbar

Verbindung 33

$R_1 = C_2H_5$

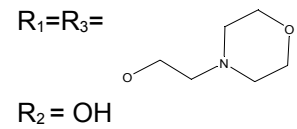
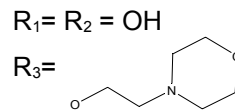
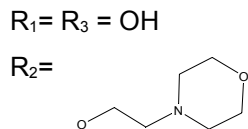
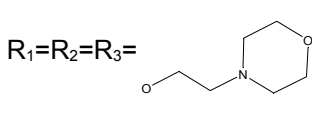
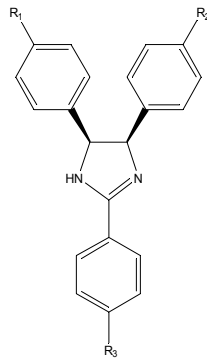
$R_2 = C_2H_5$

keine Hemmung des
Zellwachstums erkennbar

5.19: Eigenschaften von N-alkylierten (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris-(4hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazolen

Überraschender Weise konnte auch mit dieser strukturellen Modifikation die zytotoxische Potenz der Hydroxy-substituierten Verbindung **8** nicht erhöht werden. Im Gegenteil, die Wirkung an allen drei getesteten Zelllinie unterschied sich nicht von der Kontrolle. Ein antiproliferativer Effekt ist somit nicht gegeben. Dies gilt sowohl für die Mono- (**26**) als auch die Diethyl-Verbindung (**33**). Wie bei Verbindung **18** wurde bei Verbindung **26** eine leichte wachstumsfördernde Wirkung bei MCF-7 Zellen beobachtet, was auf die Interaktionen mit dem Estrogenrezeptor (vergleiche Kapitel 5.2) zurückzuführen ist.

Einfluss von O-gebundenen basischen Seitenketten



Verbindung 43

Zweipunktbestimmung:
 $IC_{50} < 10^{-5} M$

Verbindung 36

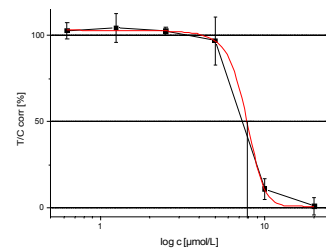
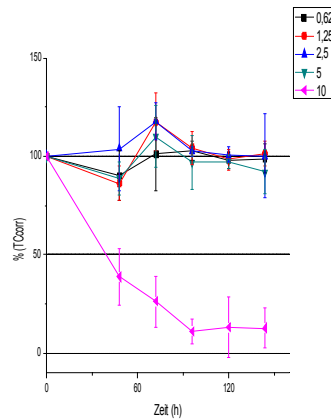
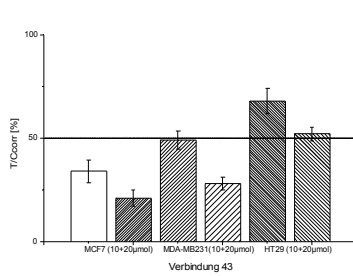
Zweipunktbestimmung:
nicht toxisch

Verbindung 39

Zweipunktbestimmung:
nicht toxisch

Verbindung 40

Zweipunktbestimmung:
nicht toxisch



a) Zweipunktbestimmung von 43
Hemmeffekte in allen 3 Zelllinien

b) zeitabhängiger Verlauf der
Proliferationshemmung von 43 an MCF7-
Zellen

c) Dosis-Wirkungskurve von 43
 $IC_{50} = 7,9 \pm 0,9 \cdot 10^{-6} M$ (nach 144h)

Abbildung 5.20 : Einfluss von basischen Seitenketten auf die Zytotoxizität

Nachdem für hydroxysubstituierte Verbindungen eine hormonelle Komponente gefunden wurde, wurde geplant, durch Einführen basischer Seitenketten antiestrogene Eigenschaften zu vermitteln. Entsprechend sollte das Wachstum hormonabhängiger Zellen reduziert werden. Interessanterweise zeigt nur die Verbindung mit drei basischen Seitenketten (**43**) Zytotoxizität. Die Verbindungen **36**, **39** und **42** sind inaktiv. **43** reduziert aber auch das Wachstum der hormonunabhängigen MDA-MB-231 Zellen, weshalb auf einen ER-unabhängigen Wirkmechanismus geschlossen werden kann. Die Proliferationshemmung setzt ab einer Konzentration von 10^{-5} M ein und verstärkt sich über den gesamten Messzeitraum. Die Dosis-Wirkungskurve ist steil mit einem IC_{50} von $7,9 \cdot 10^{-6}$ M. Ein derartiges Profil wird von anderen (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen nicht erhalten.

5.3 Mögliche Wirkmechanismen für (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen sind Weiterentwicklungen von 4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazolen [12,14,35], die den Typ-II Estrogenen zuzuordnen sind. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Typ-I Estrogenen wie E2 oder DES binden diese zwar in der gleichen Bindungstasche, jedoch interagieren sie zum Teil mit anderen Aminosäuren. Als essentielle Substitutionsmuster in den Aromaten wurde eine Kombination aus 4-Hydroxygruppen und ortho-Halogenen identifiziert. N-Alkylierung erhöht die Bindung durch zusätzliche hydrophobe Interaktionen.

Untersuchungen wurden vor allem am ER α (MCF7-2a) durchgeführt. In der LBD des ER α tritt eine der OH-Gruppen analog zu Typ-I Estrogenen in H-Brückenbindung zu Arg394, Glu353 und einem Wassermolekül. Die zweite Hydroxygruppe interagiert mit Asp351 oder Thr 347. Die Überlegung für einen zusätzlichen Aromaten an C2 resultiert aus einem möglichen zusätzlichen Kontakt zu His524 wie er für E2 nachgewiesen wurde. Damit sollte die Bindungsaffinität erhöht und die Genaktivierung gesteigert werden.

Zusätzlich könnte dadurch eine optimierte Positionierung in der LBD erfolgen und essentielle Kontakte von basischen Seitenketten vermittelt werden. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass basische Seitenketten an Typ-II Estrogenen nicht zwangsläufig antagonistische Wirkungen vermitteln, obwohl eine Positionierung analog der Seitenketten von Tamoxifen oder Raloxifen in einer Nebenbindungstasche sehr wahrscheinlich ist. Tatsächlich wurde in manchen Fällen sogar eine erhöhte agonistische Potenz beobachtet. Dies wurde mit einer für antagonistische Effekte unzulängliche Positionierung in der Bindungstasche und damit unzureichenden Abschirmung der Ladung an Asp351 begründet.

Die in Kapitel 5.2.1 beschriebenen Untersuchungen zeigen aber, dass sich diese Annahmen nicht durch einen C2-ständigen Aromaten realisieren lassen. Es konnten nur eine sehr geringe Aktivierung im Luciferase Assay mit MCF-7-2a Zellen beobachtet werden. Der Kontakt zu His524, der möglich wäre, führt somit nicht zu einer Wirkoptimierung. Insbesondere die fehlende Wirkung von **22** war sehr ernüchternd. Auch die Erhöhung der Hydrophobizität durch N-Alkylierung, führt zu keinem weiteren Anstieg der Estrogenität.

Für die fehlende hormonelle Wirkung von C2-substituierten 4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazolen kommen mehrere Gründe in Betracht.

Zum einen haben die entsprechenden Verbindungen durch den dritten Aromaten ein erheblich größeres Volumen. So könnte es sein, dass die Moleküle nicht mehr in die LBD des Rezeptors aufgenommen werden. Zum anderen legen die asymmetrischen C4- und C5-Zentren die Position des Pharmakophors fest. Bei R/S Konfiguration stehen die Aromaten in einer "eklipsed" Position zueinander. Dadurch wird zwar eine Typ-I Bindung möglich, jedoch scheint ein C2-Arylring diese Interaktionen eher zu behindern als zu verstärken. Im Vergleich zum 4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazol geht die Wirkung nahezu vollständig verloren.

Auch im Fall der Derivate mit basischen Seitenketten erfolgte keine Wirkoptimierung. Weder erhöhte agonistische noch antagonistische Effekte konnten beobachtet werden. Dies dokumentiert das Zusammenspiel der Substituenten am heterozyklischen Core-Molekül auch in Relation zur ihrer Position.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass diese Untersuchungen nur am ER α durchgeführt wurden. Wirkungen am ER β sind nicht auszuschließen. Des Weiteren könnte sich ein Wechsel der (R/S)/(S/R)- zur RR/SS-Konfiguration positiv auswirken.

Unabhängig von einer Interaktion mit dem ER wurden bei einigen 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen zytotoxische Wirkungen beobachtet. Dies gilt für hydrophile als auch hydrophobe Verbindungen. Basische Seitenketten liegen unter Zellversuchsbedingungen protoniert vor. Je mehr dieser Ammoniumgruppen vorhanden sind, umso höher ist der antiproliferative Effekt.

Völlig unerwartet war dann auch die Erkenntnis, dass sich durch hydrophobe Substituenten in den Aromaten aktive Zytostatika ergeben.

Nachdem eine ER-vermittelnde Wirkung ausgeschlossen werden kann, muss in Fortsetzung dieser Arbeit das eigentliche Target identifiziert werden. Im Folgenden werden einige mögliche Wirkmechanismen diskutiert. Die Auswahl erfolgte unter strukturellen Gesichtspunkten.

Aufgrund vergleichender Überlegungen kommen folgende Targets in Betracht:

1. Die Zellmembran
2. Die Cyclooxygenasen (COX1/COX2)
3. Das humane double minute protein HDM2 bzw. MDM2
4. Der Purinorezeptor P2X7

5.3.1 Die Zellmembran

Die Zellmembran ist aus verschiedenen Proteinen und Lipiden aufgebaut. Diese bilden eine selektiv permeable Membran (siehe Abbildung 5.21). Die amphiphilen Moleküle sind entweder Phospholipide, Steroide oder Glykolipide. Dabei zeigen die hydrophilen Molekülteile nach außen und die lipophilen Molekülteile haken ineinander. So entsteht eine die Zelle schützende Membran, die den Zugang von Substanzen durch verschiedene Mechanismen regulieren kann.

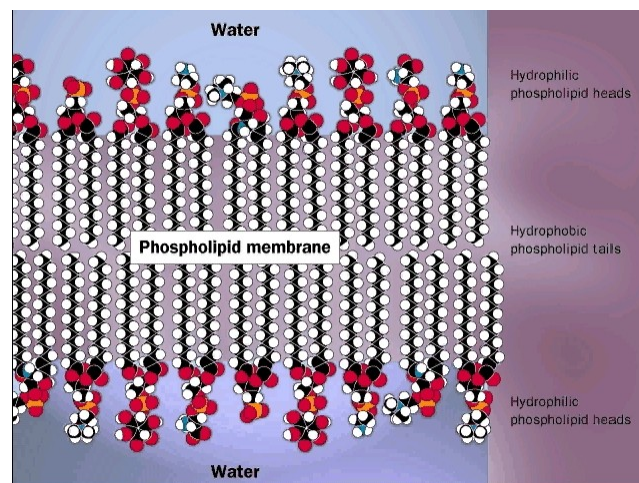
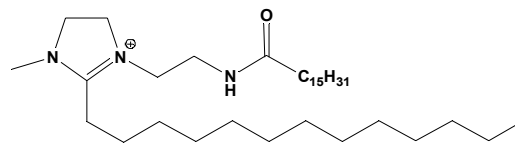
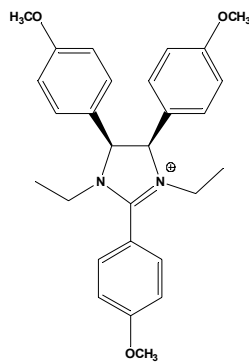
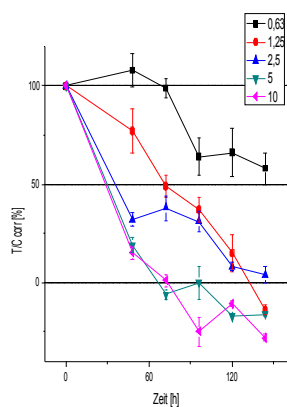


Abbildung 5.21: schematischer Aufbau der Zellmembran [43]

Bedingungen zur Wechselwirkung mit der Zellmembran

Als Faustregel gilt, dass elektrisch neutrale Moleküle mit geringerer Molmasse die Zellmembran besser durchdringen können [23]. Demgegenüber verbleiben amphiphile Moleküle mit höherer Molmasse leichter in der Membran. (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole sind durch die protonierbare Dihydroimidazolgrundstruktur und die Aromaten amphiphil und zeigen außerdem strukturelle Ähnlichkeit zu bestimmten kationischen Tensiden, die in der Kunststoff verarbeitenden Industrie verwendet werden. Von kationischen Tensiden sind membranschädigende, zytotoxische Wirkungen bekannt [44]. Diese beruhen darauf, dass der Aufbau und die Stabilität der Zellmembran so stark beeinträchtigt werden, dass eine physiologisch normale Funktion der Zelle nicht mehr gegeben ist.



a) zeitabhängige Konzentrations--
Wirkungskurve von **30**

b) Verbindung **30**

c) Industriell verwendetes 4,5-Dihydroimidazol
[45]

Abbildung 5.22: Vergleich zwischen dem (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-N,N'-bisethylimidazoliumkation (30**) und einem in der Kunststoffindustrie verwendeten 4,5-Dihydroimidazol [24]**

Abbildung 5.22 zeigt einen Vergleich zwischen einem in der vorliegenden Arbeit synthetisierten (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazol (**30**) und einem in der Kunststoffindustrie verwendeten 4,5-Dihydroimidazol [45]. Beiden Strukturen ist das permanent geladene Imidazoliumkation als zentrale Einheit gemeinsam. Während das Tensid üblicherweise einen Sulfonsäurerest als Gegenion trägt, liegt Verbindung **30** als imidazoliumiodid vor. Ein weiterer Unterschied liegt in der Art der Dialkylierung, die bei Verbindung **30** symmetrisch und bei dem Tensid asymmetrisch ist. Bei Verbindung **30** besteht eine positive Beziehung zwischen der Konzentration, der Einwirkungsdauer und der in-vitro-Zytotoxizität. Mit zunehmender Konzentration und Zeit verstärkt sich die Schädigung, wie an Abbildung 5.22 a zu erkennen ist.

Anhand von Verbindung **43** (vergleiche Abbildung 5.19, Kapitel 5.2) wird deutlich, dass auch die Kopplung von basischen Seitenketten an Phenolgruppen von Verbindung **8** auch zytotoxische Effekte hervorrufen kann. Obwohl die basischen Seitenketten unter physiologischen Verbindungen protoniert vorliegen, zeigen sich erste antiproliferative Effekte erst ab drei basischen Seitenketten. Die Verbindungen **36**, **39** und **40** weisen keine Hemmung des Zellwachstums auf.

Auch für hydrophobe Wirkstoffe ist die Zellmembran ein geeignetes Target. Darauf weisen die hohen cLogP-Werte der einzelnen Verbindungen (berechnet für die freie Base) hin. Damit ein Pharmakon die Zellmembran passieren und in die Zelle aufgenommen werden kann, sollte die Verbindung einen cLogP unter 5 besitzen [23]. Die meisten proliferationshemmenden (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole (siehe Kapitel 5.2) besitzen einen cLogP von über 5, könnten mit der Lipidschicht wechselwirken und zellschädigende Effekte hervorrufen. Anhand von Abb. 5.23 lässt sich zudem zeigen, dass die proliferationshemmende Wirkung mit der Lipophilie gut korreliert.

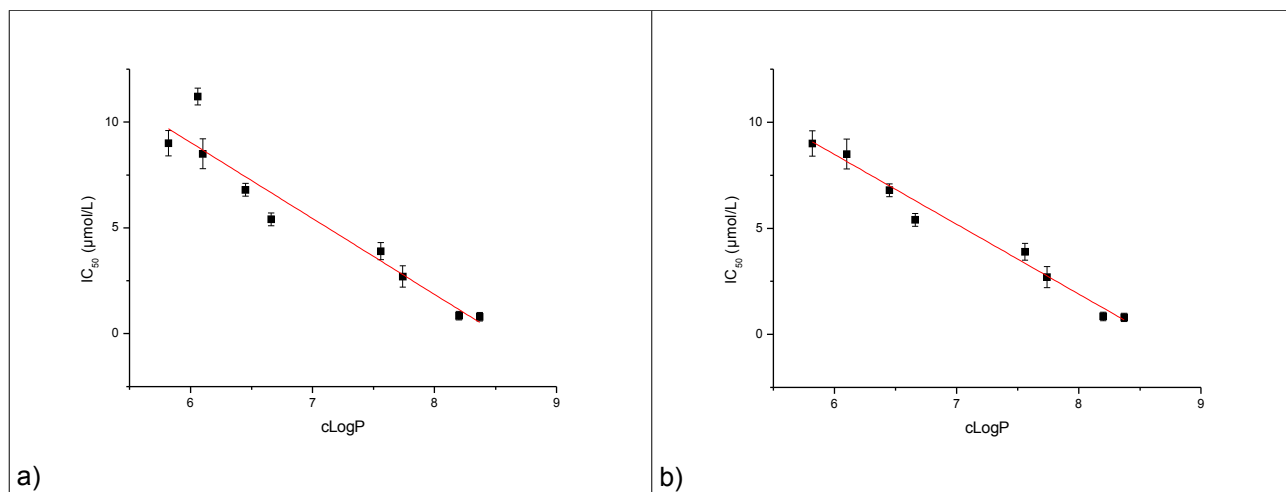


Abbildung 5.23: Abhängigkeit von cLogP und IC₅₀ (Graphisch dargestellt über Origin ®)

Verbindung	cLogP	IC ₅₀	Abweichung
1	6,06	11,2	0,4
2	6,45	6,8	0,3
3	8,20	0,85	0,2
4	7,56	3,9	0,4
6	5,82	9,0	0,6
7	7,74	2,7	0,5
16	6,66	5,4	0,3
17	8,37	0,8	0,2
21	6,10	8,5	0,7

Tabelle 5.24: 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole: Zusammenhang zwischen cLogP und IC₅₀-Wert

In Abb. 5.23a ist der Zusammenhang zwischen den cLogP-Werten der lipophil substituierten (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole und deren IC₅₀-Werten dargestellt. Der Korrelationsfaktor R² errechnet sich zu 0.875. Eine Analyse der Daten zeigt dann, dass vor allem Verbindung **1** schlecht zu korrelieren ist. Wird **1** (Abbildung 5.23 b) nicht berücksichtigt, steigt der R²-Wert auf 0.949.

Ferner ist zu erkennen, dass die Verbindungen umso zytotoxischer sind, je lipophiler sie zu sein scheinen. Zudem scheint die Substitution des Aromaten in Position 4 die Zytotoxizität gegenüber der unsubstituierten Verbindung **1** zu fördern.

Lipophile Substanzen können in die ebenfalls lipophilen Zellmembran eingelagert werden und diese stabilisieren oder destabilisieren. Um zu entscheiden, ob dies für 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole zutrifft, könnte die Zellaufnahme einer zweiten Substanz bestimmt werden. Dabei werden Zellen mit beiden Substanzen inkubiert. Wird die Membran durch 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole stabilisiert oder destabilisiert, erniedrigt bzw. erhöht sich die Zellaufnahme der 2. Verbindung.

Um die 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole selbst detektieren zu können, müssen diese markiert werden. Dies kann einerseits durch einen Fluoreszenzmarker erfolgen. Jedoch werden in der Regel damit die pharmakologischen Eigenschaften verändert. Andererseits kann aber auch das Molekül an Metalle koordiniert werden, die dann mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) quantifiziert werden können. Zu denken wäre an eine Komplexierung von Verbindung **28** an einen Dicobalthexacarbonyl-Cluster. In einer vorangehenden Arbeit [12] konnte gezeigt werden, dass dies bei analogen 4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazolen nicht nur zu einer Wirkungssteigerung, sondern auch zu einer gut detektierbaren Substanz führt.

5.3.2 Die Cyclooxygenasen (COX1/COX2)

Als weiteres Target kommt die Cyclooxygenase in Frage, die hauptsächlich in zwei Isoformen vorkommt: COX1 und COX2. Während die COX1 konstitutiv ist, wird die COX2 erst durch bestimmte Stimuli exprimiert.

Sehr wirksame Hemmstoffe dieser Enzyme bestehen aus einem heterozyklischen Zentrum und wenigstens zwei aromatischen Resten (siehe z.B. Abb. 5.28 [46]). Dass über eine COX-Hemmung antiproliferative Wirkungen entfaltet werden können, ist auf den ersten Blick nicht offensichtlich, da die Cyclooxygenasen die Zyklisierung von Arachidonsäure zu Prostaglandinderivaten katalysieren. Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Schmerz und Entzündung.

Die COX ist ein membranständiges, glykosyliertes Homodimer-Protein. Seine katalytische Domäne wird als „Haarnadel“ beschrieben [47]. Eine relativ enge Röhre kontrolliert dabei den Zugang eines Moleküls zur eigentlichen Ligandenbindungsstelle, die sich im Inneren des Moleküls befindet und im Gegensatz zur Röhre kugelig verbreitert ist. Die beiden Isoenzyme COX1 und COX2 sind sich im Aufbau sehr ähnlich, aber das aktive Zentrum der COX2 wird als etwas größer als die der COX1 beschrieben, so dass hier ein Ansatzpunkt für eine Selektivität gegeben sein könnte [47].

Zusammenhang mit Krebs:

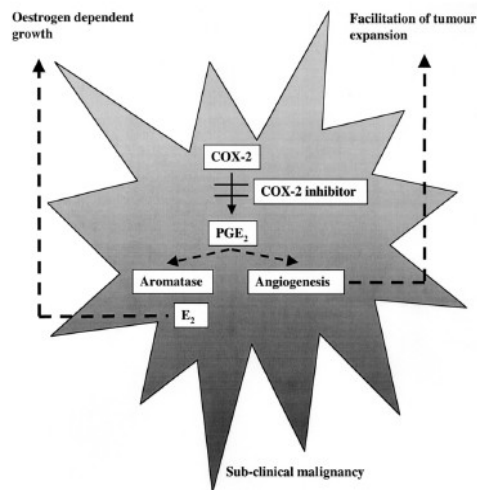
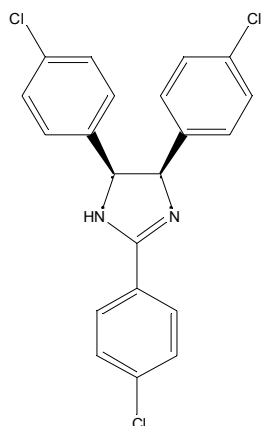


Abbildung 5.25: Zusammenhang zwischen COX2, Aromatase und Brustkrebs [48]

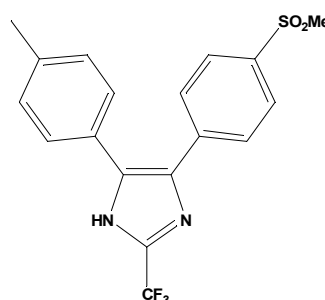
Sowohl bei Darmkrebs als auch bei Brustkrebs hat man erhöhte COX-2 Spiegel vorgefunden [48]. Abbildung 5.27 verdeutlicht, dass durch die COX2 mehr von dem Prostaglandinderivat PGE₂ gebildet wird. Dadurch wird nicht nur die Angiogenese des Tumors gefördert, sondern auch die Bildung des Enzyms Aromatase, das für die vermehrte Bildung von Estrogenen verantwortlich ist. Da $\frac{3}{4}$ aller Brustkrebstumore estrogenabhängig sind, könnte ein COX2-Inhibitor helfen, die Bildung von E₂ zu minimieren und die Angiogenese eines Tumors zu unterdrücken.

Zusätzlich wird in der neueren Literatur beschrieben, dass eine Wirkstoff-COX-Interaktion auch direkte Auswirkungen auf das humane double-minute protein HDM2 (siehe unten) hat. So wurde beschrieben, dass die Hemmung von COX2 mit einer erniedrigten Phosphorylierung von Ser166 und damit einer verlängerten Halbwertszeit von p53 verbunden ist [49].

Strukturelle Ähnlichkeit:



Verbindung 3



Imidazol 17.12 [46]

Abbildung 5.26: Vergleich von Verbindung (3) mit Imidazol 17.12

In Abbildung 5.26 sind Verbindung **3** und eine in der Literatur beschriebene Struktur mit inhibitorischen Eigenschaften für die COX abgebildet [46]. Beiden Verbindungen gemeinsam ist der 4,5-Diarylimidazol-Grundkörper. Der Aromat in Position 4 des Heterozyklus trägt jeweils einen lipophilen para-Substituenten (Chlor – Methyl). Im 4-Arylring des COX-Hemmers befindet sich im Gegensatz zu **3** noch eine Methylsulphonylgruppe, in Position 2 entweder eine Trifluormethyl- oder ein 4-Chlorphenylring. Es muss aber erwähnt werden, dass sich die Größe der Reste doch deutlich unterscheidet. Außerdem sind die in dieser Arbeit vorliegenden 4,5-Dihydroimidazole aufgrund ihrer Stereochemie (4R,5S)/(4S,5R) gewinkelt, während der COX-Hemmer planar ist. Trotzdem lässt die Ähnlichkeiten dieser Verbindungen auf eine Beeinflussung der COX-Aktivität durch 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole schließen.

Zusammenfassung und Ausblick:

Um diese Wirkungen abschätzen zu können, sollte mit ausgewählten Substanzen ein Test auf Cyclooxygenasehemmung durchgeführt werden. Zusätzlich könnte man in weiterführenden Arbeiten die entsprechenden planaren d,l-Verbindungen herstellen, was die strukturelle Analogie zu COX-Hemmern weiter erhöht.

5.3.3 Das humane oder murine double minute protein (HDM2/MDM2)

Das Zellwachstum wird durch verschiedene Gene und deren Produkte reguliert. Dabei unterscheidet man zwischen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Jede Zelle unterliegt dabei einem bestimmten Zellzyklus, der an charakteristischen Punkten, den Kontrollpunkten, angehalten werden kann.

Die Kontrollfunktion wird durch Cycline und cyclinabhängige Kinasen ausgeübt. Das wichtigste Kontrollprotein ist p53, dessen Name sich auf seine Molmasse von 53 kD bezieht und den Zellzyklus stoppt. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Funktion von p53 in 50% aller Tumore nicht gegeben ist [49], weswegen es seine Kontrollfunktion nicht mehr erfüllen kann. Wird p53 in den Zellen zu stark angehäuft, so wird nach Hinzukommen weiterer Faktoren die Apoptose ausgelöst [50].

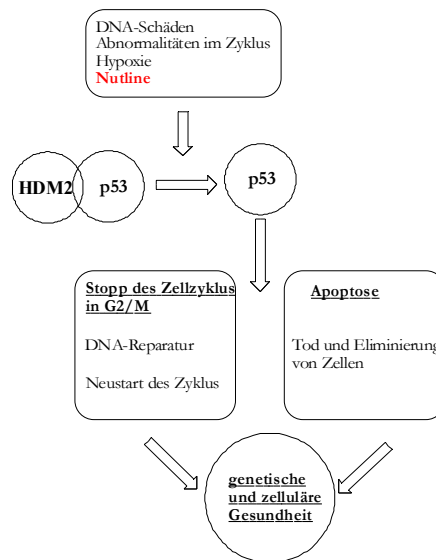


Abbildung 5.27: Zusammenspiel von HDM2 und Protein p53 [nach 27]

p53 wird dabei durch das humane double minute protein 2 (HDM2) kontrolliert. In einer gesunden Zelle inaktiviert das HDM2 p53, indem es einen Komplex mit dem Protein bildet [51]. Dabei bindet HDM2 an die N-terminale Transaktivierungsdomäne von p53.

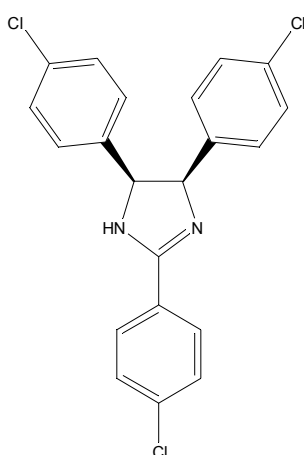
HDM2 ist nicht nur ein Inhibitor des Tumorsuppressorproteins p53, sondern auch eine Ubiquitin-Ligase. Diese Enzymklasse markiert Proteine, die zum Abbau durch das Proteasom bestimmt sind.

So erfüllt HDM2 zwei Funktionen: Zum einen wird die Aktivierung von p53 verhindert und gleichzeitig wird der Abbau von p53 begünstigt. Aus diesem Grund wird die Halbwertszeit von gesundem p53 (wild-type, wt-p53) mit wenigen Minuten angegeben [49].

Die MCF7-Zelllinie ist eine wt-p53 überexprimierende Zelllinie [51], wohingegen die Zelllinien MDA-MB231 und HT29 ein mutiertes und damit unempfindlicheres p53 exprimieren [52, 53]. MCF7-Zellen reagierten in den Zweipunktbestimmungen auf 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole leicht bevorzugt.

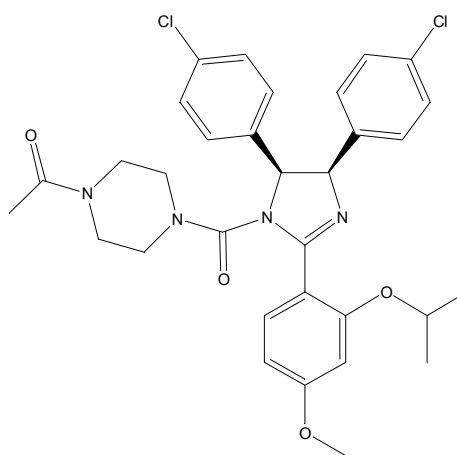
Wird die Zelle geschädigt, wird nicht nur p53 aus dem Komplex mit HDM2 freigesetzt, sondern auch sein Abbau verhindert, indem HDM2 sich selbst zum Abbau markiert. So kann aufgrund der höheren p53-Level in der Zelle ein Zellzyklusarrest stattfinden. Die Zelle wird daraufhin entweder „repariert“ oder, wenn eine Reparatur nicht möglich ist, dem Zelltod durch Apoptose zugeführt. Der Kontrollmechanismus beruht auf einer Patrouille des p53-Tetramers und der DNA-Polymerase I entlang des DNA-Stranges [42]. Erweist sich die Zelle als irreparabel, aktiviert p53 eine apoptotische Enzymkaskade, in der insbesondere das bax-Protein eine herausragende Rolle spielt [42]. Ein alternatives Modell der p53-vermittelten Apoptose bezieht sich auf die Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies und den oxidativen Abbau mitochondrialer Komponenten.

Strukturelle Ähnlichkeit



Verbindung 3:

cLogP = 8,19
M_R = 400 g/mol



Nutlin 3

cLogP = 8,08
M_R = 608 g/mol[54]

Abbildung 5.28: Strukturelle Ähnlichkeit zwischen Nutlinen (HDM2 – Antagonisten) und in dieser Arbeit synthetisierten 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen

In letzter Zeit wurden verstärkt kleine Moleküle beschrieben, die in der Lage sind, über HDM2 vermittelt Apoptose auszulösen [54,55]. Eine dieser Molekülklassen enthält eine Dihydroimidazol-Partialstruktur. Diese Strukturen werden Nutline genannt, weil sie in Nutley (USA) zum ersten Mal hergestellt wurden [54]. Sie wurden in den Laboren von Roche [55] entwickelt und sind seit einiger Zeit bekannte Inhibitoren von HDM2. Den Nutlinen und den in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen ist das 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazol-Grundgerüst mit (4R,5S)/(4S,5R)-Konfiguration gemeinsam.

Die in der vorliegenden Arbeit wirksamsten Substanzen sind wie die Nutline in Position 4 der Aromaten substituiert. Die wirksamsten Nutline besitzen – wie die Verbindung **3** – Halogenatome in Position 4 der Aromaten an C4 und C5 des 4,5-Dihydroimidazols. Der C2-ständige Aromat hat in 2,4-Position phenolische Gruppen, die mit einer Isopropyl- bzw. einer Methylgruppe verethert sind. Sämtliche Nutline tragen an wenigstens einem N-Atom Substituenten. Dies ist wiederum im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass die N-Alkylierung von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen die Zytotoxizität deutlich erhöht.

Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund dieser starken Ähnlichkeit der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole mit Nutlinen und der Tatsache, dass diese Verbindungen Veränderungen in der Zellmorphologie hervorrufen, die auf Apoptose hindeuten (siehe Kapitel 5.2, Abbildung 5.13), kann man vermuten, dass es sich ebenfalls um Inhibitoren von HDM2 und damit des Tumorsuppressors p53 handelt. Allerdings wären auch nekrotische Effekte kein Gegenargument für eine Interaktion von Triaryl-4,5-dihydroimidazolen mit HDM2 [42].

Es sollten sich daher unbedingt genauere Untersuchungen anschließen, die den Mechanismus des Zelltodes genauer definieren. Ein erster Schritt wäre die Feststellung, ob der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose ausgelöst wird. Beides kann aus Abb. 5.14 abgeleitet werden: Einerseits könnte das Anschwellen der Zellen und ihr anschließendes Schrumpfen auf Nekrose hindeuten, andererseits zeigen sich erste Effekte erst nach 16 h, was eher auf eine Apoptose hinweist.

Da, wie weiter oben beschrieben, die p53-vermittelte Apoptose entweder über das bax-Protein oder über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ausgelöst wird, ist eine Untersuchung beider Wege sinnvoll. In Bezug auf die reaktiven Sauerstoffspezies sollte es möglich sein, das Membranpotential der Mitochondrien zu bestimmen. Aus dessen Veränderung nach Exponierung der Zelle mit den in dieser Arbeit synthetisierten 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen kann eine Bestätigung des Wirkmechanismus erfolgen

5.3.4 Der Purinorezeptor P₂X₇

Der P₂X₇-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal und gehört zu der Gruppe der P₂X-Purinorezeptoren. Im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren der P₂X-Familie ist dieser in der Lage, seine Signale nicht nur über einen Ionenkanal, sondern auch über die Ausbildung einer zytolytischen Pore und von Membranblasen zu vermitteln. Damit spielt der P₂X₇-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulierung der Zelle und bei Krankheiten mit inflammatorischer Komponente. Somit stellen Strukturen, die eine über den P₂X₇-Rezeptor vermittelte Apoptose auslösen können, ein mögliches Therapiekonzept zur Behandlung von Krebs dar [56].

Strukturelle Ähnlichkeit:



Verbindung 3

(4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Dihydroimidazol mit Wirkung auf P₂X₇ [56]

Abbildung 5.29: Strukturelle Ähnlichkeiten von Verbindung 3 mit einem Agonisten von P₂X₇

Abbildung 5.29 zeigt die Strukturähnlichkeiten von Verbindung 3 mit einem bereits beschriebenen P₂X₇-Agonisten. Beide Moleküle enthalten als Kernmolekül das (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazol. SAR-Studien zeigten, dass hoch zytotoxische Wirkungen durch lipophile Substituenten vermittelt werden. Der Substituent an C2 ist beim P₂X₇-Agonisten durch eine Ethankette vom Heterozyklus getrennt. Diese räumliche Trennung scheint für die Rezeptorinteraktion Voraussetzung zu sein. Deshalb ist es eher unwahrscheinlich, dass der P₂X₇-Rezeptor das Target der hier präsentierten 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole ist.

Die in der vorliegende Arbeit synthetisierten (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole zeigen strukturelle Ähnlichkeit zu Agonisten des P₂X₇-Rezeptors. Diese Agonisten sind in der Lage, durch Porenbildung in der Zellmembran Apoptose auszulösen. Da in MCF-7 Zellen nach 20-stündiger Behandlung mit 3 (10⁻⁵ M) Veränderung der Zellmorphologie sichtbar wurden, die denen einer Apoptoseinduktion ähneln, sollte eine Interaktion mit dem Rezeptor nicht generell ausgeschlossen werden. Die Zellen haben ihre natürliche Form verloren und sehen unter dem Lichtmikroskop aus, als seien sie durchlässig geworden und mit Poren versehen (Abbildung 5.30: helle Punkte der Zelle, Durchlichtmikroskop).

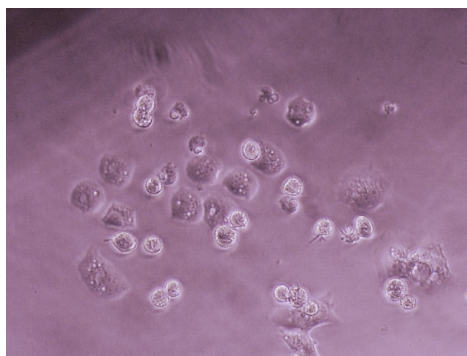


Abbildung 5.30: MCF7 - Zellen 20 h nach Exposition von 10^{-5} M von Verbindung 3

5.4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole synthetisiert und auf Estrogenität, Antiestrogenität und Zytotoxizität getestet. Durch 4-OH Gruppen in Kombination mit 2-F oder 2-Cl Substituenten in den Aromaten sollten Verbindungen geschaffen werden, die durch Interaktion mit dem Estrogenrezeptor Genaktivierung bewirken. Anschließend war geplant, durch basische Seitenketten an einer der phenolischen OH-Gruppen das Wirkprofil eines Antagonisten zu erhalten.

(4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazol **8** ist nahezu unwirksam. Eine leichte, aber signifikante Verstärkung der estrogenen Wirkung kann bei Halogensubstitution in den Aromaten beobachtet werden. Parallel dazu steigt auch die Zytotoxizität.

Auch eine N1-Alkylierung erhöht die Estrogenität leicht. Starke Wirkungssteigerungen wie sie bei 4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazolen beobachtet wurden blieben aber aus.

Die Einführung von basischen Seitenketten in den Aromaten in Position 5 des (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazols **8** führt zu einem Verlust der estrogenen Aktivität. Die estrogenen Wirkung bleibt erhalten, wenn die basische Seitenkette in den Aromaten in Position 2 des 4,5-Dihydroimidazols eingeführt wird. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch (4R,5S)/(4S,5R)-Triaryl-4,5-dihydroimidazole Estrogene vom Typ II sind. N-alkylierte (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole mit basischen Seitenketten zeigen sowohl in der monoalkylierten als auch in der bisalkylierten Form weder estrogenen, antiestrogenen noch zytotoxischen Wirkungen.

Da sich anhand der halogenierten 2,4,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazole gezeigt hatte, dass mit der Erhöhung der Lipophilie die Zytotoxizität steigt, wurden unterschiedlich substituierte (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole synthetisiert. Anhand dieser Verbindungen wurden die Beziehungen zwischen Struktur und zytotoxischer Aktivität untersucht. Verbindung **1** wurde als Leitstruktur definiert.

In einer Voruntersuchung ergab sich, dass der C2-Phenylring von hoher Bedeutung für die Zytotoxizität ist. Aus Verbindung **1** wurden Derivate synthetisiert, die jeweils in den Positionen 2', 3' und 4 substituiert waren. Dabei stellte sich heraus, dass in Position 4 der Aromaten halogenierte (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole gegenüber anderen Positionen am Aromaten und anderen Substituenten am potentesten waren.

Daraufhin wurden die Substituenten in Position 4 der Aromaten modifiziert und es konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität von der Lipophilie der Verbindungen korreliert. Die Wirkung tritt dabei meist innerhalb von 48 Stunden ein. Untersuchungen der Zellmorphologie nach Exposition mit (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen deuten auf Apoptose hin, lassen aber noch keine eindeutige Aussage zu.

Die Zytotoxizität von (4R,5S)/(4S,5R)-Triaryl-4,5-dihydroimidazolen erhöht sich durch N-Alkylierung. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied im IC₅₀-Wert von N-Monoalkylierung und N,N'-Dialkylierung festgestellt werden. Die unterschiedlichen zeitabhängigen Zytotoxizitäts-Konzentrationsverläufe deuten aber auf einen unterschiedlichen Wirkmechanismus von hin.

Hydrophile (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole zeigen mit Ausnahme der Verbindungen **5** und **43** keine Proliferationshemmung. Die Zytotoxizitäts-Zeitverläufe ähneln denen der bisalkylierten Verbindungen (steile Konzentrations-Wirkungskurve und ein langsames Absinken des IC₅₀ über die gesamte Messdauer hinweg). Die Zytotoxizität von lipophilen Verbindungen setzt hingegen schnell ein und führt zu charakteristischen Veränderungen in der Zellmorphologie, die photographisch dokumentiert wurden. Diese Veränderungen in der Zellmorphologie, die innerhalb von 24 Stunden zum Absterben der Zellen führen, können verschiedene Ursachen haben. Aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten der synthetisierten Verbindungen zu bekannten Verbindungen, z.B. Inhibitoren des humanen/murinen double minute Proteins (HDM2/MDM2) sollten weitere Untersuchungen über den Zelltod in die Wege geleitet werden.

Kapitel 6: Methoden

Kapitel 6.1: Materialien

Geräte und Verbrauchsmaterial

Die Edukte der hergestellten Produkte wurden bezogen von den Firmen:

- Acros
- Alfa Aesar
- Lancaster
- Merck
- Sigma Aldrich

Die Identität und Reinheit der hergestellten Substanzen wurde mit folgenden Geräten / Materialien hergestellt oder überprüft:

Methoden	Materialien	Firma
Säulenchromatographie	Kieselgel 60, neutrales Al ₂ O ₃	Merck
Dünnschichtchromatographie	Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck
Chromatotron	Kieselgel 60 PF ₂₅₄ mit Gipszusatz	Merck
	Chromatotron	Harrison Research
NMR-Spektroskopie	Advance DPX 400	Bruker
Massenspektroskopie	MS 25 RV (80 eV)	Kratos
	CH7A-Varian MAT (70 eV)	Varian
IR-Spektroskopie	ATI Mattson Serie Genesis	Mattson
Elementaranalyse	Elementaranalysator 240 B	Perkin Elmer
Schmelzpunktbestimmung	Melting Point B 545	Büchi

NMR- Spektroskopie:

Die verwendete Messfrequenz betrug 400 MHz. Das für die Messung verwendete Lösemittel wird gesondert bei den Substanzdaten aufgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben, wobei Tetramethylsilan (TMS) als interner Standard diente. Es gelten folgende Abkürzungen: s = Singulett, d = Duplett, dd = Duplett vom Duplett, t = Triplett, m = Multipllett. nJ gibt den Betrag der Kopplungskonstante über n Bindungen an.

Massenspektrometrie:

Es wird jeweils die Verdampfungstemperatur und die relative Signalintensität angegeben.

Infrarotspektroskopie:

Die Frequenzangaben erfolgen in cm^{-1} . Es gilt: w = schwach, m = mittel, s = stark, br = breit, sh = scharf

Die synthetisierten Verbindungen wurden mittels folgender Materialien pharmakologisch getestet:

Geräte	Analysewaage BP211D Autoklav 1540 ELV CO ₂ Begasungsbrutschrank Einkanal- und Mehrkanalpipetten Inversmikroskop Axiovert 25 Mikroplattenreader FlashScan S12 pH-Meter 410 A Pipettierhilfe Pipettboy Schüttler LS 10 Sterile Werkbank LaminAir™ HB1448 Thermomixer Comfort Vakuumpumpe Vortexer	Sartorius Tutthauer Heraeus Eppendorf Zeiss Analytik Jena Orion Hirschmann Gerhardt Heraeus Eppendorf KNF Heidolph
Verbrauchsmaterial	96-Well-Platten (steril) Einmalkanülen Einmalspritzen Pasteurpipetten Pipettenspitzen Reaktionsgefäße 1,5mL Reaktionsgefäße 2,0 mL Serumpipetten 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL Zellkulturflaschen 75 cm ²	Nunc Braun Braun Brandt Eppendorf TPP Eppendorf TPP Falcon
Chemikalien und Lösungen	17 β - Estradiol DMEM DMF DMSO FCS Glutardialdehyd, wässrige Lösung 25% Kristallviolett, 0,02% in H ₂ O _(bidest.) Trypsinreagenz (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS)	Sigma Nalgene Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Bio Wittaker Merck Merck ICN
Puffersysteme	PBS (Phosphate buffered saline)	Herstellungsvorschrift des AK Gust

Kapitel 6.2: Chemische Methoden

Synthesen für 2,4-Diazapentadiene

Methode A:

Der Aldehyd wird in einem Überschuss gesättigter, wässriger Ammoniaklösung emulgiert oder suspendiert. Man lässt die Mischung mindestens 24 Stunden rühren. Das 2,4-Diazapentadien wird sich als Feststoff abscheiden. Der Feststoff wird abfiltriert und getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Ethanol.

Methode B:

Ammoniumchlorid wird in ethanolischer NaOH gelöst, so dass eine gesättigte Lösung entsteht. Der entsprechende Aldehyd wird darin gelöst, woraufhin noch ein wenig Ammoniumchlorid und NaOH zugegeben werden. Mindestens 24 Stunden rühren lassen. Abfiltrieren und testen, in welcher Phase sich das DAP befindet. Isolieren und in wenig Ethanol umkristallisieren. Im Falle empfindlicher Substituenten kann eine Mischung aus Ammoniumchlorid und Ammoniumacetat verwendet werden, um eine Pufferwirkung zu erzielen.

Synthesen für 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole:

Methode C:

Das sorgfältig getrocknete 2,4-Diazapentadien wird in absolutem THF (5-10 mL pro mmol) gelöst und auf 0° C gekühlt. Man gibt 1,5 Äquivalente tButOK dazu. Dabei beobachtet man eine intensive Färbung (blau oder violett). Nach Abklingen der Färbung zu einem satten Gelb gießt man die Lösung auf die drei bis vierfache Menge demineralisiertes Wasser und lässt das Gemisch rühren. Entweder fällt das 4,5-dihydro-1H-imidazol als Feststoff aus und ist somit filtrierbar, oder es muss durch Ausschütteln mit CH₂Cl₂ und anschließendem Trocknen mit Natriumsulfat gewonnen werden. Die Aufreinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Ethylacetat / Hexan – Gemischen.

Methode D:

Der entsprechende Aldehyd wird mit basischem Al₂O₃ (20 mg pro mmol) und 1,5 Äquivalenten Hexamethyldisilazan (HMDS) vermischt und in einem Ölbad 6 h bei 120 ° erhitzt. Man lässt die Mischung abkühlen und löst sie dann in CH₂Cl₂ auf. Das Al₂O₃ wird daraufhin abfiltriert und das Filtrat einrotiert. Die Aufreinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol – Gemischen.

Methode E:

Der Aldehyd (es eignen sich nur in ortho disubstituierte Aldehyde hierfür) wird mit Ammoniumacetat und basischem Aluminiumoxid 6 h bei 120 °C erhitzt. Dann weiter wie bei Methode B.

Methode F:

Bis(methoxyphenyl)ethylendiamin und 1,1 Äquivalente Aldehyd werden in Methanol gelöst. Zu der Lösung werden 2 Äquivalente Kaliumcarbonat gegeben. Man lässt diese Suspension 15 Minuten rühren und gibt dann 1,1 Äquivalente methanolische Iodlösung, die 0,25 mol% Iodid enthält, dazu. Der Ansatz wird eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Danach gießt man den Ansatz auf die 3-4fache Menge Wasser. Überschüssiges Iod wird unter Zugabe von 10 % (m/m) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zerstört und der Ansatz mit Methylchlorid ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen mit Natriumthiosulfat wird einrotiert. Die Aufreinigung erfolgt über Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan / Methanol – Gemischen

N-Alkylierung von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen:

Methode G:

Das sorgfältig getrocknete Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazol wird in THF_{abs} aufgelöst (20 mL pro mmol) und mit Hilfe eines Eis/NaCl-Gemisches unter 0°C abgekühlt. Unter Schutzgasung mit Argon werden 3 Äquivalente n-Butyllithium hinzugefügt. Nach einer Viertelstunde werden 6 Äquivalente eines in THF_{abs} gelösten Alkylhalogenids über eine halbe Stunde zugetropft. Die Kühlung wird dabei aufrecht erhalten. Man lässt die Mischung auf Raumtemperatur kommen und dispergiert noch weitere 9 h.. Nach vorsichtiger Hydrolyse des n-Butyllithiums mit MeOH rotiert man ein. Das 4,5-dihydro-1H-imidazol wird aus einem Methanol/Petrolether-Gemisch umkristallisiert.

Methode H:

Das Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazol wird in Acetonitril gelöst (5 – 10 mL pro mmol). Pro mmol gibt man 50 mg Kronenether (18-Krone-6) und 2,5 Äquivalente Kaliumcarbonat hinzu. Nach 15 Minuten gibt man das Alkylhalogenid über eine Spritze zu und kocht dann 4 h unter Rückfluss. Die abgekühlte Lösung wird filtriert und einrotiert. Das 4,5-dihydro-1H-imidazol wird aus einem Ethanol/Diethylether - Gemisch umkristallisiert.

Entschützung von 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazolen:

Methode J:

Das sorgfältig getrocknete 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazol wird in absolutem CH_2Cl_2 (10 mL pro mmol) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Über einen Tropftrichter werden 4-5 Äquivalente BBr_3 , gelöst in CH_2Cl_2 absolut (5 mL pro mmol) zugetropft. Danach entfernt man die Eiskühlung und lässt das Gemisch 3 – 4 h rühren (Blasenzählerkontrolle). Danach kühlt man wieder auf 0°C und hydrolysiert das überschüssige Bortribromid mit Methanol. Dabei wird vorsichtig Methanol zugetropft, bis das entschützte 4,5-dihydro-1H-imidazol sich am Boden zusammenballt. Der Überstand wird abgossen. Das 4,5-dihydro-1H-imidazol wird aus $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ umkristallisiert.

Einführung basischer Seitenketten in 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole

Methode K

Das sorgfältig getrocknete 4,5-dihydro-1H-imidazol wird in absolutem Methanol (10 mL pro mmol) gelöst. Unter Argon – Schutzbegasung gibt man 3 Äquivalente $t\text{BuOK}$ und 6 Äquivalente des entsprechenden Alkylhalogenids, gelöst in absolutem Methanol, dazu. Danach 3-4 Stunden unter Rückfluss kochen. Abfiltrieren und bis zur Hälfte einrotieren. Dann das 4,5-dihydro-1H-imidazol durch die Zugabe von etherischer HCl ausfällen. Abfiltrieren und den Rückstand trocknen. Die Aufarbeitung erfolgt durch Chromatotron und einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten.

Kapitel 6.3

Pharmakologische Methoden

Kultivierung der Zellen:

Die Zellen werden in sterilen Gewebekulturflaschen mit 25 cm² Wachstumsfläche in wasserdampfgesättigter, 5% CO₂-haltiger Atmosphäre bei 37 °C gezüchtet. Als Nährmedium gilt hierbei für alle Zellen Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit Phenolrot als Indikator für die Gesundheit der Zellen.

Die Passage der Zellen erfolgt kurz vor der Konfluenz. Dafür sind die Zellen in regelmäßigen Abständen unter dem Lichtmikroskop zu kontrollieren. Zum Passagieren wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 mL Trypsin versetzt. Dieses wird sofort wieder abgesaugt und die Zellen 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach lassen sich die Zellen durch Klopfen von der Zellkulturflasche lösen und werden in 5 mL Medium aufgenommen.

Diese Zellsuspension wird zum Aussäen der Platten verwendet oder verdünnt weiterkultiviert. In Abhängigkeit von der Zelllinie ist nach 4-7 Tagen die Konfluenz erneut erreicht.

Zum Aussäen der Zellen wird die Zellanzahl pro mL bestimmt. Dazu werden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und somit die benötigte Menge an Zellsuspension errechnet. Diese wird mit der entsprechenden Menge an Medium verdünnt und mit einer Mehrkanalpipette auf die einzelnen wells verteilt.

Dabei ergab sich folgendes Muster:

Zelltyp	Konfluent nach	Zellanzahl pro well	Verdünnungsfaktor:
MCF7	7 Tagen	750	1:10
MCF7-2a	7 Tagen	1000	1:10
MDA	7 Tagen	450	1:10
HT29	4 Tagen	450	1:10

Zweipunktbestimmung

Hierbei wurden 96 – Loch – Platten verwendet. Es wurde eine charakteristische Anzahl Zellen pro Loch ausgesät. Hierbei galt:

Die Substanzzugabe erfolgt 72 h nach der Aussaat. Es wird immer CDDP als Referenz, sowie DMF und DMSO als Lösemittelkontrolle mit inkubiert. Dabei wird nach folgendem Schema vorgegangen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		DMF	10			DMSO	10		Substanz 4	10		
B		CDDP	0,31			DMSO	20		Substanz 4	20		
C		CDDP	0,63		Substanz 1	10			Substanz 5	10		
D		CDDP	1,25		Substanz 1	20			Substanz 5	20		
E		CDDP	2,5		Substanz 2	10			Substanz 6	10		
F		CDDP	5		Substanz 2	20			Substanz 6	20		
G		CDDP	10		Substanz 3	10			Substanz 7	10		
H		CDDP	20		Substanz 3	20			Substanz 7	20		

Pipettierschema 6.1: Die Zahlen geben die zugegebene Menge in μmol an.

Nach 96 h Inkubation erfolgt das Abstoppen des Versuches. Dabei wird das überstehende Medium abgesaugt und 100,0 μL einer wässrigen Glutaraldehydlösung in jedes Well pipettiert. Diese Lösung fixiert die noch übriggebliebenen Zellen auf dem Plattenboden.

Danach werden die so fixierten Zellen mit Kristallviolettlösung gefärbt. Die überschüssige Färbelösung wird mit Wasser ausgewaschen, wobei nur die gefärbten Zellen zurückbleiben. Der Farbstoff wird durch eine 70%ige Ethanolösung aus diesen wieder herausgelöst und die Absorption der nunmehr ethanolisch-wässrigen Kristallviolettlösung bei 540 nm gemessen. Aus den gegebenen Daten wird der TC_{corr} – Wert für die beiden Konzentrationen errechnet.

Bestimmung der zeitabhängigen Zytotoxizität:

Erwies sich eine Substanz in der Zweipunktbestimmung als toxisch (Hemmung von mehr als 50% der Zellen unter 20 µmol / L), wurden weitergehende Untersuchungen veranlasst. Ziel dieser Untersuchungen war es, sowohl den Zeitpunkt der maximalen Toxizität als auch den genauen Wert der halbmaximalen Hemmkonzentration zu bestimmen.

Hierzu wurden 6 Platten (96 Löcher pro Platte) ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Die Zellanzahl pro well entspricht der Zellanzahl pro well bei der 2-Punkt-Bestimmung. Nach 96 h erfolgte die Substanz-Zugabe. Als Referenz wurde CDDP verwendet. Hierbei galt folgendes Pipettierschema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	DMF	CDDP	CDDP	CDDP	CDDP	CDDP	DMSO	S1	S1	S1	S1	S1
E	10	0,63	1,25	2,5	5	10	10	0,63	1,25	2,5	5	10
F												
G												
H												

Pipettierschema 6.2: die angegebenen Zahlen geben die Menge in µmol an

Die so ausgesäten Platten wurden in regelmäßigen Abständen (48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h) abgestoppt. Die Färbung und Auswertung der Platten erfolgte analog zu den Platten der Zweipunktbestimmung. Der Tag mit dem „geringsten“ IC₅₀ – Wert wurde als Zeitpunkt der maximalen Toxizität bestimmt. Zudem wurde so der genaue Wert der halbmaximalen Hemmkonzentration berechnet.

Die relative prozentuale Wachstumshemmung (T/C_{kor}) wird in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Sie wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{(T)}{(C_{kor})} = \frac{(T^x - C_0)}{(C^x - C_0)} * 100$$

T* = Mittelwert der Absorptionen der Kristallviolettlösung der behandelten Kulturen

C^x = Mittelwert der Absorptionen der Kristallviolettlösung der Kontrollen (reines Lösemittel)

C₀ = Mittelwert der Absorptionen der Kristallviolettlösung der Kulturen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe

Zytozide Verbindungen zeigen einen geringeren Mittelwert der Absorption von T als der Ausgangswert C₀.

Bestimmung des IC₅₀ :

Anhand der vorhergehenden Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration wurde der Zeitpunkt der maximalen Zytotoxizität (z.B. nach 48 h) bestimmt. Die Berechnung des IC₅₀ erfolgte daraufhin an diesem Zeitpunkt. Die zeitabhängige Bestimmung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wurde ebenfalls dazu benutzt, um die passenden Konzentrationen für den IC₅₀ auszuwählen (z.B. von 0,32 µmol/L bis 10 µmol/L).

Daraufhin wurde eine weitere Bestimmung zum ausgewählten Zeitpunkt (z.B. 48 h) im ausgewählten Konzentrationsbereich (0,32 bis 10 µmol/L) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen, die Zugabe der Substanzen und das Abstoppen des Versuches werden genau wie bei der Zweipunktbestimmung oder der Bestimmung der zeitabhängigen Konzentrations-Wirkungskurve durchgeführt. Je nach individuell ausgewähltem Konzentrationsbereich erfolgt die Messung in 5 oder 6 Konzentrationen. Die T/C_{corr} -Werte [%] werden auf diese Weise drei mal bestimmt, ausgewertet und der Mittelwert zur Bestimmung des IC₅₀ benutzt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMF						DMSO					
B	DMF	CDDP	CDDP	CDDP	CDDP	CDDP	DMSO	S2	S2	S2	S2	S2
C	DMF	0,63	1,25	2,5	5	10	DMSO	0,63	1,25	2,5	5	10
D	DMF						DMSO					
E	DMSO						DMSO					
F	DMSO	S1	S1	S1	S1	S1	DMSO	S3	S3	S3	S3	S3
G	DMSO	0,63	1,25	2,5	5	10	DMSO	0,63	1,25	2,5	5	10
H	DMSO						DMSO					

Pipettierschema: Bestimmung des IC₅₀ in 5 Konzentrationen für drei Substanzen mit gleichem Zeitpunkt der maximalen Hemmung (z.B. 48 h),(Konzentrationen in µmol/L)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMF 0,1%			DMSO 0,1%				DMSO 0,1%				
B		CDDP	0,32			S1	0,32			S1	0,32	
C		CDDP	0,63			S1	0,63			S1	0,63	
D		CDDP	1,25			S1	1,25			S1	1,25	
E		CDDP	2,5			S1	2,5			S1	2,5	
F		CDDP	5			S1	5			S1	5	
G		CDDP	10			S1	10			S1	10	
H	frei	frei	frei	frei	frei	frei	frei	frei	frei	frei	frei	frei

Pipettierschema: Bestimmung des IC₅₀ in 6 Konzentrationen für 2 Substanzen mit gleichem Zeitpunkt der halbmaximalen Hemmung (Konzentrationen in µmol/L)

Dieser Test wird wie die vorhergehenden Testungen mit Hilfe des Kristallviolettassays ausgewertet. Die T/C_{corr} -Werte [%] werden gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Danach erfolgt über Origin® ein sigmoidaler Fit (verwendeter Parameter: Dose-Resp-fit). Anhand dieser extrapolierten Kurve kann über einen Algorithmus des Programmes der IC_{50} berechnet werden.

Estrogenität

Die Testung auf Estrogenität findet an MCF7-2a- Zellen statt. Diese sind stabil mit dem ERE_{Luc} wt Reporter-gen transfiziert. Sie werden in DMEM ohne Phenolrotzusatz mit 5% FCS kultiviert und in 96 Lochplatten ausgesät. Während der Testphase wird DMEM mit 5% ct FCS verwendet. Hierbei wurde FCS mit Aktivkohle behandelt (ct = charcoal treated), damit die natürlicherweise im FCS vorkommenden Estrogene den Test nicht stören können. Da eine Kultivierung mit ctFCS dauerhaft nicht möglich ist, werden die Zellen 3 Tage vor Testbeginn auf ct – FCS - haltiges Medium umgestellt.

Dazu werden die auf weissen Zellplatten ausgesäten Zellen nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in ct – FCS - haltigem DMEM aufgenommen. Danach bestimmt man die Zellanzahl und stellt die erhaltene Zellsuspension auf $0,5 \cdot 10^4$ Zellen / mL ein. Je 0,1 mL der so hergestellten Zellsuspension werden in die 60 inneren Wells der Platte pipettiert, die äußeren Wells werden mit der gleichen Menge sterilen PBS gefüllt. Das hat zum Ziel, eventuelle Aufkonzentrierungseffekte durch verdampfendes Medium am äußeren Rand der Platte zu minimieren.

Pro Platte können drei Substanzen inklusive der Positivkontrolle Estradiol getestet werden. Es wird nach folgendem Pipettierschema vorgegangen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Estradiol 10^{-7} M			Substanz 1 10^{-5}			Substanz 2 10^{-5}			LM 0,1%	
B		Estradiol 10^{-8} M			Substanz 1 10^{-6}			Substanz 2 10^{-6}			LM 0,1%	
C		Estradiol 10^{-9} M			Substanz 1 10^{-7}			Substanz 2 10^{-7}			LM 0,1%	
D		Estradiol 10^{-10} M			Substanz 1 10^{-8}			Substanz 2 10^{-8}			LM 0,1%	
E		Estradiol 10^{-11} M			Substanz 1 10^{-9}			Substanz 2 10^{-9}			LM 0,1%	
F		Estradiol 10^{-12} M			Substanz 1 10^{-10}			Substanz 2 10^{-10}			LM 0,1%	
G		Estradiol 10^{-13} M			Substanz 1 10^{-11}			Substanz 2 10^{-11}			LM 0,1%	
H												

Pipettierschema 6.3 (Konzentrationen in mol/L)

50 Stunden nach der Substanzzugabe beobachtet man ein Maximum an Luciferaseexpression. Für eine weitere Quantifizierung versetzt man die Platte nach Absaugen des Mediums mit 50 μL eines cell lysis buffers und schüttelt 30 Minuten bei 37°C. Danach werden im Luminometer automatisch 50 μL des Substrates injiziert und über die Dauer von 10 Sekunden die Lichtentwicklung gemessen.

Bei der Auswertung wird die relative prozentuale Aktivierung angegeben, wobei die Aktivierung der 10^{-9} M Estradiollösung gleich 100 % gesetzt wird. Als weiterer Bezugspunkt dient die Lösemittelkontrolle, für die 0% Aktivierung angenommen wird. Als Darstellung wird ein Punkt – Linien – Diagramm gewählt, das die relative prozentuale Aktivierung der Testsubstanz in Abhängigkeit von der Konzentration darstellt.

Kapitel 7: Substanzdaten

Kapitel 7.1: Vorstufen der 2,4,5-Triaryl-4,5-Dihydro-1H-imidazole

Die Vorstufen der 2,4,5-Triaryl-4,5-Dihydroimidazole wurden über NMR – Spektroskopie, Massenspektroskopie und ihren Schmelzpunkt charakterisiert. Die Nummerierung der Vorstufen bezieht sich auf die Nummer der Endsubstanz. So ist zum Beispiel **V1** die Diazapentadienvorstufe von Verbindung **1**

Verbindung	Eigenschaften
V1	1,3,5-Triphenyl-2,4-diazapentadien
Synthese	Aus Benzaldehyd über Methode A. Aufreinigung durch Umkristallisation. Ausbeute: 79 %
Eigenschaften	Weisse, kristalline Substanz, leicht hygroskopisch. $M_r = 298$ g/ mol, Schmelzpunkt: 105 °C
HNMR	In $\text{dms}\text{-}d_6$: 5,84 (2H,s, CH-Ar) 7,07-7,26 (5H, ArH) 7,42-7,69 (10,m,ArH) 8,40 (s,2H,N=CH)
V2	1,3,5-Tris(4'-fluorophenyl)-2,4-diazapentadien
Synthese	Aus 4'-Fluorbenzaldehyd über Methode A. Aufreinigung durch Umkristallisation aus Ethanol Ausbeute 57.3 %
Eigenschaften	Weisse, kristalline Substanz. $M_r = 352$ g/mol, Schmelzpunkt: 76-79°C
HNMR	In $\text{dms}\text{-}d_6$: 8.64 (s, 2H,C=NH), 7.94 - 7.90 (m, 4H, ArH), 7.55 – 7.51 (m, 2H, ArH), 7.31 (m, 4H, ArH), 7.20 (m, 2H, ArH), 6.02 (s, 1H, Ar-CH)
	Fluorierte Verbindungen zeigen Multipletts in den aromatischen Bereichen, weil das F^{19} -Isotop ebenfalls NMR-aktiv ist und Kopplungen zu den Protonen erlaubt. Diese können im Spektrum wahrgenommen werden

Verbindung**Eigenschaften**

- V3** **1,3,5-Tris(4'chlorophenyl)-2,4-diazapentadien**
Synthese Aus 4'-Chlorbenzaldehyd über Methode A. Aufreinigung durch Umkristallisation aus Ethanol
Ausbeute 73,4%, $M_r = 400$ g/mol
Eigenschaften Weisse, kristalline Substanz, Schmelzpunkt: 134-136°C
HNMR 8.74 (s, 2H, C=NH), 7.94 (6, 4H, J=8,72, ArH), 7.61 (d, 2H, J=8,63 ArH), 7.31 (d, 4H, J=8,74
ArH), 7.20 (d, 2H, J=8,59 ArH), 6.11 (s, 1H, Ar-CH)
- V4** **1,3,5-Tris(4'methylphenyl)-2,4-diazapentadien**
Synthese Aus 4'-Methylbenzaldehyd über Methode A. Aufreinigung durch Umkristallisation aus
Ethanol Ausbeute 89,4%, $M_r = 340$ g/mol
Eigenschaften Weisse, kristalline Substanz, Schmelzpunkt: 143 °C-145°C
HNMR In MeOH 8.54 (s, 2H, C=NH), 8.04 (6, 4H, J=8,79, ArH), 7.71 (d, 2H, J=8,62 ArH), 7.27 (d,
4H, J=8,81 ArH), 7.09 (d, 2H, J=8,61 ArH), 5,91 (s, 1H, Ar-CH), 2,93 (s, 3H, CH₃), 2,79
(s, 6H, CH₃)
- V6** **1,3,5-Tris(4'methoxyphenyl)-2,4-diazapentadien**
Synthese Aus 4'-Methoxybenzaldehyd über Methode A. Aufreinigung durch Umkristallisation aus
Ethanol Ausbeute 93,6 % $M_r = 388$ g/mol
Eigenschaften Weisse, kristalline Substanz. Aufreinigung durch Umkristallisation aus Ethanol,
Schmelzpunkt: 123-125 °C. Hygroskopisch. Sollte vor der Umsetzung zum 2,4,5-
Triarylimidazol sorgfältig getrocknet werden (Ölpumpe)
HNMR In dmso-d₆ 8.52 (s, 2H, N=CH), 7.78 (d, 4H, J = 8.3, ArH), 7.39 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 7.01
(d, 4H, J = 8.4, ArH), 6.92 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 5.85 (s, 1H, CH), 3.80 (s, 6H, OCH₃), 3.73
(s, 3H, OCH₃)
- V7** **1,3,5-Tris(4'methylthiophenyl)-2,4-diazapentadien**
Synthese Aus 4'-Methylthiobenzaldehyd über Methode A. Aufreinigung durch Umkristallisation aus
Ethanol/Hexan Ausbeute: 47,9 % $M_r = 436$ g/mol
Eigenschaften Weisse Substanz nach Umkristallisation. Hygroskopisch. Erweichungsbereich 112-117 °C
HNMR In dmso-d₆ 8.52 (s, 2H, N=CH), 7.78 (d, 4H, J= 8.39, ArH), 7.39 (d, 2H, J= 8.60, ArH), 7.01
(d, 4H, J=8.75, ArH), 6.92 (d, 2H, J= 8.63, ArH), 5.85 (s, 1H, CH), 2.80 (s, 6H, SCH₃), 2.73
(s, 3H, SCH₃)
- V10** **1,3,5-Tris(3'fluorophenyl)-2,4-diazapentadien**
Synthese Aus 3'-Fluorbenzaldehyd über Methode A. Aufreinigung durch Umkristallisation. Vorsicht:
Substanz verhält sich recht ölig. Ausbeute: 41,3%

Verbindung**Eigenschaften**

Eigenschaften Ölig – viskose Substanz. Nach Umkristallisation aus Ethanol/Hexan und Trocknen an der Ölpumpe glasartig-spröde. Erweichungsbereich: 107-113°C

HNMR In dms_o-d₆ = 5,68 (s, 1H, ArCH), 6,86 (m, 1H, ArH), 6,89-7,00 (m, 4H, ArH) 7,10–7,15 (m, 2H, ArH), 7,42 (m, 2H, ArH), 8,34 (s, 2H, C=NH)

V11**1,3,5-Tris(3'-methoxyphenyl)-2,4-diazapentadien**

Synthese Aus 3'-Methoxybenzaldehyd über Methode A. Aufreinigung durch Umkristallisation. Substanz ölt aus dem Ethanol/Hexangemisch aus.

Eigenschaften Viskose, zäh-wollweisse Substanz. Kein Schmelzpunkt bestimmbar. M_r = 388 g/mol

HNMR In dms_o-d₆ = 3,68 (s, 6H, OCH₃) 3,76 (s, 3H, OCH₃) 5,73 (s, 1H, ArCH), 6,56 (s, 1H, ArH), 6,99-7,06 (m, 4H, ArH) 7,18–7,25 (m, 2H, ArH), 7,33 (s, 2H, ArH), 8,14 (s, 2H, C=NH)

MS Weil kein Schmelzpunkt bestimmbar war, wurde zusätzlich ein MS dieser Vorstufe bestimmt

EI, (60°C): 388 [M]⁺, 374, 239, 224, 210, 120

V12**1,3,5-Tris(2-fluorophenyl)-2,4-diazapentadien**

Synthese Aus 2'-Fluorbenzaldehyd über Methode A. Aufarbeitung durch Säulenchromatographie an Kieselgel. Gradientenelution mit CH₂Cl₂ /MeOH-Gemischen, beginnend bei 98/2 (CH₂Cl₂/MeOH)

Eigenschaften Farblose, amorph-viskose Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar M_r = 352 g/mol

HNMR In dms_o-d₆ = 5,54 (s, 1H, ArCH), 6,76(m, 1H, ArH), 7,01-7,09 (m, 4H, ArH) 7,21–7,28 (m, 2H, ArH), 7,44 (m, 2H, ArH), 8,23 (s, 2H, C=NH)

MS Weil kein Schmelzpunkt bestimmbar war, wurde zusätzlich ein Massenspektrum erstellt:

(EI, 20°C): 352 [M]⁺, 230, 136, 122, 95

V13**1,3,5-Tris(2-chlorophenyl)-2,4-diazapentadien**

Synthese Aus 2'-Fluorbenzaldehyd über Methode A. Aufarbeitung durch Säulenchromatographie an Kieselgel. Gradientenelution mit CH₂Cl₂ /MeOH-Gemischen, beginnend bei 98/2 (CH₂Cl₂/MeOH)

Eigenschaften Farblose, amorph-viskose Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar M_r = 400 g/mol

HNMR In dms_o-d₆ = 5,73 (s, 1H, ArCH), 6,56 (s, 1H, ArH), 6,99-7,06 (m, 4H, ArH) 7,18–7,25 (m, 2H, ArH), 7,33 (s, 2H, ArH), 8,14 (s, 2H, C=NH)

MS Weil kein Schmelzpunkt bestimmbar war, wurde zusätzlich ein Massenspektrum erstellt.

(EI, 60°C): 400 [M]⁺,

Verbindung**Eigenschaften**

V14 **1,3,5-Tris(2-methoxyphenyl)-2,4-diazapentadien**
Synthese Aus 2'-Methoxybenzaldehyd über Methode A. Aufarbeitung durch Säulenchromatographie an Kieselgel. Gradientenelution mit CH₂Cl₂ /MeOH-Gemischen, beginnend bei 98/2 (CH₂Cl₂/MeOH)
Eigenschaften Farblose, amorph-viskose Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar M_r = 388 g/mol
HNMR In dms_o-d₆ =3,65 (s,6H, OCH₃), 3,88(s,3H, OCH₃), 5,34 (s, 1H, ArCH), 6,56 (m, 1H, ArH), 6,76-6,97 (m,4H,ArH) 7,08–7,11 (m, 2H,ArH), 7,19 (m, 2H, ArH), 8,04 (s, 2H, C=NH)
MS Da kein Schmelzpunkt bestimmbar war, wurde zusätzlich ein Massenspektrum erstellt. EI, (60°C): 388 [M]⁺, 374, 239, 224, 210, 120, 107

V15 **1,3,5-Tris(3,4-dimethoxyphenyl)-2,4-diazapentadien**
Synthese Aus 3,4-Dimethoxybenzaldehyd über Methode A. Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Ethanol, Ausbeute: 65,7 %
Eigenschaften Weiße, kristalline Substanz, Schmelzpunkt 134-137°C
HNMR In dms_o-d₆ =3,61 (s,6H, OCH₃), 3,75 (s,6H, OCH₃) 3,88(s,3H, OCH₃) 3,92 (s, 3H, OCH₃), 5,14 (s, 1H, ArCH), 6,56 (d, 2H, ArH), 6,87 (d,2H, ArH) 7,14 (d, 1H,ArH), 7,19 (s, 2H, ArH),7,26-7,32 (d,d,1H,1H, ArH), 7,44 (s,1H,ArH) 8,04 (s, 2H, C=NH)

V37.1 **meso-1,2-Diamino-N,N'-dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan**
Bedeutung Vorstufe zum 1,2-Bis(4'-methoxyphenyl)-ethylen-1,2-diamin für Verbindung 37
Synthese 1 mol Benzil werden in 2 mol Salicylaldehyd gelöst und in wässriger Ammoniaklösung emulgiert. Alternativ können beide Edukte in Ethanol gelöst werden und Ammoniak gasförmig in das Reaktionsgemisch eingeleitet werden. Die Reaktion wird für eine halbe Stunde auf 80 °C gebracht und dann 6h gerührt (bei der Einleitung von Ammoniak) oder abgekühlt und immer wieder umgeschüttelt. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt und mit wenig eiskaltem Ethanol gewaschen
Eigenschaften Gelber, kristalliner Feststoff. M_r =471 g/mol, Ausbeute: 79,3%, Schmelzpunkt:280 °C unter Zersetzung, Smp und NMR-Spektrum stimmen mit [Schlenk] überein.
HNMR: In dms_o-d₆ = 5.87 (s, 2H, ArCH); 6.65 - 6.80 (m, 4H, ArH); 6.95- 7.05 (m, 2H, ArH); 7.35 - 7.70 (m, 12H, ArH); 8.54 (s, 2H, CONH, austauschbar);9.93 (s, 2H, ArOH, austauschbar).

V37.2 **meso-O,O',N,N'-Tetraacetyl-1,2-diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan**
Bedeutung Vorstufe zum 1,2-Bis(4'-methoxyphenyl)-ethylen-1,2-diamin für Verbindung 37
Synthese Verbindung V37.1 (0,8 mol) wird in 800 mol Acetanhydrid (absolut) suspendiert und mindestens 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die hellgelbe Suspension muss dabei eine dunkelbraune Lösung ergeben. Liegt diese dunkelbraune Lösung nicht vor, muss so lange unter Rückfluss erhitzt werden, bis die beschriebene Lösung vorliegt. Danach wird die

Verbindung**Eigenschaften**

Lösung abgekühlt, der nach dem Abkühlen ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit wenig eiskaltem Acetanhydrid gewaschen, bis ein weisses Produkt resultiert. Dieses wird sorgfältig an der Ölpumpe getrocknet.

Eigenschaften Weisser Feststoff, Ausbeute: 51,0%, Schmelzpunkt: 219 °C Smp und NMR-Spektrum stimmen mit [Schlenk] überein.

HNMR In CDCl₃ 1.75 (s, 6H, CH₃CON); 2.41 (s, 6H, CH₃COOAr); 5.58 (s, 2H, ArCH); 6.40 (s, 2H, NH, austauschbar); 7.0 - 7.40 (m, 8H, ArH).

V37.3**meso-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan**

Bedeutung: Vorstufe zum 1,2-Bis(4'-methoxyphenyl)-ethylen-1,2-diamin für Verbindung 37

Synthese Verbindung 37.2 (0,4 mol) wird in 400 mL 47% Bromwasserstoffsäure für 4h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Das resultierende Dihydrobromid wird abfiltriert und mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Der Rückstand wird in 100-150 mL heissem Wasser (70-80°C) aufgelöst. Die Lösung wird abfiltriert, der Rückstand verworfen. Die Lösung wird mit Hilfe von 20% NaOH_{aq} auf einen pH-Wert von 7-8 eingestellt. Das Diamin fällt dabei als weisse Phenolbase aus. Es wird abfiltriert und an der Ölpumpe getrocknet.

Eigenschaften Weisse, feinkristalline Substanz. Ausbeute: 75,3%, M_r = 244 g/mol Schmelzpunkt: 182°C Smp und NMR-Spektrum stimmen mit [Schlenk] überein.

HNMR In dms_o-d₆ 3.35 (s, br, 4H, NH₂, austauschbar); 4.19 (s, 2H, ArCH); 5.30 (s, br, 2H, ArOH, austauschbar); 6.66 (m, 2H, ArH); 6.72 (m, 2H, ArH); 6.97(m, 2H, ArH); 7.05 (m, 2H, ArH).

V37.4**meso-3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)- 2,5-diazahexa-1,5-diene**

Bedeutung: Vorstufe zum 1,2-Bis(4'-methoxyphenyl)-ethylen-1,2-diamin für Verbindung 37

Synthese 0,29 mol Verbindung V37.3 werden zusammen mit 0,6 mol 4-Methoxybenzaldehyd in 600 mL trockenem Acetonitril suspendiert. Man erhitzt 4h unter Rückfluss. Nach dem Abkühlen wird das Acetonitril auf die Hälfte eingeeengt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der entstandene gelbe Feststoff wird abfiltriert und mit eiskaltem Acetonitril gewaschen. Das Produkt wird getrocknet.

Eigenschaften Gelbes, feines Pulver, M_r = 480 g/mol, Schmelzpunkt: 189 °C, Smp und NMR-Spektrum stimmen mit [Schlenk] überein., Ausbeute: 53,8 %

HNMR In CDCl₃ 3.75 (s, 6H, OCH₃); 4.68 (s, 2H, ArCHN); 6.70 - 7.40 (m, 16H, ArH, Ar'H); 8.11 (s, 2H, ArCH=N); 13.19 (s, 2H, ArOH).

37.5**meso-1,2-Diamino-1,2-diarylethan**

Bedeutung: Vorstufe für Verbindung 37

Synthese 0,15 mol Verbindung 37.4 werden in 300 mL 0,1N H₂SO₄ erhitzt. Der dabei frei werdende Salicylaldehyd wird mittels Wasserdampfdestillation aus dem Gemisch entfernt. Wird kein Salicylaldehyd mehr frei, wird die noch heisse Lösung filtriert. Nach dem Abkühlen wird mit

Verbindung**Eigenschaften**

Hilfe von 20% NaOH_{aq} alkalisch gemacht (pH ~8-9) und mit Hilfe von CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die mit Na₂SO₄ getrocknete organische Phase wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand sorgfältig getrocknet. Das Produkt wird aus Ethanol umkristallisiert.

Eigenschaften Weisse, kristalline Substanz. M_r = 272 g/mol, Schmelzpunkt: 145 °C, Smp und NMR-Spektrum stimmen mit [Schlenk] überein.

HNMR 1.50 (s, 4H, NH₂, austauschbar); 3.72 (s, 6H, OCH₃); 3.80 (s, 2H, ArCH); 6.82 (AA'BB', 3J = 8.6 Hz, 4H, ArH-3, ArH-5); 7.13(AA'BB', 3J = 8.7 Hz, 4H, ArH-2, ArH-

37.6 4-Pyrrolidinyloxyphenylbenzaldehyd

Bedeutung Vorstufe für die Synthese von Verbindung 37

Synthese 4-Hydroxybenzaldehyd (0,1 mol) wird mit 0,12 mol K₂C₂O₃ in 250 mL Ethanol suspendiert. Dazu gibt man 0,11 mol Chloretethylpyrrolidin. Die Suspension wird so lange erhitzt, bis kein 4-Hydroxybenzaldehyd zu erkennen ist (DC). Dann wird die Suspension abgekühlt, abfiltriert und das Filtrat eingengt. Die Aufreinigung erfolgt per Säulenchromatographie an Kieselgel. Als Fliessmittel dient ein Ether/Petrolethergradient.

Eigenschaften Bräunlich, ölig-viskose Substanz. M_r = 219 g/mol Kein Schmelzpunkt bestimmbar. Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein Massenspektrum vermessen.

HNMR 1,59 (m, 4H, Pyrrolidiny), 2,34 (m, 4H, Pyrrolidiny), 2,77 (t, 2H, CH₂), 4,12 (t, 2H, CH₂), 7,00 (d, 2H, ArH), 7,78 (d, 2H, ArH), 9,68 (s, 1H, CHO)

MS 219 [M⁺], 135, 114, 84 [α-Spaltung]

Kapitel 7.2: 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole**Verbindung Eigenschaften****(1) (4R,5S) (4S,5R)(4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-triphenyl-1H-imidazol**

Synthese Aus Benzaldehyd über V1 und Methode C. Ausbeute: 75,8 % , Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan – Gemischen

Eigenschaften Gesamtausbeute: 85,9% C₂₁H₁₈N₂, weisse, kristalline Substanz, Schmelzpunkt: 129°C, Molmasse: 298 g / mol

HNMR: LSM: dms_o-d₆. **5.60** (2H, s, ArCH) **7.03** (10H, m, Ar₂H) **7.57** (3H, m, Ar₁H) **7.86** (1H, s, NH) **8.09** (2H, m, Ar₁H)

IR Aufnahmemedium: KBr. 3161, 2060, 3028, 1988, 1807, 1771, 1614, 1600, 1501, 1454

MS EI (75°C) 298 [M⁺], 221, 194, 193, 166, 104, 77, 57

CHN berechnet: C : 84, 53% H: 6.08% N: 9,39% gefunden: C: 84,44% H: 6.14% N: 9,30%

Verbindung Eigenschaften**(2) 4R,5S)-2,4,5-tris-(4-fluorophenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol**

Synthese Aus 4' – Fluorbenzaldehyd aus V2 und Methode C. Gesamtausbeute: 79,8 %, Aufarbeitung durch Umkristallisation aus CH₂Cl₂ / MeOH – Gemischen

Eigenschaften C₂₁H₁₅N₂F₃, weisse kristalline Substanz, Schmelzpunkt: 125°C, Molmasse 352 g/mol

HNMR: **5.33** (1H, d, ArCH) **5.57** (1H, d, ArCH) **6.98** (8H, m, Ar₁H) **7.36** (2H, m, Ar₁H) **7.88** (1H, s, NH) **8.11** (2H, m, Ar₁H)

IR 3158 (w, br), 1893 (w, s), 1606,1508,1226,1156

MS 352 [M⁺], 257, 229, 202, 201, 135, 122, 108, 107, 95

CHN berechnet: **C** 71,58% **H** 4,29% **N** 7,95% gefunden: **C:** 71,61% **H:** 4,38% **N:** 7,78 %

3 (4R,5S) (4S,5R)(4S,5R)-2,4,5-tris(4-chlorophenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol

Synthese Aus 4' – Chlorbenzaldehyd aus V3 und Methode C. Gesamtausbeute: 83,2 %, Aufarbeitung durch Umkristallisation

Eigenschaften C₂₁H₁₅N₂Cl₃; Molmasse: 400 g/ mol, weisse kristalline Substanz, Schmelzpunkt:108 °C

HNMR: in dmsO-d₆ **5.37** (1H, d, ArCH) **5.61** (1H, d, ArCH) **7.22** (8H, d+d, Ar₂H) **7.62** (2H, d, Ar₁H) **7.96** (1H, s, NH, austauschbar) **8.07** (2H, d, Ar₁H)

IR 3158 (w, br), 1889 (w, s), 1609, 1512, 1219, 1147, 897

MS 400 [M⁺], 398, 289, 287, 248, 152, 111

CHN berechnet: **C:** 62,79% **H:** 3,72% **N:** 6,97 % gefunden: **C:** 62,84% **H:** 3,78% **N:** 7,06 %

4 (4R,5S) (4S,5R)(4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-tris-p-tolyl-1H-imidazol

Synthese Aus p-Toluyaldehyd aus V4 und Methode C. Gesamtausbeute: 93, 7 %, Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan

Eigenschaften C₂₄H₂₄N₂, Molmasse 340 g/mol, weisse, kristalline Substanz, Schmelzpunkt: 132 °C

HNMR: n dmsO - d₆ **2.16** (6H, s, -CH₃ (1)), **2.40** (3H, s, CH₃ (2)), **5.23** (2H, m, Ar-CH), **5.49** (2H, m, Ar-CH), **6.92** (8H, m, Ar₁-H), **7.32** (2H, m Ar₂-H), **7.65** (1H, s, NH) , **7.96** (2H, d, Ar₂-H)

IR 3413 (br, s), 2920 (m, s), 1902 (br, w), 1614, 1514, 1457

MS 340 [M⁺], 221, 206, 104

CHN Berechnet: **C:**85,67% **H:**7,11% **N:**8,23% gefunden: **C:**85,56% **H:**7,24% **N:**8,02%

5 (4R, 5S) (4S,5R)-4,5-dihydro -2,4,5 -tris -p – cyanophenyl – 1H- imidazol

Synthese Aus p -Cyanobenzaldehyd über Methode D. Ausbeute: 43,1 %, Aufarbeitung durch Chromatographie mit CH₂Cl₂/MeOH – Gemischen

Eigenschaften C₂₄ H₁₅ N₅ , Molmasse 373 g / mol, hellgelbe, kristalline Substanz, Schmelzpunkt 136°C

HNMR: in dmsO – d₆ **5.56** (1H, d, Ar-CH), **5.82** (1H, d, Ar-CH), **7.22** (4H, d Ar₁-H_A), **7.59** (4H, d, Ar₁-H_B), **8.05** (2H, d, Ar₂-H_A), **8.24** (Ar₂-H_B)

IR 3368 (m, br), 2229 (s, s), 1605(s, s), 1457 (m, s), 850 (m, s)

MS 373 [M⁺], 243, 130, 75, 27

CHN berechnet: **C:**72,82% **H:** 5,24% **N:** 8,09% gefunden:**C:**72,78% **H:** 5,41% **N:** 8,21%

Verbindung Eigenschaften

6 (4R,5S),(4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol

Synthese Aus p-Methoxybenzaldehyd aus V6 und Methode C. Ausbeute: 91,3%, Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan

Eigenschaften C₂₄H₂₄N₂O₃, 388 g / mol, weisse, kristalline Substanz, Schmelzpunkt 86°C

HNMR: in dms_o-d₆ **3,65** (s, 6H, OCH₃), **3,87** (s, 3H, OCH₃), **5,31** (s, br, 2H, Ar-CH), **6,71** (d, 4H, J=8,97Hz, ArH_A), **6,95** (d, 4H, J=8,94Hz, ArH_B), **7,09** (d, 2H, J=8,67, Ar₂H_A), **7,58** (s, 1H, NH), **8,03** (d, 2H, J=8,72 Hz, Ar₂H_B)

IR in Kbr: 3401 (m, br), 2341 (w), 1505(m), 1457 (m, s), 1209(m,s), 1149, 850 (m, s)

MS 388 [M⁺], 344, 253,238,135,77,51

CHN Berechnet: **C: 74,21% H: 6,23% N: 7,21%** gefunden **C:70,95% H:6,42% N:6,93%** (*1H₂O)

7 (4R,5S) (4S,5R)(4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-(methylthio)phenyl)-1H-imidazole

Synthese Aus Methylthiobenzaldehyd aus V7 und Methode C. Ausbeute: 67, 9 %, Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan

Eigenschaften C₂₄H₂₄ N₂ S₃, M_r = 436 g/ mol hellgelbe, kristalline Substanz, Schmelzpunkt: 78.5°C

HNMR: n CDCl₃:**2.39** (6H, s, SCH₃ (1)) **2.58** (3H, s, SCH₃ (1)) **5.52** (2H, s, br, ArCH) **6.92** (4H, d, Ar₂H) **7.00** (4H, d, Ar₂H) **7.37** (2H, d, Ar₁H) **7.92** (2H, d, Ar₁H)

IR in Kbr: 3423 (m, br), 2256 (w), 1534(m), 1427 (m, s), 1212 (m,s), 1125, 852(m, s)

MS 436 [M⁺], 285, 270, 238, 151

CHN berechnet:**C: 66,01 H: 5,54 N: 6,42** gefunden: **C: 63,34 H: 5,68 N: 6,21** (*1H₂O)

8 (4R,5S),(4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-imidazole

Synthese Aus Substanz (6) und Methode J. Gesamtausbeute: 43, 8%. Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Methanol/Dichlormethan.

Eigenschaften C₂₁H₁₈N₂O₃·HBr, M_r = 426 g/mol, farblose Kristalle, Schmelzpunkt: 275 °C

HNMR: **5.76** (2H, s, Ar-CH) **6.61** (4H,d,Ar₁-H_A), **7.10** (4H, d, Ar₁-H_B), **7.36** (2H, d, Ar₂-H_B), **8.09** (2H, d, Ar₂-H_B), **9.54** (1H, s, br, OH), **9,66** (2H, s, br, OH) **10,75** (2H, s, NH)

IR in Kbr: 3435 (s, br), 2814 (w), 1576 (m), 1489 (m, s), 1209 (m,s), 1185, 998, 852(m, s)

MS 346 [M⁺], 344, 252, 225, 94

CHN Berechnet **C: 72,82% H 5,24% N 8,09%** gefunden **C: 59,34% H: 4,22% N: 6,24%** (*H₂O, *HBr)

9 (4R,5S) (4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-amidophenyl)-1H-imidazole

Synthese Ausgehend von Produkt (5): alkalische Verseifung nach Organikum, 19. Auflage, Seite 472

Eigenschaften C₂₄H₂₁N₅O₃, M_r= 427, orange viskos-zähe Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar

HNMR: **3.86** (4H, s, br, CONH₂ (2)), **4,48**(2H, s, br, CONH₂ (1)), **5.66** (2H, s, br, Ar-CH) **6.56** (4H,d,Ar₁-H_A), **7.08** (4H, d, Ar₁-H_B), **7.29** (2H, d, Ar₂-H_B), **8.11** (2H, d, Ar₂-H_B)

IR in Kbr: 3435 (s, br), 2814 (w), 1576 (m), 1489 (m, s), 1209 (m,s), 1185, 998, 852(m, s)

MS 427, 307, 280, 147, 120

CHN Berechnet **C: 67,44 H 4,95 N: 16,38** gefunden: **C: 64, 78% H: 5,25% N: 15,67%** (*1H₂O)

Verbindung *Eigenschaften*

10 **(4R,5S),(4S,5R)-2,4,5-tris(3-chlorophenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole**

Synthese Aus 3' – Chlorbenzaldehyd über Methode A und Methode C. Gesamtausbeute: 83,2 %, Aufarbeitung durch Umkristallisation

Eigenschaften $C_{21}H_{15}N_2Cl_3$; Molmasse: 400 g/ mol, weisse kristalline Substanz, Schmelzpunkt: 167 °C

HNMR: in $dms\text{-}d_6$ **5.37** (1H, d, ArCH) **5.61** (1H, d, ArCH) **7.22** (8H, m, Ar_2H) **7.62** (2H, d, Ar_1H) **7.96** (1H, s, NH, austauschbar) **8.07** (2H, d, Ar_1H)

IR In KBr 3149 (w, br), 1799 (w, s), 1639, 1512, 1219, 1147, 897

MS 400 [M^+], 398, 289, 287, 248, 152, 111

CHN berechnet: **C: 62,79% H: 3,72% N: 6,97 %** gefundenen: **C: 62,84% H: 3,69% N: 6,94 %**

11 **(4R,5S) (4S,5R)(4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-tris(3-methoxyphenyl)-1H-imidazole**

Synthese Aus m-Methoxybenzaldehyd über Methode A und Methode C. Ausbeute: 91,3%. Aufarbeitung durch Umkristallisation

Eigenschaften $C_{24}H_{24}N_2O_3$, 388 g / mol, gelblich – amorphe Substanz, Schmelzpunkt nicht bestimmbar

HNMR: in $dms\text{-}d_6$ **3,65** (s, 6H, OCH_3), **3,87** (s, 3H, OCH_3), **5,31** (s, 2H, Ar-CH), **6,71** (d, 4H, ArH_A), **6,95** (d, 4H, ArH_B), **7,09** (d, 2H, Ar_2H_A), **7,58** (s, 1H, NH), **8,03** (d, 2H, Ar_2H_B)

IR in Kbr: 3389(m, br), 2201 (w), 1497 (m), 1457 (m, s), 1212 (m,s), 1128, 847 (m, s)

MS 388 [M^+], 344, 253, 238, 135, 77, 51

CHN Berechnet: **C: 74,21% H: 6,23% N: 7,21%** gefunden **C:70,93% H:6,47% N:6,89%** (*1H₂O)

12 **(4R,5S), (4S,5R)-2,4,5-tris(2-fluorophenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole**

Synthese Aus 2-Fluorbenzaldehyd über Methode A und Methode C. Gesamtausbeute: 73,4 % Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan.

Eigenschaften $C_{21}H_{15}N_2F_3$, Molmasse: 352 g/ mol, weisse, kristalline Substanz, Schmelzpunkt 125 °C

HNMR: $dms\text{-}d_6$ **5.56** (1H, d, ArCH) **5.82** (1H, d, ArCH) **6.88** (2H, m, Ar_2H) **7.06** (2H, m, Ar_2H) **7.14** (2H, m, Ar_2H) **7.37** (1H, m, Ar_1H) **7.62** (1H, m, Ar_1H) **7.66** (1H, s, NH) **8.00** (1H, m, Ar_1H)

IR 3146, 2918, 1623, 1603, 1488, 1458, 1231, 819, 752

MS 352 [M^+], 229, 202, 201, 108

CHN berechnet: **C 71,58% H 4,29% N 7,95%** gefunden **C 71,47 % H 4,45% N 7,83%**

13 **(4R,5S),(4S,5R)-2,4,5-tris(2-chlorophenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole**

Synthese Aus 2-Chlorbenzaldehyd über Methode A und Methode C. Gesamtausbeute: 64,9 %, Aufreinigung durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan. Über Nacht stehen lassen.

Eigenschaften $C_{21}H_{15}N_2Cl_3$, Molmasse: 400 g/mol, weisse, kristalline Substanz, Schmelzpunkt 161 °C

HNMR: $dms\text{-}d_6$ **5.75** (1H,d,ArCH) **5.98** (1H, d, ArCH) **7.06** (2H, m, Ar_2H) **7.17** (2H, Ar_2H) **7.31** (2H, m, Ar_2H) **7.63** (1H, m, Ar_1H) **7.79** (1H,m, Ar_1H) **7.83** (1H, m, Ar_1H)

IR in Kbr: 3167 (br,m), 3064 (s, m), 1922 (s, w), 1615, 1589, 1472, 1442, 1035, 745

MS 400 [M^+], 262, 139, 124, 89

CHN berechnet: **C 62,79% H 3,76% N 6,97%** gefunden: **C 62,67 % H 3,95% N 6, 74%**

Verbindung Eigenschaften

14 (4R,5S),(4S,5R)-2,4,5-tris(2-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole

Synthese aus 2-Methoxybenzaldehyd über Methode A und Methode C. Gesamtausbeute 74,3%, Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan (ölt über Nacht aus)

Eigenschaften Molmasse: 388 g/mol. Weisse, amorph-ölige Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar.

HNMR: dms_o-d₆ **3.65** (6 H, s, Ar₂-OCH₃) **3.91** (3H, s, Ar₁-OCH₃) **5.67** (2H, s, Ar-CH) **6.64** (2 H, m, Ar₂H_c) **6.94** (2H, m, Ar₂H_b) **7.10**(2H, m, Ar₂H_a) **7.19** (1H, m, Ar₁H_c), **7.52** (1H, m, Ar₁H_b) **8.04** (1 H, m, Ar₁H_a), **9,54** (2H, s, br, ArOH), **9,69** (1H, s, br, ArOH), **10,54** (2H, s, br, NH)

IR 3434 (w, br), 1628(m,sh), 1599(m,sh), 1487(m,sh), 1464(m,sh), 1247(s,sh), 1044, 1026

MS 388 [M⁺], 281, 253, 135, 107, 77

CHN Berechnet: **C**: 74,21% **H**: 6,23% **N**: 7,21% gefunden **C**:70,91% **H**:6,49% **N**:6,79% (*1H₂O)

15 (4R,5S)/(4S5R) - 2,4,5-tris(2-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol

Synthese Aus Verbindung 13 über Methode J. Gesamtausbeute: 32,9%, Aufreinigung durch Umkristallisation aus Methanol/CH₂Cl₂

Eigenschaften Mr = 426 g/mol (als Hydrobromid), Aussehen: beige kristalline Substanz C₂₁H₁₈N₂O₃·*HBr, Schmelzpunkt: 177 °C

HNMR: dms_o-d₆ **5.67** (2H, s, Ar-CH) **6.64** (2 H, m, Ar₂H_c) **6.94** (2H, m, Ar₂H_b) **7.10**(2H, m, Ar₂H_a) **7.19** (1H, m, Ar₁H_c), **7.52** (1H, m, Ar₁H_b) **8.04** (1 H, m, Ar₁H_a)

IR in Kbr: 3428 (s, br), 2805 (w), 1554 (m), 1471 (m, s), 1213 (m,s), 1174, 994, 863(m, s)

MS 346 [M⁺], 344, 252, 225, 94

CHN Berechnet: **C** 72,82%, **H** 5,24%, **N** 8,09% gefunden **C**: 59,34% **H**: 4,22% **N**: 6,24% (*H₂O, *HBr)

16 (4R,5S),(4S,5R)-2,4,5-tris(2-fluoro-4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol

Synthese Aus Fluormethoxybenzaldehyd über Methode A und Methode C. Gesamtausbeute: 45,7 % Aufreinigung durch Chromatotron

Eigenschaften Molmasse: 442 g/mol. Gelblich-amorphe Substanz, C₂₄H₂₁F₃N₂O₃, Schmelzpunkt: 147 °C

HNMR: in dms_o-d₆ 7,92 (m, 1H, ArH), 7,36 (m, 1H, ArH), 6,94 (m, 4H, ArH), 6,50 (m, 3H, ArH), 5,49 (s, 2H, ArCH), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 3,63 (6H, s, OCH₃)

IR in Kbr: 3428 (s, br), 2805 (w), 1554 (m), 1471 (m, s), 1213 (m,s), 1174, 994, 863(m, s)

MS 442, 289, 276, 153, 138

CHN Berechnet: **C**, 65.15%; **H**: 4.78 % **N** 6.33%;
gefunden: **C**: 65.78%; **H**: 5.02 % **N** 6.60%

17 (4R,5S),(4S,5R)-2,4,5-tris(2-chloro-4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole

Synthese Aus 2-Chlor-4-Methoxybenzaldehyd über Methode B und Methode C. Gesamtausbeute: 25,7 %, Aufreinigung durch Chromatotron und CH₂Cl₂ – Gemischen.

Eigenschaften Molmasse: 492 g/mol. Gelblich-amorphe Substanz, C₂₄H₂₁Cl₃N₂O₃, Schmelzpunkt:156°C

HNMR: in dms_o-d₆ **3.64** (3H, s, OCH₃) **3.68** (3H, s, OCH₃) **3.88** (3H, s, OCH₃) **5.76** (1H, d, ArCH) **5.93** (1H, d, ArCH) **6.57** (1H, m, ArH) **6.62** (1H, m, ArH) **6.76** (2H, m, ArH) **7.00** (1H, m, ArH) **7.06** (1H, m, ArH), **7.11** (1H, m, ArH), **7.24** (1H, m, ArH), **7.68** (1H, m, ArH)

Verbindung Eigenschaften

IR in Kbr: 3172 (s, br), 2909 (w), 1551 (m), 1489 (m, s), 1283 (m,s), 1163, 964, 853 (m,s)

MS 492, 321, 308, 189, 169, 141

CHN berechnet:**C:58,61% H:4,30% N:5,70%**
gefunden:**C:54,91% H:3,98% N:5,39%(*CH₃OH)**

18 (4R,5S),(4S,5R)-2,4,5-tris(2-fluoro-4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole

Synthese Aus Verbindung 16 über Methode J. Gesamtausbeute: 12,4%, Aufarbeitung durch Umkristallisation

Eigenschaften Molmasse: 400 g/mol. Rot-braune, amorphe Substanz, C₂₁H₁₅F₃N₂O₃, Smp.: 181 °C

HNMR: in dms_o-d₆ **5.84** (1H, d, ArCH) **5.99** (1H, d, ArCH) **6.67** (1H, m, ArH) **6.78** (1H, m, ArH) **6.84** (2H, m, ArH) **7.10** (1H, m, ArH) **7.17** (1H, m, ArH), **7.26** (1H, m, ArH), **7.40** (1H, m, ArH), **7.98** (1H, m, ArH), **9,41** (1H, s, ArOH),**9,48** (1H, s, ArOH) **9,83** (1H, s, ArOH), **10,28** (2H, s, br, NH)

IR in Kbr: 3428 (s, br), 2805 (w), 1554 (m), 1471 (m, s), 1213 (m,s), 1174, 994, 863(m, s)

MS 400, 289, 261, 248, 152, 139, 111

CHN Ber.: C: 63,00% H: 3,78% N: 7,00% gef.: C: 50,49% H: 3,71% N: 5,55 % (* H₂O, *HBr)

19 (4R,5S),(4S,5R)-2,4,5-tris(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole

Synthese Aus 17 über Methode J. Gesamtausbeute: 13,4%, Umkristallisation in MeOH / CH₂Cl₂

Eigenschaften Molmasse: 448 g/mol. Rot-braune, amorphe; C₂₁H₁₅Cl₃N₂O₃, Smp. 187 -189 °C

HNMR: in dms_o-d₆ **5.81** (1H, d, ArCH) **5.96** (1H, d, ArCH) **6.67** (1H, m, ArH) **6.73** (1H, m, ArH) **6.84** (2H, m, ArH) **7.09** (1H, m, ArH) **7.13** (1H, m, ArH), **7.24** (1H, m, ArH), **7.56** (1H, m, ArH), **7.89** (1H, m, ArH), **9, 52** (1H, s, br, ArOH); **9,67** (1H, s, ArOH) **9,87** (1H, s, br, ArOH), **10,56** (2H, s, NH)

IR in Kbr: 3496 (s, br), 3105 (w), 1558 (m), 1467 (m, s), 1208 (m,s), 1178, 984, 833(m, s)

MS 452, 448 [M⁺, Cl – Isotope], 321, 294, 280, 154, 168, 128

CHN Ber.: **C: 56,09% H 3,36% N: 6,23%** gef.: **C: 44,45% H: 2,74% N:5,07%** (*CH₃OH, *HBr)

20 (4R,5S),(4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-tris(3,4-dimethoxyphenyl)-1H-imidazol

Synthese Aus 3,4-Dimethoxybenzaldehyd über Methode A und Methode C. Ausbeute: 91,3%, Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Ethylacetat/Hexan

Eigenschaften C₂₄H₂₄N₂O₃, , 478 g / mol, weisse, kristalline Substanz, Schmelzpunkt 165 °C

HNMR: in dms_o-d₆ **3,82** (3H, s, OCH₃) **3,88** (3H, s, OCH₃) **3,97** (12H, s, OCH₃), **5,91** (2H,s, ArCH), **6,94**(2H, m, ArH), **7,02** (2H, m, ArH), **7,09** (2H, m, ArH) **7,12** (1, m, ArH) **7,37** (1H, m, ArH) **7,48** (1H, m, ArH)

IR In KBr: 3104(m, br), 3067 (w), 2901(w), 1675, 1568, 897, 854

MS 478, 341, 314, 300, 178, 164, 137

CHN Berechnet:**C. 67,77% H 6, 32% N 5,85%** gefunden: **C. 67,90% H 6, 27% N 5,62%**

Verbindung Eigenschaften**21 (4R,5S),(4S,5R)-2-(2-fluoro-4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol**

Synthese Aus (17) über Methode F Gesamtausbeute : 43,2%, Aufarbeitung durch Chromatographie mit SiO₂ / CH₂Cl₂/ MeOH

Eigenschaften Molmasse: 406,17 g / mol. grünliche,schaumig-amorphe Substanz, C₂₄H₂₃FN₂O₃, Schmelzpunkt: 131°C

HNMR: in dms_o-d₆ **3.64** (6H, s, OCH₃) **3.93** (3H, s, OCH₃) **5.76** (2H, s, ArCH) **6.74** (4H, d, ArH) **6.99** (4H, d, ArH) **7.12** (1H, dd, ArH) **7.23** (1H, dd, ArH) **8.00** (1H, m ArH) **11.02** (2H, br, NH=C=NH)

IR 3431 (w, br), 2223 (sh, m), 1623 (w, br), 1513, 1251, 1027, 844

MS 406, 404, 271, 184, 153, 133

CHN Berechnet: **C**: 70,92% **H**: 5,70%, **N**: 6,89% gefunden: **C**: 71,03 % **H**: 5,61% **N**: 6,73%

22 (4R,5S),(4S,5R)-2-(2-fluoro-4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-1H-imidazole

Synthese Aus (21) über Methode J Gesamtausbeute : 25,9 %, Aufarbeitung durch Umkristallisation aus CH₂Cl₂ – Gemischen.

Eigenschaften Molmasse:364 g / mol. Bräunlich schaumig-amorphe Substanz, C₂₁H₁₇FN₂O₃, Schmelzpunkt: 177°C

HNMR: in dms_o-d₆ **5.92** (2H, s, ArCH) **6.86** (4H, d, ArH) **7.15** (4H, d, ArH) **7.32** (1H, dd, ArH) **7.46** (1H, dd, ArH) **8.08**(1H, m ArH) **9,86** (2H, s, br, ArOH) **10,21** (1H, s, br, ArOH) **11.02** (2H, br, NH=C=NH)

IR 3531 (m, br), 3099, 2223 (sh, m), 1602 (w, br), 1499, 1283, 1052, 856

MS 364, 271, 253, 244, 120, 111, 93

CHN Berechnet:**C**: 69,23% **H** 4,70% **N** 7,69%
gefunden: **C**: 54,59% **H**: 3,77% **N**: 6,15% (*H₂O, * HBr)

23 (4R,5S) (4S,5R)(4S,5R)-1-ethyl-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-methoxyphenyl)-1H-imidazole

Synthese Aus (6) über Methode G. Ausbeute: 67,8% , Aufarbeitung durch Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH = 98/2)

Eigenschaften C₂₆H₂₈N₂O₃ Molmasse: 416 g / mol. gelbliche amorph-viskose Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar

HNMR: in dms_o-d₆ **0.87** (3H, t, ₂J=7,1, CH₃) **2.83** (1H, m, -CH₂ -) **3.28** (1H, m, -CH₂ -) **3.61** (3H, s, OCH₃) **3.63** (3H, s, OCH₃) **3.84** (3H, s, OCH₃) **5.12** (1H, d, ₂J = 10,8, ArCH) **5.42** (1H, d, ₂J = 10,8, ArCH) **6.61** (2H, d, ₂J=8,6 ArH) **6.68** (2H, d, ₂J=8,3 ArH) **6.87** (2H, d, ₂J=8,2 ArH) **6.94** (2H, d, ₂J=8,5 ArH)**7.09** (2H, d, ₂J=8,4 ArH) **7.66** (2H, d, ₂J=8,6 ArH)

IR 3433 (w, br), 2836 (w), 1611 (s, sh), 1514 (s, sh), 1255, 1177, 1028

MS 416, 414, 309, 254, 203, 162, 107

CHN berechnet: **C** 74,97% **H** 6,78% **N** 6, 73% gefunden:**C** 74,81% **H** 6,96% **N** 6,56%

Verbindung Eigenschaften**24 (4R,5S), (4S,5R)-1-propyl-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-methoxyphenyl)-1H-imidazole**

Synthese Aus (6) über Methode G. Gesamtausbeute 48,9%

Eigenschaften Molmasse: 430 g / mol. gelbliche, amorph-viskose Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar, C₂₇H₃₀N₂O₃HNMR: Dms_o-d₆ **0.75** (3H, t, CH₃), **1.52** (2H, m, -CH₂-), **3.01** (1H, m, N-CH), **3.53** (1H, m, N-CH), **5.76** (2H, d, ArCH), **6.58** (4H, m, ArH), **6.87** (4H, m, ArH), **7.08** (2H, m, ArH), **7.76** (2H, m, ArH)

IR 3426 (s, br), 2961 (w, sh), 2048 (w, sh), 1611, 1511, 1247, 1175, 1030, 836

MS 430, 428, 387, 323, 253, 177, 107, 43

CHN Berechnet: **C** 75,32% **H** 7,01% **N** 6,51%
gefunden: **C** 75, 64% **H** 6,85 % **N** 6,38%**25 (4R,5S),(4S,5R)-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-methoxyphenyl)-1-(prop-2-ynyl)-1H-imidazole**

Synthese Aus (17) über Methode J Gesamtausbeute 13,41 % Aufarbeitung: Chromatotron

Eigenschaften Molmasse: 426g/mol. Bräunlich-amorphe Substanz, kein Smp bestimmbar C₂₇H₂₆N₂O₃HNMR: 3.50 (d, J = 19.00 Hz, 1H N-CH₂-), 3.61 (s, 3H, OCH₃) 3.64 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.22 (d, J = 18.98 Hz, 1H, N-CH₂), 5.10 (d, J = 10.56 Hz, 1H,ArCH), 5.42 (d, J = 10.56 Hz, 1H, ArCH), 6.60 (d, J = 8.72 Hz, 2H,ArH), 6.67 (d, J = 8.74 Hz, 2H,ArH), 6.77 (d, J = 8.65 Hz, 2H, ArH), 6.96 (d, J = 8.62 Hz, 2H, ArH), 7.12-7.08 (m, 2H, ArH), 7.66 (m, 2H,ArH)

IR 3423 (s, br), 2957 (w, sh), 2051 (w, sh), 1613, 1510, 1247, 1171, 1023, 836

MS 426 [M⁺], 424, 319, 240, 186, 107CHN Gefunden:**C**:76,03% **H**: 6,14% **N**:6,57% berechnet: **C** 75,67% **H**: 6,03% **N**: 6,35%**26 (4R,5S),(4S,5R)-1-ethyl-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-imidazole**

Synthese Aus (23) über Methode J Gesamtausbeute 10,1 %

Eigenschaften C₂₃H₂₄N₂O₃, Molmasse: 374 g / mol. Bräunliche Substanz, Schmelzpunkt 197°CHNMR: in dms_o-d₆ **9.36** (s, 1H,ArOH), **9.44** (s, 1H, NH), **10.67** (s, 1H,ArOH), **10.71** (s, 1H,ArOH) **7.77** (d, J = 8.66, 2H,ArH), **7.07** (d, J = 8.66, 2H,ArH), **6.55** (m, 4H, ArH), **6.91** (m, 4H, ArH), **5.72** (d, J = 10,82 Hz, 1H, ArCH) **5,44** (d, J=10,82 Hz, 1H, ArCH) , **3.65** (m, J = 7.32 Hz, 1H, - CH₂), **3.05** (m,J=7,30, 1H, - CH₂), **1.07** (t, J = 7.31, 3H,-CH₃)

IR 3467 (s, br), 3012 (w, sh), 2061 (w, sh), 1608, 1504, 1236, 1132, 1031, 876

MS 374, 372, 280, 255, 119 94, 29

CHN Gefunden: **C**: 73,78% **H**: 5,92% **N**: 7,48%
berechnet: **C**: 57,21% **H**: 5,25% **N**: 6,03% (*HBr, *H₂O)

Verbindung Eigenschaften**27 (4R,5S),(4S,5R)-1-propyl-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-imidazole**

Synthese Aus (24) über Methode J, Gesamtausbeute 7,31 %

Eigenschaften C₂₄H₂₇N₂O₃ Molmasse: 388 g/mol. Beige-kristalline Substanz, Schmelzpunkt: 214°C

HNMR: HNMR in dms_o-d₆ 0.73 (t, J = 7.36, 7.36 Hz, 3H), 1.49 (m, 7.50 Hz, 2H), 2.99 (m, 1H), 3.51 (m, 1H) 5.70 (d+d, J = 10.81 Hz, 2H), 6.54 (m, 4H,ArH), 6.85 (m, 4H, ArH), 7.06 (d, J = 8.68 Hz, 2H), 7.74 (d, J = 8.66 Hz, 2H) 9.34 (s, 1H ArOH), 9.43 (s, br, 1H, NH, austauschbar), 10.77-10.61 (s, br, 2H, ArOH)

IR KBr: 3411 (s, br), 2054 (br,w), 1891 (br,w), 1611(s,sh), 1516 (s, sh) 1263, 1174, 1022, 837

MS 388, 295, 226, 212, 176, 164, 94

CHN Berechnet: **C: 74,21% H:6,23% N: 7,21%**
gefunden: **C: 59, 41% H:5,63% N:5,68%** (*HBr, *H₂O)

28 (4R,5S), (4S,5R)-1-(prop-2-ynyl)-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-imidazole

Synthese Aus (25) über Methode J, Gesamtausbeute 3,8 % Aufarbeitung durch Chromatotron und CH₂Cl₂ / MeOH -Gradientenelution, beginnend mit (95:5)

Eigenschaften C₂₄H₂₃N₂O₃, Molmasse 384 g/mol, braune, klebrige Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar.

HNMR: in dms_o-d₆ 3.59 (d, J = 19.00 Hz, 1H, CH₂), 4.34 (d, J = 18.98 Hz, 1H, CH₂), 5.63 (d, J = 10.56 Hz, 1H, ArCH), 5.82 (d, J = 10.56 Hz, 1H, ArCH), 6.60 (d, J = 8.72 Hz, 2H, ArH), 6.67 (d, J = 8.74 2H, ArH), 6.77 (d, 2H, ArH), 6.96 (m, 4H, ArH),7.08-7.12 (m, 4H, ArH), 7.66 (d, J = 7.01 Hz, 1H), 9,87 (s, 1H austauschbar, ArOH), 10,54 (s , 1H, austauschbar NH), 10,97 (s+s, 2H, austauschbar, ArOH)

IR KBr: 3423 (s, br), 2063 (br,w), 1609(s,sh), 1527 (s, sh) 1251, 1169, 1017, 845

MS 384, 291, 264, 225, 159, 120, 93

CHN Berechnet: **C: 59,51 H: 4,99 N: 5,78** (*HBr, *H₂O)
gefunden: **C: 59,28 H: 5,11 N: 5,67**

29 (4R,5S),(4S,5R)-1,3bismethyl-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-methoxyphenyl)-1H-4,5-dihydro-1H-imidazoliumiodid

Synthese Aus (6) über Methode H; Gesamtausbeute 54.2 %, Aufreinigung durch Umkristallisation aus Ether / Petrolethergemischen

Eigenschaften C₋₂₆H₂₉I N₂O₃ Molmasse: 544 g mol. Weisse, kristalline Substanz, Schmelzpunkt 192°C

HNMR: in dms_o-d₆ **2.83**(6H, s, CH₃) **3.67**(6H, s, OCH₃), **3.93**(3H, s, OCH₃) **5.73**(2H, s, ArCH) **6.78**(4H, d, ArH) , **7.08** (4H, d, ArH) **7.34**(2H, d, ArH) **7.94**(2H, d, ArH)

IR KBr. 3433,7 (br, m), 1611, 1514, 1255, 1178

MS 417, 415, 402, 309, 268, 253, 142, 127, 107

CHN Berechnet: **C: 57,36% H: 5,37% N: 5,14%**
gefunden: **C: 56, 97% H: 5,38% N: 5,02%**

Verbindung Eigenschaften

30 (4R,5S),(4S,5R)-1,3-bisethyl-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-methoxyphenyl)-1H-4,5-dihydro-1H-imidazoliumiodid

Synthese Aus (6) über Methode H; Gesamtausbeute 76,3 %, Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Ether / Petrolether - Gemischen

Eigenschaften Molmasse: 572 g/mol. Gelblich – kristalline Substanz, C₂₈H₃₃N₂O₃ Schmelzpunkt 193°C:

HNMR: in dms_o-d₆ **1.04** (6H, t, CH₃) **2.98** (2H, m, -CH₂-) **3.30** (2H, m, -CH₂-) **3.69** (6H, s, OCH₃) **3.92** (3H, s, OCH₃) **5.89** (2H, s, ArCH) **6.80** (4H,d, ArH) **7.12** (4H, d, ArH) **7.36** (2H, d, ArH) **8.12** (2H, d, br, ArH)

IR KBr. 3428 (br, m), 1618, 1510, 1241, 1178, 1021, 834

MS 445, 443, 415, 337, 283, 253, 162,107

CHN berechnet: **C: 58,74% H: 5,81% N: 4,89 %**
gefunden **C: 58,23% H: 5,66% N: 4,69 %**

31 (4R,5S),(4S,5R)-1,3-bispropyl-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-methoxyphenyl)-1H-4,5-dihydro-1H-imidazoliumiodid

Synthese Aus (6) über Methode H; Gesamtausbeute 67,8 %, Aufarbeitung durch Umkristallisation aus Ether / Petrolether - Gemischen

Eigenschaften Molmasse: 600 g / mol. Weisse, amorphe Substanz, C₃₀H₃₇N₂O₃, Schmelzpunkt

HNMR: in dms_o-d₆ **8.10** (2H,d, br, ArH) , **7.36** (2H,d, ArH), **7.12** (4H, d, ArH), **6.80** (4H, d, ArH), **5.91** (2H, s, ArCH), **3.93** (3H,s, OCH₃), **3.70** (6H, s, OCH₃), **3.20** (2H, m, N-CH₂-), **2.95** (2H, m, N-CH₂), **1.50** (4H, m, -CH₂-), **0.74** (6H, t, -CH₃)

IR In KBr 3430 (br, m), 1609, 1517, 1251, 1158

MS 473, 430, 428, 388, 253,177, 134, 127

CHN berechnet: **C 60,00 H: 6,21 N: 4,66**
gefunden **C 59,31 H 6,38 N: 4,55**

32 (4R,5S),(4S,5R)-1,3-bismethyl-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-4,5-dihydro-1H-imidazoliumiodid

Synthese Aus (29) über Methode H; Gesamtausbeute 27,1%, Aufarbeitung durch Umkristallisation aus CH₂Cl₂ - MeOH Gemischen

Eigenschaften Molmasse: 502 g/mol. bräunliche, amorphe Substanz, Schmelzpunkt 187 °C

HNMR: in dms_o-d₆ **2.84** (6H, s, -CH₃), **5.63** (2H, s, ArCH), **6.59** (4H, d, J = 8,57 Hz, ArH), **6.90** (4H, d, J = 8,56 Hz, ArH), **7.12** (2H, d, J = 8,71 Hz, ArH), **7.78** (2H, d, J= 8, 73Hz, ArH), **9.46** (2H, s, ArOH), **10.62** (1H, s, ArOH)

IR in Kbr 3294 (s, br), 1612, 1515, 144, 1217, 1173, 1076, 843, 755

MS 375, 373, 280, 266, 239, 212, 163, 134, 94

CHN Berechnet **C: 54,99% H:4,61% N: 5,58%**
gefunden: **C: 55,12% H:4,70% N:5,51%**

Verbindung Eigenschaften

33 4R,5S)-1,3bisethyl-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-4,5-dihydro-1H-imidazoliumiodid

Synthese Aus (30) über Methode J Gesamtausbeute 31, 2 %, , Aufarbeitung durch Umkristallisation aus CH₂Cl₂ - Gemischen

Eigenschaften Molmasse: 403 g/mol, beige -bräunliche, kristalline Substanz. Schmelzpunkt 201°C

HNMR: in dms_o-d₆ **1.03** (6H, t, -CH₃), **2.99** (2H, m, N-CH₂-) , **3.30** (2H, m, N-CH₂-), **5.77** (2H,s, ArCH), **6.61** (4H, d, ArH), **6.93** (4H, d, ArH), **7.13** (2H, ArH), **7.82** (2H, d, ArH), **9.60** (2H, s, ArOH), **10.73** (1H, s, ArOH)

IR in Kbr 3294 (s, br), 1612, 1515, 144, 1217, 1173, 1076, 843, 755

MS 403, 401, 374, 310, 254, 149, 93, 29

CHN Berechnet **C: 56,61% H: 5,13% N: 5,28%**
gefunden: **C: 56,29% H: 5,33% N: 5,10%**

34 (4R,5S),(4S,5R)-1,3-bispropyl-4,5-dihydro-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-4,5-dihydro-1H-imidazoliumiodid

Synthese Aus (31) über Methode J Gesamtausbeute. 13,04 %. Aufarbeitung durch Umkristallisation aus CH₂/Cl₂-MeOH Gemischen

Eigenschaften Molmasse: 431 g / mol. Wollweisse, amorphe Substanz, Schmelzpunkt 197°C

HNMR: in dms_o-d₆ **0.75**(6H, t, CH₃)**1.49** (4H, m, -CH₂-) **2.95**(2H, m, CH₂-) **3.20** (2H, m, CH₂-) **5.79**(2H, s, ArCH) **6.60** (4H, d, ArH)**6.93** (4H, d, ArH) **7.14**(2H, d, ArH), **7.92** (2H, d, ArH)**9.91**(2H, s, ArOH), **10.68** (1H, s, ArOH)

IR in KBr 3394 (s, br), 1508, 1444, 1209, 1162, 1106, 839, 757

MS 431, 429, 388, 345, 268, 163, 94, 43

CHN Berechnet **C: 58,07% H: 5,60% N: 5,02%**
gefunden: **C: 57,86% H: 5,78% N: 4,76%**

35 (4R,5S),(4S,5R)-2,4-Bis(4'-Hydroxyphenyl)-5-(4'-Pyrrolidinylethoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol

Synthese Aus (8) über Methode K. Gesamtausbeute: 2,35 % , Aufarbeitung durch Chromatotron und Gradientenelution aus CH₂Cl₂ / MeOH Gemischen, unter Zusatz von Spuren von Triethylamin.

Eigenschaften Molmasse: 441.58 g/mol. Farblose, amorphe Substanz
Summenformel: C₂₇H₂₉N₃O₃ , Erweichungsbereich 167- 172°C

HNMR: in MeOD: **1.85** (4H, t, -CH₂-), **2.68** (4H, t, N-CH₂-) **2.88** (2H, t, CH₂), **4.06** (2H, t, CH₂), **5.61**, (2H, d, ArCH, ³J = 11,03Hz) , **6.55** (2H, d, ArH), **6.78** (4H, d, ArH), **6.82**, (2H, d, ArH), **6.96** (2H, d, ArH), **7.80** (2H, d, ArH)

IR In KBr: 3408, 3068, 2956, 1611, 1511, 1252, 1178, 1029, 841, 798

MS 443 [M⁺], 441, 350, 322, 309, 134, 121, 94, 84

CHN Berechnet **C: 73,11 % H 6,59 % N 9,47 %**
gefunden: **C: 72,89 % H 6,81 % N 9,18 %**

Verbindung Eigenschaften**36 (4R,5S),(4S,5R)-4,5-Bis(4'-Hydroxyphenyl)-2-(4'-Morpholinylethoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol**

Synthese Aus Verbindung 8 über Methode K. Gesamtausbeute 1,10 %

Eigenschaften Molmasse 459,2 g/ mol Aussehen: gelblich – amorphe Substanz, glasartig
C₂₇H₂₉N₃O₄ Schmelzpunkt: 264-267 °C (Erweichungsbereich)

HNMR: In dmso – d₆ **1.38** (4H, t, -N-CH₂-), **2.55** (4H, t, -N-CH₂-), **2.74** (2H, t, -CH₂-), **2.86** (2H, t, -CH₂-), **3.74** (8H, t+t, -N-CH₂-) **4.02** (2H, t, -CH₂-) **4.24** (2H, t, -CH₂-) **5.44** (d, 2H, 10,79, ArCH), **6.51** (d, 2H, 8,91Hz, ArH) **6.68** (d, 2H, 8,66Hz, ArH) **6.80** (d, 2H, 8,52Hz, ArH) **6.91**(d, 2H, 8,63Hz, ArH), **7.11** (d, 2H, 8,85Hz, ArH) **7.99** (d, 2H, 8,82 Hz, ArH)

IR In KBr: 3408, 3068, 2956, 1611, 1511, 1252, 1178, 1029, 841, 798

MS 459, 457, 365, 338, 120, 100, 94

CHN Berechnet **C** 70.57%; **H** 6.36%; **N** 9.14%
gefunden **C** 70.81%; **H** 6.54%; **N** 9.22%

37 (4R,5S),(4S,5R)-4,5-Bis(4'-Methoxyphenyl)-2-(4'-pyrrolidinyloxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol

Synthese Aus dem Diamin **V37.5** (siehe Abschnitt „Vorstufen der Triarylimidazoline) und **V37.6** über Methode F. Ausbeute 13,8%

Eigenschaften Molmasse 471 g/mol C₂₉H₃₃N₃O₃, Aussehen: beige-bräunlicher Schaum.
Erweichungsbereich: 154 -157 °C

HNMR 1,63 (t, 4H, -CH₂-), 2,49 (t, 4H, N-CH₂-), 2,77(t,2H,CH₂ -N), 3,4 (s,6H, OCH₃), 4,32(0-CH₂-), 5,78 (s,2H, ArCH), 6,70(d,4H,J=8,63,ArH), 6,95 (d,4H, J=8,59,ArH), 7,27(d, 2H,J=8,85,ArH), 8,08(d, 2H, J=8,81, ArH)

IR In KBr 3399, 3061, 2959, 1618, 1514, 1242, 1178, 1029, 812, 799

MS 471, 336, 281, 190, 107, 84 (100 %, α-Spaltung)

CHN Berechnet: C: 73,86% H: 7,05% N: 8,91%
gefunden: C: 74,09% H: 7,12% N: 8,84 %

38 (4R,5S),(4S,5R)-4,5-Bis(4'-Hydroxyphenyl)-2-(4'-pyrrolidinyloxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol

Synthese Aus **38** durch Entschützung nach Methode J. Ausbeute: 8,98 %

Eigenschaften Molmasse = 441,6 g/mol, C₂₇H₂₉N₃O₃, Glasartige, farblose Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar

HNMR: in MeOD: **1.79** (4H, m, -CH₂-), **2.65** (4H, m, N-CH₂-) **2.87** (2H, t, CH₂), **4.13** (2H, t, CH₂), **5.87**, (2H, s, ArCH) , **6.74** (4H, d, ArH), **6.95**, (4H, d, ArH), **7.31** (2H, d, ArH), **8.09** (2H, d, ArH)

IR In KBr: 3412, 3054, 3001, 1617, 1516, 1249, 1181, 1032, 839, 798

MS 443 [M⁺], 441, 322, 309, 253, 191, 134, 121, 84

CHN Berechnet **C:** 73,11% **H:** 6,59% **N:** 9,47%
gefunden **C:** 73,28% **H:** 6,81% **N:** 9,53%

Verbindung Eigenschaften

39 (4R,5S),(4S,5R)-4,5-Bis(4'-Methoxyphenyl)-2-(4'-morpholinylethoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol

Synthese Aus 4'-Morpholinylethoxybenzaldehyd und 1,2 Bis-(4-methoxyphenyl)diamin über Methode F und anschließender Entschützung nach Methode J. Ausbeute: 5,37 %
Aufarbeitung über Chromatotron

Eigenschaften Molmasse 459,2 g/ mol Aussehen: gelblich – amorphe Substanz, glasartig
C₂₇H₂₉N₃O₄ Schmelzpunkt: 294-299 °C (Erweichungsbereich)

HNMR: In MeOH **1,87** (t, 4H, N-CH) **2,37** (t, 2H, CH₂-N), **3,67**(t, 4H, N-CH) , **4,04**(t, 2H, CH₂-N) **5,44** (s, 2H, ArCH), **6,33** (d, 4H, 8,91Hz, ArH) **6,72** (d, 4H, 8,83Hz, ArH) **6,97**(d, 2H, 8,59Hz, ArH), **8,01** (d, 2H, 8,62 Hz, ArH)

IR In KBr: 3408, 3068, 2956, 1611, 1511, 1252, 1178, 1029, 841, 798

MS 459, 457, 366, 338, 253, 207, 121, 100

CHN Berechnet **C** 70.57%; **H** 6.36%; **N** 9.14%
gefunden **C** 70.61%; **H** 6.78%; **N** 9.84%

40 (4R,5S),(4S,5R)-2,5-Bis(4'-morpholinylethoxyphenyl)-4-(4'-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol

Synthese Aus (8) über Methode K, Gesamtausbeute: 1,26%. Aufarbeitung über Chromatotron und MeOH/CH₂Cl₂ – Gradienten.

Eigenschaften Glasartige, farblose Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar
C₃₃H₄₀N₄O₅, M_r = 572,3 g/mol

HNMR: In dmsO – d₆ **1,38** (4H, t, -N-CH₂-), **2,55** (4H, t, -N-CH₂-), **2,74** (2H, t, -CH₂-), **2,86** (2H, t, -CH₂-), **3,74** (8H, t+t, -N-CH₂-) **4,02** (2H, t, -CH₂-) **4,24** (2H, t, -CH₂-) **5,44** (d, 2H, 10,79, ArCH), **6,51** (d, 2H, 8,91Hz, ArH) **6,68** (d, 2H, 8,66Hz, ArH) **6,80** (d, 2H, 8,52Hz, ArH) **6,91**(d, 2H, 8,63Hz, ArH), **7,11** (d, 2H, 8,85Hz, ArH) **7,99** (d, 2H, 8,82 Hz, ArH)

IR KBr. 3431 (br, m), 3041, 1612, 1511, 1245, 1177, 1021, 834

MS 572 [M⁺], 570, 451, 366, 207, 122, 100

CHN Berechnet: **C** 69.21%; **H** 7.04%; **N** 9.78%
gefunden: **C** 68.94%; **H** 7.22%; **N** 9.82%

41 (4R,5S),(4S,5R)-4,5-Di(4'-Hydroxyphenyl)-2-(4'-morpholinylethoxyphenyl)-4,5-dihydro-1-ethyl-imidazol

Synthese Aus Verbindung (39) über Methode J. Aufarbeitung durch Chromatotron und Gradientenelution aus MeOH / CH₂Cl₂ – Gemischen. Ausbeute: 0,87 %

Eigenschaften C₂₉H₃₃ N₃ O₄ , M_r = 487,2 g/mol, glasartige, gelblich amorphe Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar

HNMR: In dmsO – d₆ **1,38** (4H, t, -N-CH₂-), **2,55** (4H, t, -N-CH₂-), **2,74** (2H, t, -CH₂-), **2,86** (2H, t, -CH₂-), **3,74** (8H, t+t, -N-CH₂-) **4,02** (2H, t, -CH₂-) **4,24** (2H, t, -CH₂-) **5,44** (d, 2H, 10,79, ArCH), **6,51** (d, 2H, 8,91Hz, ArH) **6,68** (d, 2H, 8,66Hz, ArH) **6,80** (d, 2H, 8,52Hz, ArH) **6,91**(d, 2H, 8,63Hz, ArH), **7,11** (d, 2H, 8,85Hz, ArH) **7,99** (d, 2H, 8,82 Hz, ArH)

IR KBr. 3431 (br, m), 3041, 1612, 1511, 1245, 1177, 1021, 834

MS 487 [M⁺], 485, 394, 338, 281, 206, 149, 100, 94, 29

CHN Berechnet: **C** 71.44%; **H** 6.82%; **N** 8.62%
gefunden: **C** 71.09%; **H** 6.79%; **N** 8.68%

Verbindung Eigenschaften

42 (4R,5S),(4S,5R)-4,5-Di(4'-Hydroxyphenyl)-2-(4'-morpholinylethoxyphenyl)-4,5-dihydro-1,3-diethyl-imidazolium-iodid

Synthese Aus Verbindung (33) und Methode J. Aufarbeitung durch Chromatotron und Gradientenelution. Ausbeute: 1,64 %

Eigenschaften C₃₁H₃₈N₃O₄, Glasartige, farblose Substanz, kein Schmelzpunkt bestimmbar

HNMR: In dmso – d₆ **1.38** (4H, t, -N-CH₂-), **2.55** (4H, t, -N-CH₂-), **2.74** (2H, t, -CH₂-), **2.86** (2H, t, -CH₂-), **3.74** (8H, t+t, -N-CH₂-) **4.02** (2H, t, -CH₂-) **4.24** (2H, t, -CH₂-) **5.44** (d, 2H, 10,79, ArCH), **6.51** (d, 2H, 8,91Hz, ArH) **6.68** (d, 2H, 8,66Hz, ArH) **6.80** (d, 2H, 8,52Hz, ArH) **6.91**(d, 2H, 8,63Hz, ArH), **7.11** (d, 2H, 8,85Hz, ArH) **7.99** (d, 2H, 8,82 Hz, ArH)

IR KBr. 3431 (br, m), 3041, 1612, 1511, 1245, 1177, 1021, 834

MS 516 [M⁺], 514, 423, 395, 338, 149, 100, 94

CHN Berechnet: **C** 57.86% **H** 5.95% **N** 6.53%
gefunden: **C** 57.53% **H** 6,11% **N** 6.47%

43 (4R,5S),(4S,5R)-2,4,5-Tris-(4'-morpholinylethoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol

Synthese Aus Verbindung 8 über Methode K. Gesamtausbeute: 1,24 %. Aufarbeitung über Chromatotron und Gradientenelution mit CH₂Cl₂ / MeOH - Gemischen.

Eigenschaften C₃₁H₅₉N₅ O₆ Molmasse: 685 g/Mol Farblose, amorph-viskose Substanz. Kein Schmelzpunkt bestimmbar. Verkohlungspunkt bei 223 – 227 °C

HNMR: dmso-d₆ **2.57** (8H, t), **2.65** (4H, t), **2.76** (4H, t), **2.89** (2H, t), **3.71** (8H, t), **3.74** (4H,t), **4.09** (4H, t), **4.35** (2H, t), **5.80** (2H, s), **6.79** (4H, d), **7.01** (4H, d), **7.31** (2H, d), **8.08** (2H, d)

IR KBr. 3406 (br, m), 3038 (w), 1608, 1509, 1243, 1101, 1018, 827

MS 685, 683, 479, 451, 234, 207, 100

CHN Berechnet: **C** 68.30%; **H** 7.50%; **N** 10.21%
gefunden **C** 67.93%; **H** 7.79%; **N** 10.32%

Literaturverzeichnis

- | Nr. | Titel
Verfasser, Ort der Veröffentlichung |
|------------|---|
| 1 | " Gedichte " Gottfried Benn, Reclam-Verlag, 1988 |
| 2 | " Psychembel: Klinisches Wörterbuch " 261. Auflage 2007, Verlag deGruyter |
| 3 | " Krebs in Deutschland " Mitteilung des Robert-Koch-Institutes 6.Auflage 2008 |
| 5 | " International Union of Pharmacology: LM Estrogenreceptors " K. Dahlmann-Wright et. al.
Pharmac. Rev. 2006 (58), 4, 773-781 |
| 5 | " Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. " Shao, W. and Brown, Myles <i>Breast Cancer Research</i> 2004, 6 (359-52). |
| 6 | " Signaling by estrogens " Cheskis, B. et al. <i>Cell. Phys.</i> 2007 (213), 610-618 |
| 7 | " Estrogen Receptors: How do they signal and what are their targets " N. Heldring et. al. <i>Phys. Rev.</i> 2007 (87), 905-931 |
| 8 | " Estrogen receptor transcription and transactivation. Structure–function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors " Marc Ruff et. al. <i>Breast Cancer Res</i> 2000, 2:353–359 |
| 9 | " A structural biologist's view of the oestrogen receptor " A.Pike, <i>J. Ster.Bioch. & Mol. Biol.</i> 2000 (74), 261-268 |
| 10 | " Coregulator Function: A Key to Understanding tissue specificity of Selective Receptor Modulators ", Smith, C. and O'Malley,B. <i>Endocrine Reviews</i> 25(1):45–71 |
| 11 | " Endocrine-responsive breast cancer and strategies of combating resistance " A.Simak and C. Coombes, <i>Nature Reviews</i> , 2002 (2), 101-113 |
| 12 | " (4R, 5S)/(4S/5R)-4,5-Diaryl - 4,5-dihydro-1H-imidazole als Liganden des Estrogenrezeptors " M. Schlenk, <i>Dissertation</i> 2006, betreut durch Prof. R. Gust, Freie Universität Berlin |
| 13 | " Investigations on new lead structures for the Design of Selective Estrogen Receptor Modulators " Gust, R. et. al. <i>J.Med.Chem.</i> 44:1963-1970, 2001 |
| 14 | " 4,5-Diaryl-4,5-dihydro-1H-imidazole als Liganden des Estrogenrezeptors ". M.v.Rauch <i>Dissertation</i> an der Freien Universität Berlin, betreut durch Prof. R. Gust, 2003 |
| 15 | " Molecular Mechanisms of SERM action " M. Duterre et. al., <i>J. Pharm. And Ex. Th.</i> 2000 (295), 2 431-437 |
| 16 | " Mammakarzinom ", A.C. Regierer, Deutscher Ärzteverlag 2005 |
| 17 | " D.E.S., the bitter pill " Meyers, Robert (1983)New York: Seaview / Putnam. |
| 18 | " Einblick in die Entstehung der Tamoxifen-Resistenz " Schem,C et al., <i>Gynäkologische Endokrinologie</i> , Mai 2005 (3), 2 |
| 19 | " The pharmacology and clinical uses of tamoxifen ". Furr BJ, Jordan VC (1984) <i>Pharmacol. Ther.</i> 25 (2): 127–205.
" Synthetic Estrogens and the Relation Between their Structure and their Activity " Sollmsen, U. |
| 20 | <i>Chem. Rev.</i> , 1945, 37 (3), pp 481–598 |
| 21 | " N,N'-Dialkyl-1,2-bis(hydroxyphenyl)ethylendiamines and N,N'-dialkyl-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)imidazolines. Synthesis and evaluation of their mammary tumor inhibiting |

- activity" v. Angerer et al. J. Med. Chem.
- 22 **"Struktur-Wirkungs-Studien an estrogen wirksamen Verbindungen mit 1,2-Diarylethan-Strukturelement"** Sandra Busch, Dissertation an der Freien Universität Berlin 2006, betreut durch Prof. R. Gust
- 22 **"Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug"** Lippert, B. Wiley-VCH (1999)
- 23 **"Wirkstoffdesign"** Böhm, G., Klebe, H., Kubiny, H., Verlag "Spektrum der Wissenschaften", Auflage 2002
- 24 **"Investigations on the Effects of basic side chains on the hormonal profile of (4R,5S)/(4S,5R) – 4,5-Bis(4-Hydroxyphenyl)-2-4,5-dihydro-1H-imidazoles"** M.v.Rauch et al. J. Med. Chem. 2005 (48), 466-474
- 24.1 **"Development of selectively acting platinum complexes"** Schönenberger H et. al. *Cancer Treat. Rev.* 11:125-130, 1984
- 24.2 **"Aqua-[1-(2,6-dihalo-4-hydroxyphenyl)-2-phenylenethylenediamine]sulfotaplatinum(II) - complexes with variable substituents in the 2-phenylring. 1. Synthesis and antitumor and estrogenic properties"** Gust et al. J. Med. Chem. 33:2535-2544, 1990
- 25 **"2,4-Diazapentadienes. I. Prototropy, Cyclization and Addition -Elimination"** Hunter, D. and Sim, K. *Canadian Journal of Organic Chemistry* 1972 (50), 669-678
- 26 **"2,4-Diazapentadienes. II. A Carbanion cyclisation"** Hunter, D. and Sim, K. *Canadian Journal of Organic Chemistry* 1972 (50), 679-691
- 27 **"Microwave assisted rapid synthesis of 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazoles from aromatic aldehydes"** H. Uchida et al. *Synlett.* 2003 (3), 1117-1120
- 28 **"Stereochemie"**, Hauptmann, S. Spektrum der Wissenschaften, 1. Auflage 1996
- 29 **"Regioselective Synthesis of 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-imidazoles and 2,4,5-Triarylimidazoles from available reagents"** N. Loszinskaya, 2003 (52), 3, 674-678
- "The Diaza-Cope-Rearrangement"** Vögtle, Godschmitt. *Chem. Ber.* 17:1-40, 1976
- 30
- 31 **"Synthese und pharmakologische Untersuchung von Liganden des Estrogenrezeptors und Inhibitoren der Cyclooxygenase"** T. Wiglenda, Dissertation 2004, betreut durch Prof. R. Gust, Freie Universität Berlin
- 32 **"One-pot-synthesis of 4,5-dihydro-1H-imidazoles from aldehydes"** H. Fujioka et al., *Tetrahedron*, 2007 (63), 63, S. 638-643
- 32 **"Investigations on the Influence of Halide Substituents on the Estrogen Receptor Interaction of 2,4,5-Tris-(4-Hydroxyphenyl)-imidazoles"** Ronald Gust 2003, *Arch. Chem. Pharm.*, 2003, 456 -465
- 33 **"Direct conversion of aldehydes to 2-4,5-dihydro-1H-imidazoles using molecular iodine"** M. Ishihara, *Tetrahedron* 2007 (63), 1474-1480
- 34 **"An efficient an one-pot-synthesis of 4,5-dihydro-1H-imidazoles and benzimidazoles via anaerobic oxidation of carbon-nitrogen-bonds in water"** P. Gogoi and D. Konwar, *Tetrahedron Letters* 2006 (47), 79-82
- 35 **"Mass Spectroscopy of 2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazoles"**
"Effects of C2-Alkylation, N-Alkylation and N,N'-Dialkylation of 2,4,5-dihydro-1H-imidazoles"
 M.v.Rauch et al., *J. Med. Chem.*, 2004 (447), 915-927
- 36 **"Hydrolysis of 2-substituted 4,5-dihydro-1H-imidazoles"** V. Litsky, 2007, 80(5), 782-787
- 37 <http://icbp.ibl.gov/breastcancer/celllines.php>, Informationen über Zell-Linien der Universität

Berkley

- 38 **"Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor"** vonKleist,S. *Nat.Canc,Inst.* 1975, Sept. (5)
- 39 **"The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases."** Viviani, VR, *Cell Mol Life Sci.* 2002 Nov;59(11):1833-50.
- 40 **"Regulation of the apoptosis–necrosis switch"** P. Nicotera and G. Melino, *Oncogene* (2004) 23, 2757–2765
- 41 **"Potential Mechanisms of Estrogen Carcinogenesis"** J. Bolton, 2007, 21, 93-101
- 42 **"Small-Molecule Inhibitors of the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction to Reactivate p53 Function: A Novel Approach for Cancer Therapy"** Sanjeev Shangary and Shaomeng Wang, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2009. 49:223–41
- 42 **"Preferential induction of necrosis in human breast cancer cells by a p53 peptide derived from the MDM2 binding site"** Do, T.N. et al., *Oncogene* (2003) 22, 1431–1444
- 44 **"In-vitro-Toxizität genzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose"**, Dissertation von A. Jelinek, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg 2001, betreut von Prof. Dr. Klöcking
- 45 **"Fatty Imidazolines: Chemistry, Syntesis, Properties and Industrial Applications"** Bajpaj, D. and Tyagi, V.K. *Journal of Oleo Science* 2006, 55 (7), 319-329
- 46 **"Cyclooxygenase (COX) Inhibitors: A Comparative QSAR Study"** Rajni Garg et al. *Chem. Rev.* 2003, 103, 703-731
- 47 **"COX2-Inhibition: Effects of Tumor growth in a xenograft model of breast cancer"** N.L. Barnes, *Brit.J. Of Cancer,* 2007, 96(4), 575-582
- 48 **"Cyclooxygenase inhibitors modulate the p53/HDM2 pathway and enhance chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma"** L.Lau et al. *Oncogene,* (2007) 26, 1920–1931
- 49 **"Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention"** G.Davies et. al. *Annals of Oncology* 13: 669–678, 2002
- 50 <http://www.pathologen-luebeck.de/Methoden/Immunhistologie/Antikorper/p53/p53.html>
- 51 **"Overexpression of wild-type p53 gene renders MCF-7 breast cancer cells more sensitive to the antiproliferative effect of progesterone"** M Alkhalaf and AM El-Mowafy.*Journal of Endocrinology* (2003) 179, 55-62
- 52 **"Implications of p53 in growth arrest and apoptosis on combined treatment of human Mammary epithelial cells with topotecan and UCN-01"**. Redkar, A. et. al. [J Exp Ther Oncol.](http://www.jco.org) 2004 Oct;4(3):213-22.
- 53 **Wild-type p53 gene transfer into mutated p53 HT29 cells improves sensitivity to photodynamic therapy via induction of apoptosis** [Barberi-Heyob M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/153580) et. al. [Int J Oncol.](http://www.intj.oncol.net) 2004 Apr;24(4):951-8.
- 54 **"In vivo activation of the p53 pathway by small molecule antagonists of p53"** Vassiliev, L.T. et. al *Science,* 303_ 844-848, 2004
- 55 **"Cis-Imidazolines"** Norman Kong et. al. US. Patent application, *US2003/0153580*
- 56 **"Synthesis and SAR of novel 4,5-diarylimidazolines as potent P2X7 receptor antagonists."** Merriman GH et. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005 Jan 17 15(2), 435 - 138
- 57 **"Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen dem Tumorsupressorgen p53 und dem Sauerstoffpartialdruck in primären Mammakarzinomen"** Wolf, Peter. Dissertation München 2004
- 58 <http://www.brustkrebs-info.de/patienten-info/index.php?id=6.0&stat=open>, abgerufen am 24.02.2009

Persönliches

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Wissenschaftliche Beiträge

Poster:

- 2008, Berlin
sich „2,4,5-Triarylimidazolines: a New Hope?“ „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt vor“ Veranstaltung der DPhG-Landesgruppe Berlin
- 2007, Petersburg Targeting Breast Cancer with 2,4,5-Triarylimidazolines
Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry
- 2007, Amsterdam 2,4,5-triarylimidazolines: a new class of active anticancer drugs
3rd World Congress of. the Board of Pharmaceutical Sciences of FIP
- 2007, Berlin 2,4,5-triarylimidazolines as potentially active anticancer drugs
Frontiers in Medicinal Chemistry, GdCH
- 2006, Berlin Cytotoxic properties of 2,4,5-triarylimidazolines with varying substitution patterns Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Veranstaltung der DPhG – Landesgruppe Berlin
- 2005, Leipzig Triarylimidazolines with basic side chains Frontiers in Medicinal Chemistry

Kurzvortrag:

- 2008, Bonn The ability of 2,4,5-Triarylimidazolines to target Cancer
Jahrestagung der DPhG

Abstract:

This thesis deals with the synthesis of (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazoles and their testing for estrogenicity, antiestrogenicity and cytotoxicity.

The aim was to create compounds able to interact with the estrogen receptor by combining 4-OH groups with Cl substituents in the aromatic rings. Subsequently, the active profile of an antagonist should have been obtained by basic side chains clinging to one of the phenolic groups.

(4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(hydroxyphenyl)-4,5-dihydroimidazole **8** is virtually inactive. A significant improvement of estrogenic effects can be obtained by substitution with halogens in the aromatic rings. Cytotoxic properties are enhanced concomitantly.

Alkylation of N1, too, aggravates the estrogenic effects. Strong Reinforcements -as observed with 4,5-Diaryl-4,5-dihydroimidazole- failed to appear.

The introduction of basic side chains in the phenolic substituent of C5 of the imidazoline leads to a loss of estrogenic activity. The ladder can be maintained if the basic side chain is introduced in the aromatic substituent in position C2 of the 4,5-Dihydroimidazole. This could be a hint that (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole are type II-estrogens. N-alkylated (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazoles with basic side chains showed neither estrogenic, antiestrogenic nor cytotoxic effects, whether they were monoalkylated or bisalkylated.

Due to the fact that halogenated (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazoles increase their cytotoxicity parallel to their lipophilic properties, a variation of (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazoles were synthesized. The relation between structure and cytotoxic activity was determined on basis of these compounds. Compound **1** was defined as lead structure.

A preliminary investigation showed the C2 phenylring to be of high importance for cytotoxicity. Based on Compound **1** (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazole substituted in Position 2,3 and/or 4 of the aromatic rings were derived. Doing so in position 4 of the aromatic rings halogenated (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazoles turned out to be in favour compared to other positions or substituents.

Thereupon the modification of the substituents in position 4 of the aromats showed that cytotoxicity correlated with the lipophilic properties of the compounds. The effects occurs largely within 48 hours.

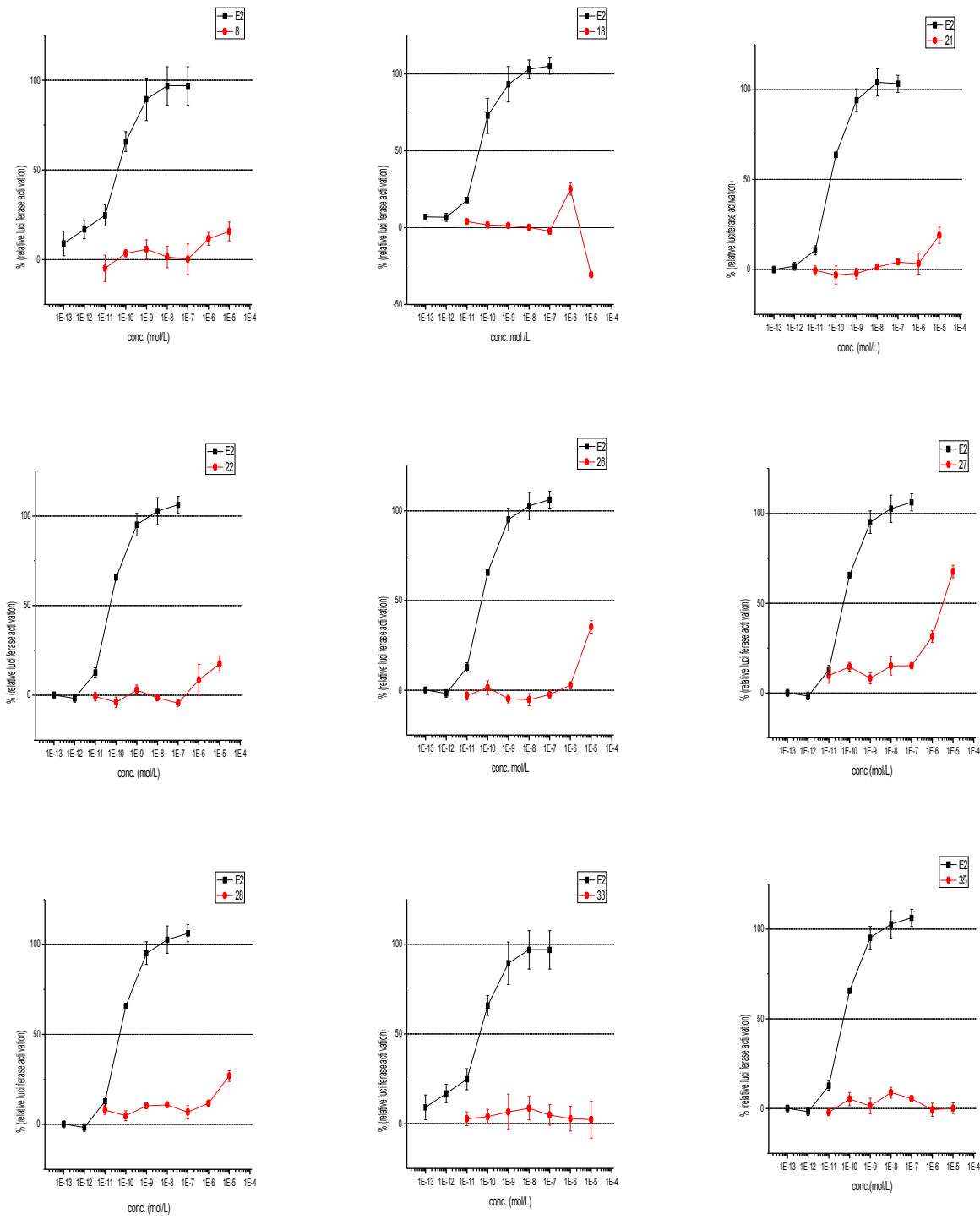
Examination of cell morphology after exposition of (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazoles suggests that the reason might be apoptosis, but allows no clear assertion .

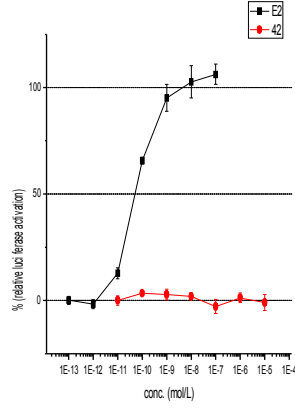
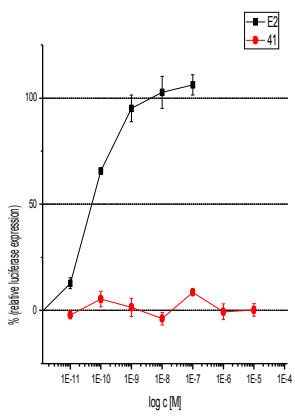
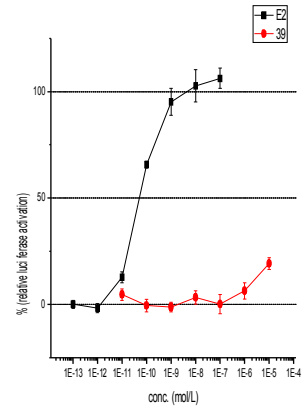
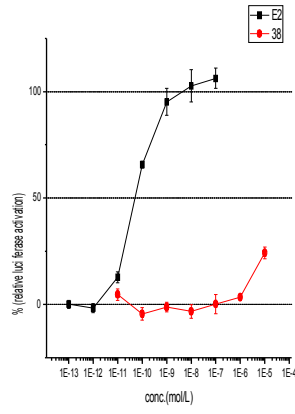
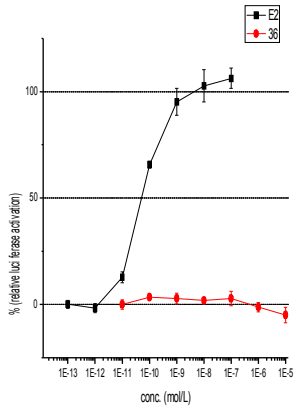
The cytotoxicity of (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazoles is increased bei N-Alkylation. A different IC_{50} of monoalkylation or bisalkylation could not be showed in this thesis, but different cytotoxicity-concentration-courses may be a sign of different acting mechanisms.

Hydrophilic (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazoles showed -with exception of compound 5 and 43- no signs of inhibiting proliferation. The cytotoxicity-concentration-courses of 5 and 43 are similar to bisalkylated compounds. (Fast dropping concentration-activity-courses and slow dropping of IC_{50} over measurement duration).

The cytotoxicity of lipophilic (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydroimidazoles initiates fast and leads to characteristic alterations within cell morphology, which can be documented photographically. These alterations lead to cell death within 24 hours. They may have different reasons, as discussed within this thesis. Because of structural analogies of the synthesized compounds to already known compounds -e.g. inhibitors of murine/ humane double minute protein (MDM2/HDM2) further investigations should be aimed for.

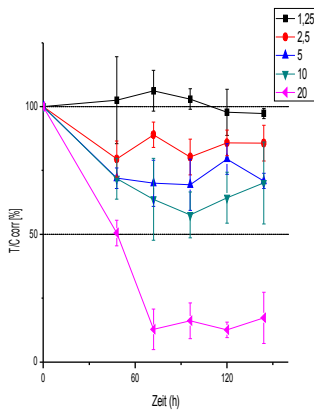
Anlage I: Estrogenität von 2,4,5-Triarylimidazolinen



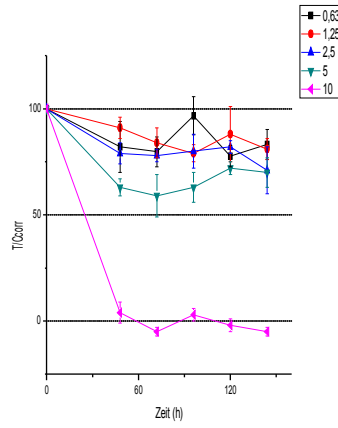


Anlage I: Zytotoxizität

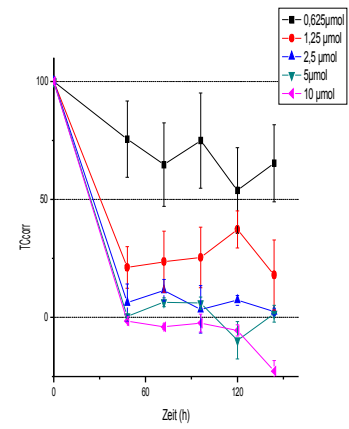
1. Zeitabhängige Zytotoxizität



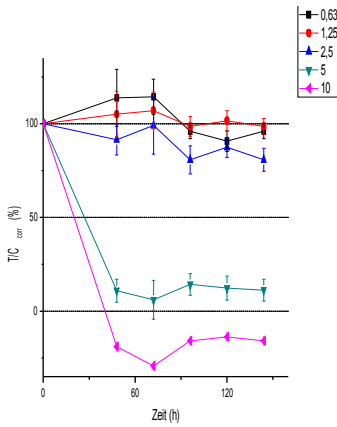
Verbindung 1



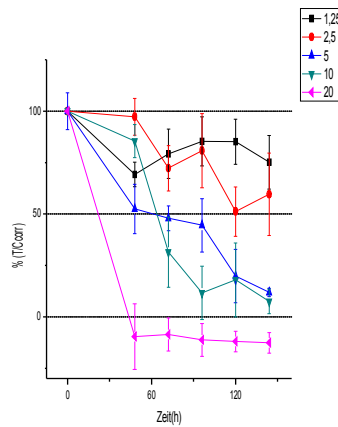
Verbindung 2



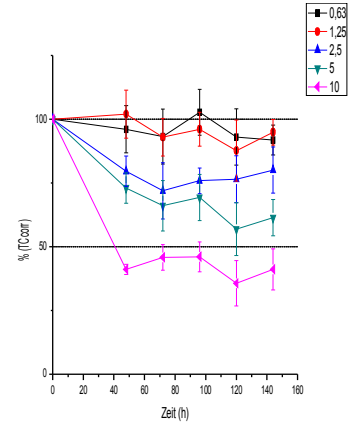
Verbindung 3



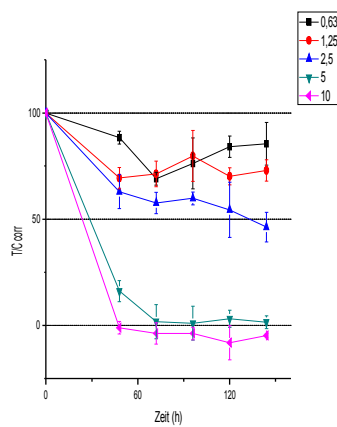
Verbindung 4



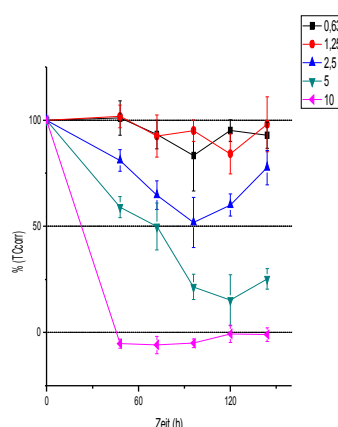
Verbindung 5



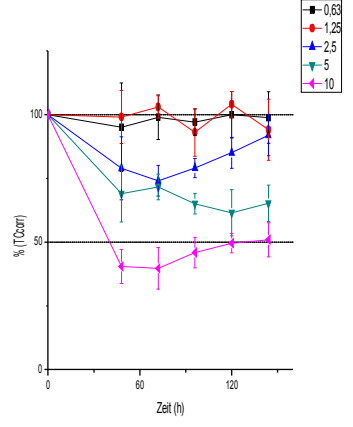
Verbindung 6



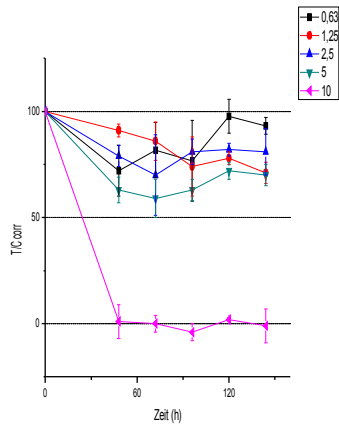
Verbindung 7



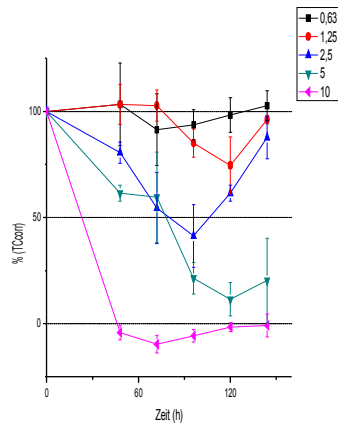
Verbindung 10



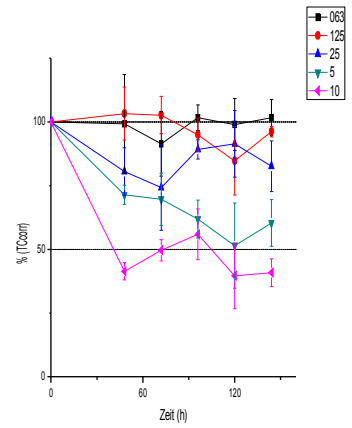
Verbindung 11



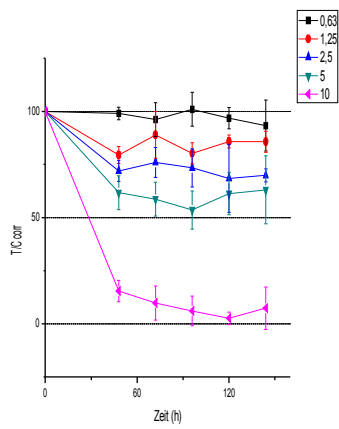
Verbindung 12



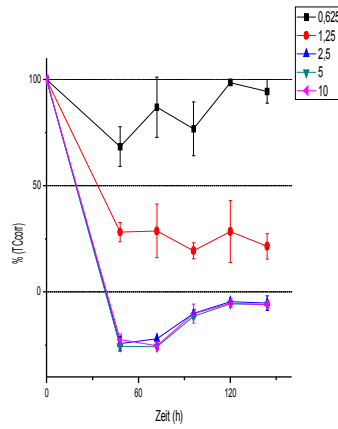
Verbindung 13



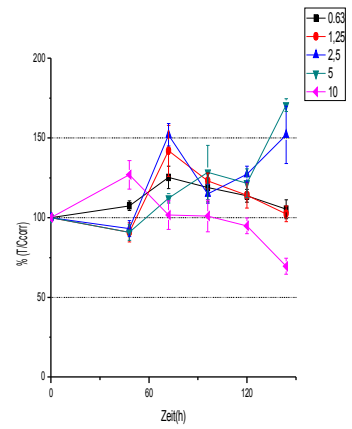
Verbindung 14



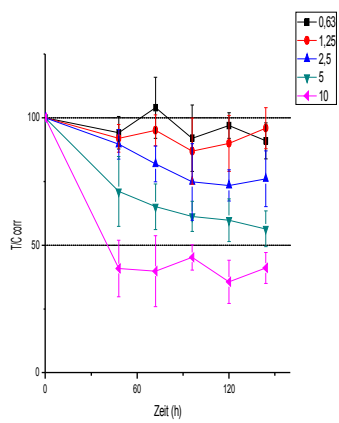
Verbindung 16



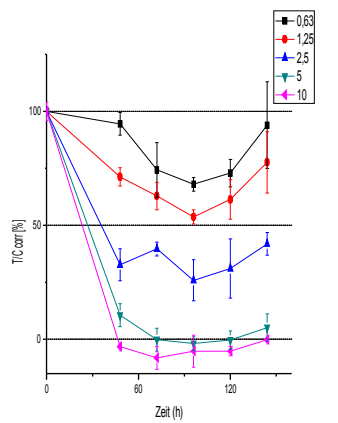
Verbindung 17



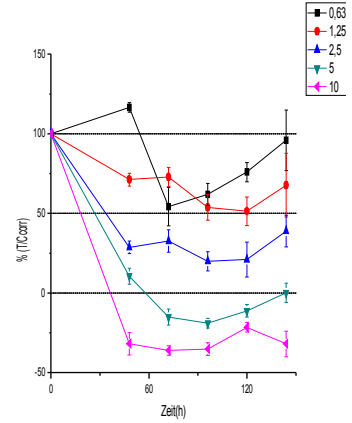
Verbindung 18



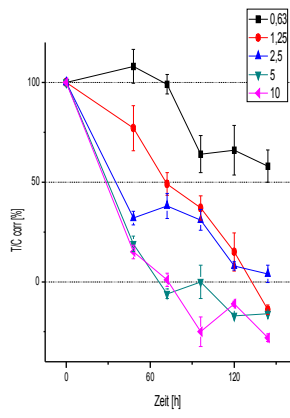
Verbindung 21



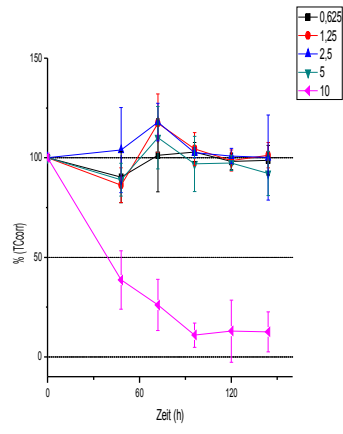
Verbindung 23



Verbindung 25

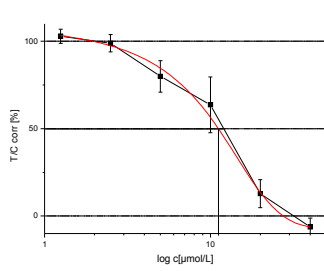


Verbindung 30

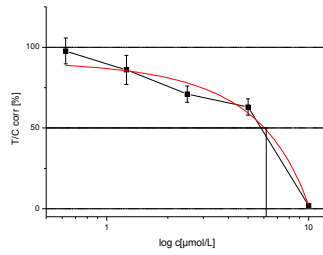


Verbindung 43

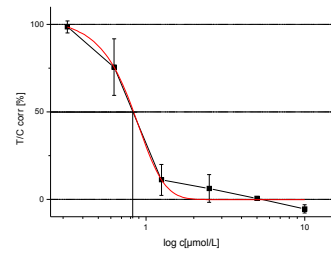
2. Bestimmung des IC₅₀



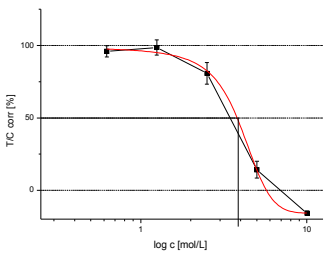
Verbindung 1
IC₅₀ = 11,2(± 0,4) µmol
nach 72 h



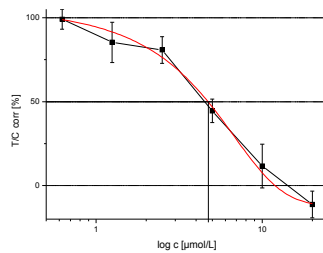
Verbindung 2
IC₅₀ = 6,8(± 0,3) µmol
nach 48 h



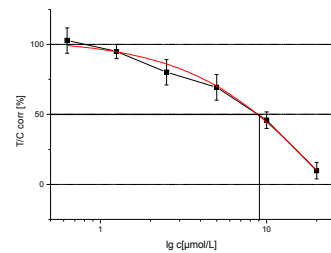
Verbindung 3
IC₅₀ = 0,85(± 0,2) µmol
nach 48 h



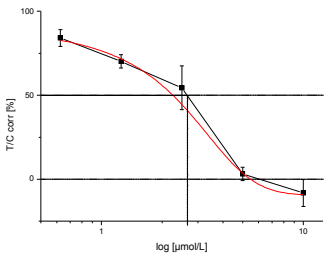
Verbindung 4
C₅₀ = 3,9 (± 0,4) µmol
nach 48 h



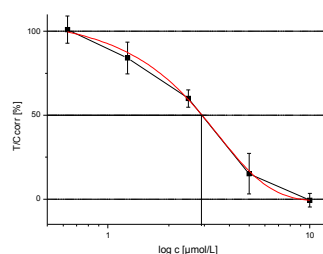
Verbindung 5
IC₅₀ = 4,9(±0,3) µmol
nach 72 h



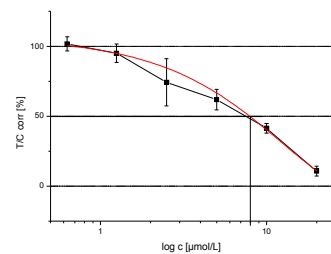
Verbindung 6
IC₅₀ = 9,0 (± 0,6) µmol/L
nach 48 h



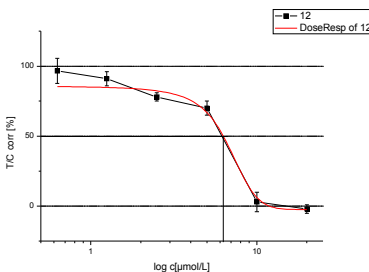
Verbindung 7
IC₅₀ = 2,7 (±0,5) µmol
nach 48 h



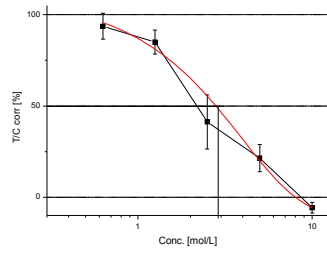
Verbindung 10
IC₅₀ = 2,7(± 0,5) µmol
nach 48h



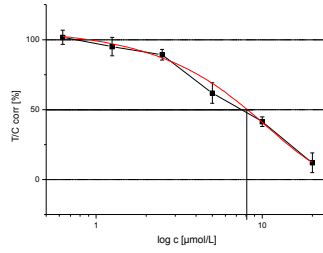
Verbindung 11
IC₅₀ = 8,0 (± 0,3) µmol
nach 48h



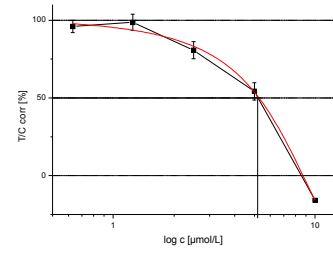
Verbindung 12
6,3 (± 0,4) µmol/L
nach 48 h



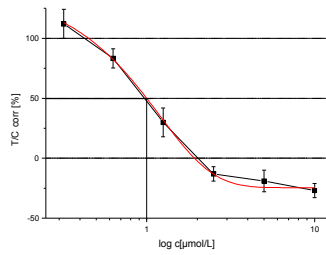
Verbindung 13
 $IC_{50} = 3,0 (\pm 0,7) \mu\text{mol}$
 nach 48h



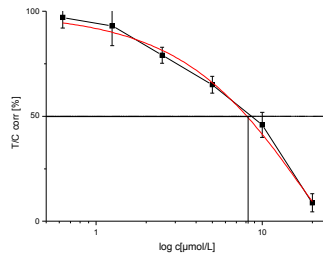
Verbindung 14
 $IC_{50} = 8,6 (\pm 0,4) \mu\text{mol}$
 nach 48 h



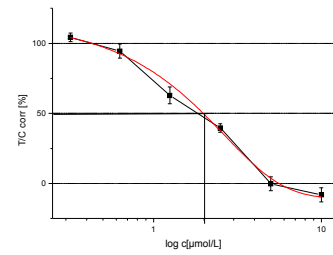
Verbindung 16
 $IC_{50} = 5,4 (\pm 0,3) \mu\text{mol/L}$
 nach 48 h



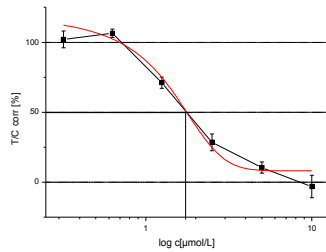
Verbindung 17
 $IC_{50} = 0,8 (\pm 0,2) \mu\text{mol/L}$
 nach 48 h



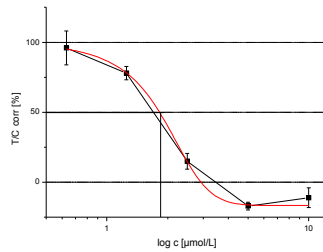
Verbindung 21
 $IC_{50} = 8,5 (\pm 0,7) \mu\text{mol/L}$
 nach 48 h



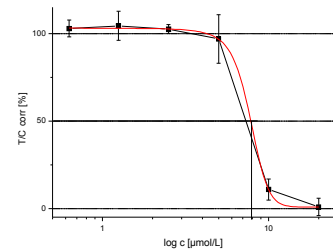
Verbindung 23
 $IC_{50} = 2,1 (\pm 0,3) \mu\text{mol/L}$
 nach 72 h



Verbindung 25
 $1,7 (\pm 0,2) \mu\text{mol/L}$
 nach 72 h



Verbindung 30
 $1,8 (\pm 0,3) \mu\text{mol/L}$
 nach 144 h



Verbindung 43
 $IC_{50} = 7,9 (\pm 0,9) \mu\text{mol/L}$
 nach 144 h