

**Synthese und pharmakologische Untersuchung neuer Benzimidazole als
fluoreszierende Liganden des Estrogenrezeptors**

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
SANDRA DETTMANN
aus Berlin

Juni, 2006

1. Gutachter
2. Gutachter

Prof. Dr. R. Gust
Prof. Dr. M. Gütschow

Disputation am 09. Juni 2006

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2002 bis Juni 2006 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin.

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. R. Gust für die Überlassung des interessanten Themas und die Freiheit bei der Bearbeitung,

Frau Prof. Dr. Müller am Pharmazeutischen Institut in Bonn-Poppelsdorf für die Durchführung der Radioliganden-Bindungsassays am Adenosinrezeptor,

und allen Mitarbeitern und Kollegen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zusammenfassung

Angelehnt an das Antiestrogen Raloxifen wurden strukturanaloge Benzimidazole mit basischer Seitenkette synthetisiert, die neben ER-Affinität ausreichende Fluoreszenzeigenschaften aufweisen sollen, um zum Studium von z.B. ER-Ligand-Interaktionen eingesetzt werden zu können. Bereits die Gruppe der 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole zeigte in einem Konzentrationsbereich von 10^{-6} - 10^{-5} M die Abnahme der E2-induzierten Luciferase-Expression, die aber eher auf zytotoxische als auf antiestrogene Eigenschaften zurückzuführen ist. Durch Einführung einer zusätzlichen Hydroxygruppe in 5- oder 6-Position des Benzimidazolrings konnte eine antiestrogene Wirkung erreicht werden, während die zytotoxischen Eigenschaften auf MCF-7 Zellen im Vergleich zu den 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazolen geringer waren. Es wurde gezeigt, dass die Stellung der 5-(6)-Hydroxygruppe keinen nennenswerten Einfluss auf die antiestrogenen Eigenschaften ausübte. Die 4'-OH-Gruppe spielte für die Antiestrogenität eine untergeordnete Rolle. Keine der Verbindungen konnte eine agonistische Wirkung im Luciferase-Assay an MCF-7 Zellen entfalten. Aufgrund der durchgeführten Molecular Modeling Untersuchungen lässt sich ein Raloxifen-analoger Bindungsmodus der 5-(6)-OH-Benzimidazole, mit Wasserstoffbrücken der Hydroxygruppe des Benzimidazolgerüsts zu den Aminosäuren Glu 353 und Arg 394 und einem konservierten Wassermolekül sowie der phenolischen Hydroxygruppe zum His 524 des ER α vermuten. Die basische Seitenkette bildet dabei eine Salzbrücke zur Carboxylatgruppe des Asp 351 aus.

Alle neu synthetisierten Benzimidazole zeigten ausgeprägte antiproliferative Eigenschaften an der MCF-7 Zelllinie, die nicht mit der Antiestrogenität am ER in Einklang zu bringen sind. Einzelne Verbindungen erwiesen sich zusätzlich an der MDA-MB 231 Zelllinie als zytotoxisch. Auf intrazellulärer Ebene spielen hierbei möglicherweise DNA-Wechselwirkungen, die durch Fluoreszenzlöschung bei Zugabe einer DNA-Lösung zur Substanzlösung belegt werden konnten, eine entscheidende Rolle. Eine interkalierende Wirkung konnte mittels DNA-Schmelzpunktbestimmung nicht belegt werden. Vielmehr bestätigte diese Untersuchung eine nicht-

interkalierende Substanz-DNA-Interaktion. Für Verbindung **57b** konnte in einem Radioligand-Bindungsassay eine selektive Affinität zum A₁-AR nachgewiesen werden, die ebenfalls die Proliferation der MCF-7 Zellen beeinflussen kann. Für diese Verbindung wurde ein K_i-Wert von 3.7 μM ermittelt.

Alle Verbindungen zeigten ausgeprägte Fluoreszenzeigenschaften. Die Einführung der Hydroxygruppe am Benzimidazolgerüst führte zu einer deutlichen bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums (≈400 nm) im Vergleich zu den am Benzimidazol unsubstituierten Verbindungen. Als besonders geeignet für weiterführende pharmakologische Arbeiten stellte sich das 6-OH-Isomer der Verbindung **57a** heraus, das ein zweites längerwelliges Emissionsmaximum (490 nm) in PBS mit ausreichender Intensität außerhalb der Zellfluoreszenz aufwies. Für diese Verbindung konnte die Substanzaufnahme in die Zelle mittels Fluoreszenzmessungen belegt werden.

Die Bestimmung von Protein-Fluorophor-Wechselwirkungen ist prinzipiell möglich, da die Fluoreszenz der Benzimidazole durch Proteine nicht beeinflusst wird. Weiterführende Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie und FKS erfordern eine Verbesserung der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften (Absorption und Emission im längerwelligeren Bereich, Erhöhung der Fluoreszenzintensität).

Summary

Raloxifene is a well known ligand for the estrogen receptor. It was the intention of this thesis to synthesize analogous benzimidazoles with basic side chains. These compounds should have good affinity to the estrogen receptor and additionally sufficient fluorescence properties to be used in studies of ER-ligand interactions.

The group of 2-(4-hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazoles showed already a reduction of the E2-induced luciferase-expression in concentrations of 10^{-6} - 10^{-5} M. This observation could be explained by cytotoxic properties rather than by antiestrogenic activity. An additional hydroxy-substitution at the 5- or 6-position of the benzimidazole resulted in antiestrogenic activity whereas the cytotoxic effects against ER-positive MCF-7 cells were reduced. The difference between the 5- and 6-hydroxybenzimidazoles in the inhibition of gene activation of breast cancer MCF-7 2a cells was not very pronounced. Also the para-hydroxylation in the 2-arylring did not increase the antagonistic effects. No compound possessed agonistic properties on ER mediated gene activation. As a result of molecular modeling studies a binding mode similar to raloxifene can be assumed. The 5-(6)-OH-benzimidazoles interact at the LBD via hydrogen bonds between the 5-(6)-OH-group and the Glu 353 and Arg 394 and a structurally conserved water molecule. The phenolic hydroxy forms a second H-bond to His 524. The basic side chain binds to the carboxylate group of Asp 351.

All of the new synthesized benzimidazoles exhibited significant antiproliferative properties on MCF-7 cells which do not correlate with the antiestrogenic activity on the estrogen receptor. Some of the compounds also inhibited the growth of the hormone-independent MDA-MB 231 cell line.

A possible explanation for the cytotoxicity is the interaction with the DNA. The fluorescence quenching by addition of calf thymus DNA (CT-DNA) to the benzimidazole solution supported this assumption. In fact, the CT-DNA studies suggest that the compounds do not intercalate between the base-pairs.

A selective affinity ($K_i = 3.7 \mu\text{M}$) of compound **57b** on the A_1 -adenosine receptor was confirmed using radioligand-binding assays. The adenosine receptor also plays an important role in regulating cell death and proliferation.

All of the compounds showed marked fluorescence properties. Compared to the 2-(4-hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazoles the introduction of an additional hydroxy-group in the benzimidazole core led to a significant shift of the emission maximum to higher wavelength ($\approx 400 \text{ nm}$). Especially suitable for further pharmacological investigations was compound **57a** with a second emission maximum in PBS at higher wavelength (490 nm) and good intensity out of the cellular autofluorescence. Cellular uptake was confirmed by fluorescence measurements.

Principally, the determination of protein-fluorophor-interactions is possible because proteins do not influence the emission of the benzimidazoles. Nevertheless, for a routinely use of the novel benzimidazoles in fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence microscopy further improvement of the absorption- and fluorescence properties is needed (absorption and emission at higher wavelengths, increase in fluorescence intensity).

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Estrogene und Phytoestrogene	4
1.2	Der Estrogenrezeptor	6
1.2.1	Allgemeines	6
1.2.2	Aufbau des Estrogenrezeptors	7
1.2.3	Rezeptortransformation und Genaktivierung.....	10
1.2.4	Koregulatoren und Wachstumsfaktoren	12
1.2.5	Liganden des Estrogenrezeptors.....	13
1.2.6	Interaktion des physiologischen Liganden E2 mit der LBD des ER α	15
1.2.7	Nicht-steroidale Agonisten.....	15
1.2.8	„Aktive“ Antagonisten	17
1.2.9	„Reine“ Antagonisten.....	18
1.2.10	„Passive“ Antagonisten.....	20
1.3	Der Adenosinrezeptor	21
1.3.1	Aufbau des Adenosinrezeptors	21
1.3.2	Liganden des Adenosinrezeptors	22
1.3.2.1	Agonisten des Adenosinrezeptors.....	22
1.3.2.2	Antagonisten des Adenosinrezeptors.....	23
1.3.3	Beteiligung der Adenosinrezeptoren an der Zellproliferation	24
2	PROBLEMSTELLUNG	29
3	AUSWAHL DER STRUKTUREN	33
4	SYNTHETISCHER TEIL	39
4.1	Übersicht über die synthetisierten Verbindungen und Synthesewege	39
4.2	Synthese von Nitrilen.....	43
4.2.1	Synthese von Benzonitrilen unter Verwendung von Blei-(IV)-acetat	43
4.2.2	Synthese von Benzonitrilen unter Verwendung von Hydroxylamin.....	44
4.2.3	Synthese von 4-Benzyloxy-2-halobenzonitrilen	45
4.3	Synthese von Benzimid Säureethylestern	46
4.3.1	Synthese von Benzimid Säureethylester-HCl und 4-Methoxybenzimid Säureethylester-HCl	46
4.3.2	Synthese von Benzimid Säureethylester-Hydrotetrafluorboraten.....	47
4.4	Synthese des 4-Benzyloxy-1,2-phenylendiamins	49
4.5	Synthese von Benzimidazoln	50
4.5.1	Benzimidazolsynthese aus 1,2-Phenylendiaminen und Carbonsäuren unter Verwendung von „Phosphoniumhydriden“	50
4.5.2	Benzimidazolsynthese aus 1,2-Phenylendiaminen und Carbonsäuren unter Verwendung von Polyphosphorsäure	52

4.5.3	Benzimidazolsynthese aus 1,2-Phenylendiaminen und Benzimid säureethylestern.....	52
4.6	Synthese des 4-(2-Chlorethoxy)benzylbromids.....	54
4.7	Synthese von 4-(2-Piperidin-1-yl-ethoxy)benzylbromid-HBr, 4-(2-Dimethylamino-1-yl-ethoxy)benzylbromid-HBr und 4-(2-Pyrrolidin-1-yl-ethoxy)benzylbromid-HBr	55
4.8	Synthese der 2-Phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1<i>H</i>-benzimidazole .	57
4.9	Etherspaltung von Benzyl- und Methoxyschutzgruppen.....	59
4.9.1	Selektive Entfernung von Benzylschutzgruppen.....	59
4.9.2	Entfernung von Methyl- und Benzylschutzgruppen unter Verwendung von AlCl ₃ und Ethanthiol.....	60
5	HPLC-METHODENENTWICKLUNG ZUR ISOMERENTRENNUNG....	65
5.1	Umkehrphasen-Chromatographie	66
5.2	Stationäre Phase	66
5.3	Mobile Phase	66
5.4	Detektion	67
5.5	Methodenentwicklung zur Isomerentrennung (MPLC).....	67
5.6	Präparative Isomerentrennung	69
6	STRUKTURUNTERSUCHUNGEN	73
6.1	Strukturaufklärung mittels ¹H-NMR und NOE-Differenzspektren.....	73
6.2	Eigenschaften von Benzimidazolen	78
6.2.1	Tautomerie von Benzimidazolen.....	78
6.2.2	Basizität und Azidität von Benzimidazolen	79
7	UV-SPEKTREN AUSGEWÄHLTER BENZIMIDAZOLDERIVATE	83
8	FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	93
8.1	Allgemeines zur Fluoreszenz.....	93
8.1.1	Strukturelle Voraussetzungen	94
8.2	Fluoreszenzmarkierte Estrogenrezeptor-Liganden	95
8.2.1	Einsatzmöglichkeiten fluoreszenzmarkierter ER-Liganden.....	95
8.2.2	Anforderungen an fluoreszenzmarkierte ER-Liganden.....	96
8.3	Fluoreszenzmarkierungsmethoden.....	96
8.3.1	Konjugate aus ER-Liganden und Fluoreszenzmarkern	96
8.3.2	Photofluorogene ER-Liganden.....	98
8.3.3	Inhärent fluoreszierende ER-Liganden	99
8.4	Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen	101
8.4.1	Fluoreszenzuntersuchungen in Methanol	102
8.4.2	Fluoreszenzuntersuchungen in PBS.....	104
8.4.3	Fluoreszenzuntersuchungen im sauren und basischen Medium.....	106
8.4.4	Fluoreszenzuntersuchungen in DNA- und Protein-Lösungen.....	109
8.5	Diskussion der Ergebnisse	110

9	PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	113
9.1	Luciferase-Assay an MCF-7 2a Zellen und Zytotoxizitätstests	113
9.1.1	Bestimmung der agonistischen und antagonistischen Wirkung an MCF-7 2a Zellen (Luciferase-Assay).....	113
9.1.1.1	Ermittlung der agonistischen Wirkung.....	114
9.1.1.2	Ermittlung der antagonistischen Wirkung.....	114
9.1.2	In vitro Zytotoxizitätstest an der MCF-7 und der MDA-MB 231 Zelllinie	115
9.1.2.1	Die MCF-7 Zelllinie	116
9.1.2.2	Die MDA-MB 231 Zelllinie	116
9.1.3	Ergebnisse der agonistischen und antagonistischen Wirkung an MCF-7 2a Zellen und der Zytotoxizitätstests.....	117
9.1.3.1	2-(4-Methoxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1 <i>H</i> -benzimidazole	117
9.1.3.1.1	Agonistische und antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen.....	118
9.1.3.1.2	Antiproliferative Wirkung an der MCF-7 Zelllinie	119
9.1.3.1.3	Antiproliferative Wirkung an der MDA-MB 231 Zelllinie	120
9.1.3.2	2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1 <i>H</i> -benzimidazole	121
9.1.3.2.1	Agonistische und antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen.....	121
9.1.3.2.2	Antiproliferative Wirkung an der MCF-7 Zelllinie	122
9.1.3.2.3	Antiproliferative Wirkung an der MDA-MB 231 Zelllinie	123
9.1.3.3	5-(6)-Methoxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1 <i>H</i> -benzimidazole.....	124
9.1.3.3.1	Agonistische und antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen.....	124
9.1.3.3.2	Antiproliferative Wirkung an der MCF-7 Zelllinie	125
9.1.3.3.3	Antiproliferative Wirkung an der MDA-MB 231 Zelllinie	126
9.1.3.4	5-(6)-Hydroxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1 <i>H</i> -benzimidazole	127
9.1.3.4.1	Agonistische und antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen.....	127
9.1.3.4.2	Antiproliferative Wirkung an der MCF-7 Zelllinie	129
9.1.3.4.3	Antiproliferative Wirkung an der MDA-MB 231 Zelllinie	131
9.1.4	Diskussion der Testergebnisse	132
9.1.4.1	Vorbetrachtungen - Molecular Modeling-Untersuchungen.....	132
9.1.4.2	Agonistische und Antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen	133
9.1.4.3	Zytotoxizität an der MCF-7 Zelllinie und MDA-MB 231 Zelllinie.....	136
9.2	Mikroskopische Beobachtungen an MCF-7 Zellen	138
9.2.1	Testergebnisse	138
9.2.2	Diskussion der Testergebnisse	139
9.3	Zeitabhängige Zellaufnahme	142
9.3.1	Testergebnisse	142
9.3.2	Diskussion der Testergebnisse	143
9.4	DNA-Interkalation	143
9.4.1	Denaturierung der DNA	143
9.4.2	Testergebnisse	145

9.4.3	Diskussion der Testergebnisse	145
9.5	Affinität zum Adenosinrezeptor	146
9.5.1	Testergebnisse	147
9.5.2	Diskussion der Testergebnisse	148
10	ZUSAMMENFASSUNG	153
11	EXPERIMENTELLER TEIL.....	159
11.1	Synthetischer und analytischer Teil.....	159
11.1.1	Materialien und Methoden	159
11.1.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	159
11.1.1.2	Arbeitsvorschriften - Analytische Daten	160
11.1.1.2.1	Aldehyde	160
11.1.1.2.2	Nitrile	161
11.1.1.2.3	Benzamide	167
11.1.1.2.4	Benzimid säure ethylester	171
11.1.1.2.5	4-Benzyloxy-1,2-phenylendiamin	178
11.1.1.2.6	2-Phenyl-1 <i>H</i> -benzimidazole	179
11.1.1.2.7	2-Phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1 <i>H</i> -benzimidazole	194
11.1.1.2.8	Etherspaltung	218
11.1.1.3	HPLC-Methoden.....	226
11.1.1.3.1	HPLC-System.....	226
11.1.1.3.2	Mobile Phase.....	227
11.1.1.3.3	Probenvorbereitung.....	227
11.1.1.3.4	Versuchsbedingungen.....	227
11.2	Biochemischer und pharmakologischer Teil	228
11.2.1	Materialien	228
11.2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	228
11.2.1.2	Reagenzien und Lösungen	229
11.2.1.3	Zellkulturmedien	230
11.2.1.4	Zelllinien	231
11.2.2	Methoden	231
11.2.2.1	Allgemeine zellbiologische Arbeiten.....	231
11.2.2.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen	231
11.2.2.1.2	Passagieren der Zellen	231
11.2.2.1.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen	232
11.2.2.1.4	Zellzahlbestimmung	232
11.2.2.1.5	ct-FCS	233
11.2.2.2	Bestimmung der agonistischen und antagonistischen Wirkung (Luciferase-Assay).....	233
11.2.2.2.1	Zellanzucht	233
11.2.2.2.2	Zellaussaat	234
11.2.2.2.3	Substanzzugabe.....	234

11.2.2.2.4	Aufarbeitung - Messung der Lumineszenz.....	236
11.2.2.2.5	Bestimmung der Zellmasse (Kristallviolett)	236
11.2.2.2.6	Auswertung.....	237
11.2.2.3	Zytotoxizitätstest.....	237
11.2.2.3.1	Anzucht und Aussaat der Zellen.....	237
11.2.2.3.2	Substanzzugabe.....	238
11.2.2.3.3	Aufnahme der Messpunkte (Abstoppen).....	238
11.2.2.3.4	Bestimmung der Zellmasse im Kristallviolett-Assay.....	239
11.2.2.4	Mikroskopische Zellbeobachtungen	239
11.2.2.5	Zellaufnahme von 1 <i>H</i> -Benzimidazolen.....	240
11.2.2.5.1	Zellaussaat und Substanzzugabe	240
11.2.2.5.2	Probenaufbereitung.....	240
11.2.2.5.3	Fluorimetrische Vermessung der Proben.....	240
11.2.2.5.4	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford.....	241
11.2.2.5.5	Ermittlung der intrazellulären Konzentration von 1 <i>H</i> -Benzimidazolen	242
11.2.2.6	DNA-Bindungsstudie	242
11.2.2.6.1	Phosphatpuffer	242
11.2.2.6.2	DNA-Stammlösung.....	243
11.2.2.6.3	Substanz-Stammlösung	243
11.2.2.6.4	Messlösung.....	243
11.2.2.6.5	Referenzlösung	243
11.2.2.6.6	Durchführung der Messung	243
11.2.2.7	Adenosinrezeptor-Bindungsstudien	244
11.3	Aufnahme der UV- und Fluoreszenzspektren.....	246
11.3.1	Geräte.....	246
11.3.2	Aufnahme der UV-Spektren	246
11.3.3	Aufnahme der Fluoreszenzspektren	246
12	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	249
13	ANHANG	253
13.1	Zeit-Wirkungskurven der Zytotoxizitätstests	253
13.1.1	Zeit-Wirkungskurven der Zytotoxizität an der MCF-7 Zelllinie	253
13.1.2	Zytotoxizität an der MDA-MB 231 Zelllinie	257
13.1.3	Antagonistische Wirkung im Luciferase-Assay	261
14	LITERATURVERZEICHNIS.....	265