

## **Pharmakologische Untersuchungen**

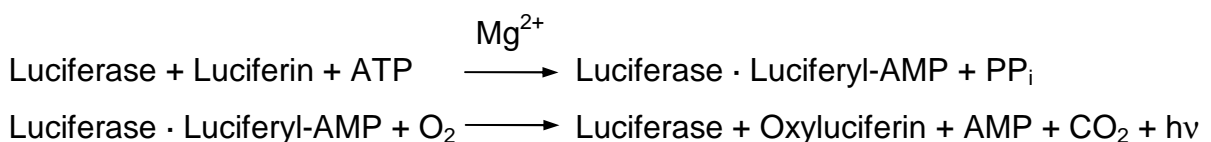


## 9 Pharmakologische Untersuchungen

### 9.1 Luciferase-Assay an MCF-7 2a Zellen und Zytotoxizitätstests

#### 9.1.1 Bestimmung der agonistischen und antagonistischen Wirkung an MCF-7 2a Zellen (Luciferase-Assay)

Der Luciferase-Assay ermöglicht die Bestimmung der estrogenen bzw. anti-estrogenen Wirkung der neu synthetisierten Verbindungen *in vitro*. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ER-positive humane MCF-7 Brustkrebszellen verwendet. Diese waren stabil mit dem Plasmid ERE<sub>wtc</sub>Luc transfiziert (MCF-7 2a Zellen) <sup>[234]</sup>. Dieses Plasmid wurde von Meyer kloniert <sup>[235]</sup> und setzt sich aus Enhancer- bzw. Promotorsequenzen sowie einem Reporter-gen luc zusammen. Das Reporter-gen, welches das Luciferaseenzym codiert, stammt aus dem Leuchtkäfer *Photinus Pyralis* <sup>[236]</sup>. Die Expression des Proteins erfolgt in Abhängigkeit von der estrogenen Potenz der Substanz und erreicht ab der 42. Stunde ein Maximum <sup>[237]</sup>. Substrate der Luciferase sind Luciferin, ATP und Sauerstoff. Folgende Reaktionen werden durch sie katalysiert <sup>[238]</sup>.



Der erste Schritt ist die Bildung von enzymgebundenem Luciferyladenylat, das im weiteren Verlauf eine oxidative Decarboxylierung erfährt, die in der Bildung von Oxyluciferin, AMP, CO<sub>2</sub> und Licht resultiert <sup>[238]</sup>. Die entstehende Lichtmenge ist somit proportional zur Menge der exprimierten Luciferase und kann mit einem Luminometer in einem Wellenlängenbereich von 390-520 nm über einen Zeitraum von 10 s quantifiziert werden. Die Lichtemission deckt einen Wellenlängenbereich von 490-630 nm ab <sup>[239]</sup> und setzt unmittelbar nach Zugabe des Substrates zum

Enzym ein. Bereits nach einer Minute sinkt die Emission auf 10% der Anfangsaktivität ab <sup>[238]</sup>. Die Angabe der Lichtausbeute erfolgt in RLU (relative light units) und wird durch im Luciferase-Assay enthaltenes Coenzym A um ein Vielfaches verstärkt <sup>[240]</sup>.

#### 9.1.1.1 Ermittlung der agonistischen Wirkung

Bei der Bestimmung der estrogenen Eigenschaften wird die Luciferase-Expression in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration gemessen. Hierzu erfolgt die Inkubation der MCF-7 2a Zellen mit den entsprechenden Verdünnungen der Substanz. Als Negativkontrolle werden zusätzlich Zellen mit reinem Lösungsmittel (0.1%), als Positivkontrolle mit  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-9}$  M) inkubiert. Nach 48 Stunden werden die RLU-Werte bestimmt und mit der Gesamtzellmasse, die mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt wird, korreliert. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit verschiedener Tests, wird das Ergebnis als relative Aktivierung [%] in Bezug auf die maximale Aktivierung durch  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-9}$  M) ausgedrückt. Die durch eine Estradiol-Lösung ( $10^{-9}$  M) resultierende Aktivierung wird gleich 100% gesetzt. Die durch Lösungsmittel (0.1%) hervorgerufene Aktivierung entspricht einer Aktivierung von 0%.

#### 9.1.1.2 Ermittlung der antagonistischen Wirkung

Die antagonistische Potenz einer Verbindung wird durch die hervorgerufene Hemmung der E2-bedingten Luciferase-Expression ausgedrückt. Die MCF-7 2a Zellen werden mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanz inkubiert. Zusätzlich wird jeweils eine konstante Konzentration Estradiol ( $10^{-9}$  M) zupipettiert. Die Aufarbeitung erfolgt analog der Bestimmung der agonistischen Wirkung. Es wird die verbleibende E2-induzierte Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des Antagonisten graphisch dargestellt.

### 9.1.2 In vitro Zytotoxizitätstest an der MCF-7 und der MDA-MB 231 Zelllinie

Die antiproliferativen Eigenschaften einer Verbindung können in *in vitro* Zytotoxizitätstests bestimmt werden. Hierzu bedient man sich eines kolorimetrischen Verfahrens, mit dessen Hilfe die Zellmasse nach Gillies <sup>[241]</sup> ermittelt wird. Die Zellmasse ist der Zellzahl proportional und wird durch einen Kristallviolett-Assay erhalten. Die Zellen werden in definierter Aussaatdichte in 96-Loch-Kulturplatten ausgesät. Nach einer Anwachszeit von 72 h für MCF-7 Zellen bzw. 48 h für MDA-MB 231 Zellen erfolgt die Substanzzugabe in verschiedenen Konzentrationen. Als Positivkontrolle wird Cisplatin, als Negativkontrolle reines Lösungsmittel verwendet. Zur Beurteilung der zeitabhängigen Zytotoxizität wird das Zellwachstum an fünf aufeinander folgenden Zeitpunkten abgestoppt. Dazu wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit Glutardialdehyd fixiert. Tote Zellen, die nicht mehr am Flaschenboden haften, werden dadurch entfernt. Im Anschluss werden die Zellen mit PBS überschichtet und können so bis zur Aufarbeitung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden ohne auszutrocknen (Kap. 11.2.2.3.3). Nachdem der gesamte Test abgestoppt ist, erfolgt das Anfärben der Zellen mit Kristallviolett (Kap. 11.2.2.3.4). Der Überschuss an Farbstoff, der hauptsächlich DNA-assoziierte Nukleoproteine anfärbt, wird mit Wasser abgewaschen und die in den Zellen verbleibende Menge mit 70%-igem Ethanol extrahiert. Die Messung der Extinktion der ethanolschen Lösungen erfolgt bei 590 nm. Die erhaltenen Messwerte korrelieren gut mit der Zellzahl <sup>[242]</sup>. Die relative prozentuale Wachstumshemmung ( $T/C_{\text{korrr}}$ ) kann nach der folgenden Gleichung (4) errechnet werden:

$$T/C_{\text{korrr}} = (T^* - C_0) / (C^* - C_0) \times 100 [\%] \quad (4)$$

$T^*$  : Mittelwert der Extinktion der Substanzverdünnungen

$C^*$ : Mittelwert der Extinktion des Lösungsmittels (Blindwert)

$C_0$ : Mittelwert der Extinktion zum Zeitpunkt der Substanzzugabe ( $t_0$ )

Die Schwankungen der Ergebnisse werden als prozentuale Standardabweichung angegeben.

Die antiproliferativen Eigenschaften werden wie folgt interpretiert:

$T/C_{\text{korr}} > 80\%$	keine antiproliferative Wirkung
$T/C_{\text{korr}} < 80\%$	antiproliferative Wirkung
$T/C_{\text{korr}} 20-0\%$	zytostatische Wirkung
$T/C_{\text{korr}} < 0\%$	zytotoxische Wirkung

Als zytotoxische Wirkung wird jede negative Beeinflussung des Zellwachstums verstanden.

#### 9.1.2.1 Die MCF-7 Zelllinie

Die MCF-7 Zelllinie wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer Patientin isoliert, deren metastasierendes, duktales Mammaadenokarzinom zuvor drei Jahre mit Hormon- und Radiotherapie behandelt worden war <sup>[243]</sup>. MCF-7 Zellen besitzen neben dem Estrogenrezeptor auch Rezeptoren für Androgene, Progesteron und Glukokortikoide <sup>[244]</sup>. Aufgrund ihres hohen Hormonrezeptorgehalts von 70-90 fmol/mg Protein werden sie auch als hormonabhängig (ER+) bezeichnet <sup>[244, 245]</sup>.

#### 9.1.2.2 Die MDA-MB 231 Zelllinie

Die MDA-MB 231 Zelllinie wurde 1974 etabliert und wird aufgrund des Fehlens von Estrogen- und Progesteronrezeptoren als hormonunabhängig (ER-) bezeichnet <sup>[246]</sup>. Sie wurde ebenfalls aus einem malignen Pleuraerguss einer Patientin mit metastasierendem, duktalem Mammakarzinom gewonnen, das zuvor drei Wochen mit Chemotherapeutika behandelt wurde.

### 9.1.3 Ergebnisse der agonistischen und antagonistischen Wirkung an MCF-7 2a Zellen und der Zytotoxizitätstests

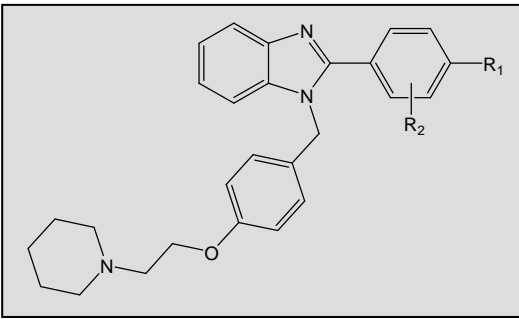
Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden auf ihre agonistische und antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen (Luciferase-Assay) untersucht. Zur Bestimmung der Antiestrogenität wurde die Hemmung der E2-induzierten Luciferase-Expression in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M gemessen. Die agonistische Wirkung wurde für einige Verbindungen exemplarisch in Konzentrationen von  $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M untersucht. Da bei diesen Verbindungen über den gesamten Konzentrationsbereich keine agonistische Wirkung auftrat und diese aufgrund der Molekülstruktur auch nicht zu erwarten war, wurde die Estrogenität der übrigen Verbindungen nur in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M getestet. Erste Hinweise auf eventuell vorhandene Zytotoxizität gaben Anlass zusätzlich die antiproliferativen Eigenschaften zu ermitteln. Um festzustellen, ob die Inhibierung des Zellwachstums in Zusammenhang mit dem ER steht, wurden Zytotoxizitätstests zeitabhängig in Konzentrationen von  $1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  und  $1 \times 10^{-5}$  M sowohl an der hormonabhängigen MCF-7 Zelllinie als auch an der hormonunabhängigen MDA-MB 231 Zelllinie durchgeführt. Zur besseren Übersichtlichkeit sind im Folgenden die Zeit-Wirkungs-Kurven der getesteten Verbindungen in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M zusammengestellt.

#### 9.1.3.1 2-(4-Methoxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1H-benzimidazole

Die Gruppe der 2-(4-Methoxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1H-benzimidazole zeichnet sich durch das Fehlen einer Methoxy- bzw. Hydroxygruppe am Benzimidazolgrundgerüst aus (Abb. 64). Dadurch geht eine zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigte Gruppe verloren. Des Weiteren weisen sie alle typischen Strukturelemente der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen auf. Da mit den substituierten Benzimidazolen, die weder am Phenylring noch am Benzimidazolgerüst eine Hydroxygruppe tragen keine agonistische bzw. antagonistische Wirkung zu erwarten war, wurden nur einige der Verbindungen in einer Konzentration von  $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M exemplarisch getestet (Abb. 65a, b).

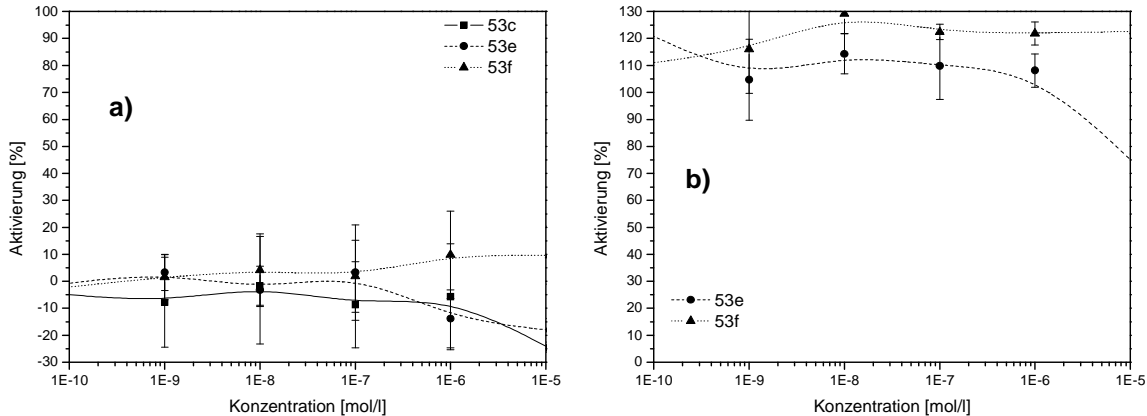
Anhand der am Benzimidazolgerüst und Phenolring unsubstituierten Verbindung **53a** soll die Bedeutung der Methoxy- bzw. Hydroxygruppe für die Wirkung geklärt werden. Aus diesem Grund wird sie in dieser Gruppe mit aufgeführt.

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>53a</b>	H	H
<b>53b</b>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>53c</b>	OCH <sub>3</sub>	2-OCH <sub>3</sub>
<b>53d</b>	OCH <sub>3</sub>	3-OCH <sub>3</sub>
<b>53e</b>	OCH <sub>3</sub>	2-Cl
<b>53f</b>	OCH <sub>3</sub>	2-F



**Abb.64:** 2-(4-Methoxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole und **53a**.

### 9.1.3.1.1 Agonistische und antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen



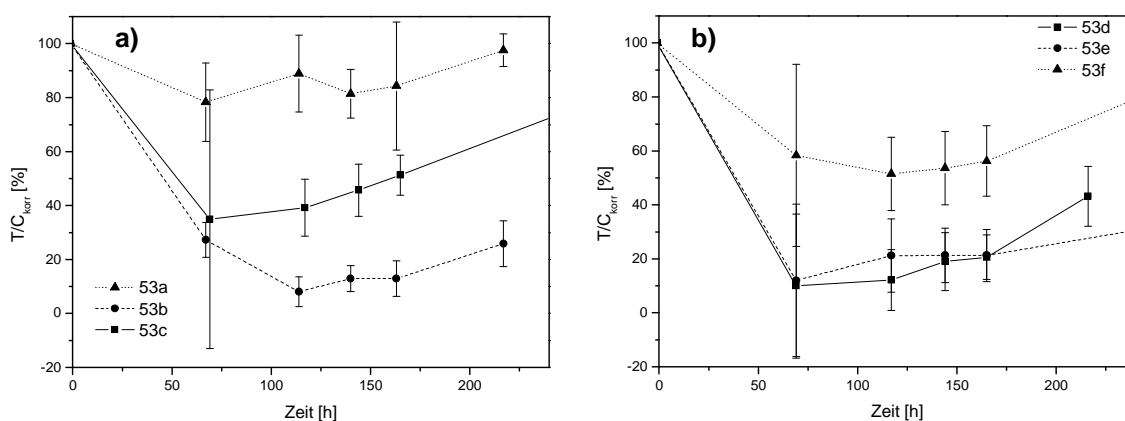
**Abb. 65:** **a)** Agonistische Wirkung der Verbindungen **53c**, **53e** und **53f** ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M), n=3.  
**b)** Antagonistische Wirkung der Verbindungen **53e** und **53f** ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M), n=3.

Keine der getesteten Verbindungen wies eine agonistische Wirkung an der MCF-7 2a Zelllinie auf. Ein starker Abfall der Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei den Benzimidazolen **53c** und **53e** ab einer Konzentration von  $1 \times 10^{-6}$  M bzw.  $1 \times 10^{-7}$  M war zu beobachten (Abb. 65a). Verbindung **53e** zeigte in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M ebenfalls einen Abfall der E2-induzierten Aktivierung auf 70% (Abb. 65b).



Aufgrund der negativen Werte der Aktivierung bei der Testung der estrogenen Eigenschaften lässt sich schließen, dass dieser Effekt nur auf zytotoxischen und nicht auf antiestrogenen Eigenschaften beruht. Dafür spricht auch, dass bei Verbindung **53f**, die bei der Testung auf Estrogenität keinen Abfall der Konzentrations-Wirkungs-Kurve aufweist, auch keine Abnahme der E2-induzierten Aktivierung zu verzeichnen war. Auch im Kristallviolett-Assay konnte für die Verbindungen **53c** und **53e** eine Verringerung der Zellzahl beobachtet werden.

#### 9.1.3.1.2 Antiproliferative Wirkung an der MCF-7 Zelllinie



**Abb. 66:** Antiproliferative Wirkung der Verbindungen in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M,  $n=16$ .

**a) 53a, 53b und 53c.**

**b) 53d, 53e und 53f.**

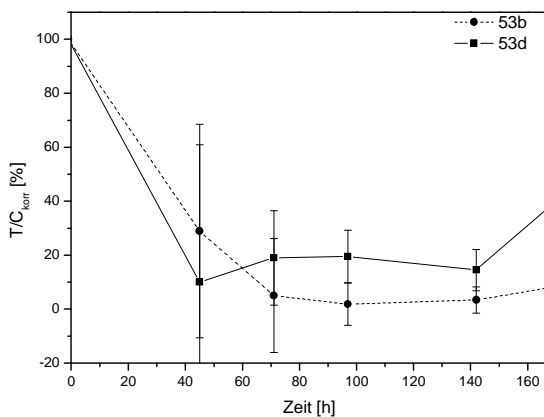
Weitere Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

Verbindung **53a**, die weder am Phenylring noch am Benzimidazolgerüst eine Methoxygruppe trägt, zeigte keine Wirkung an der MCF-7 Zelllinie. Die Einführung einer Methoxygruppe in 4'-Position des Phenylrings war ausreichend, um eine zytostatische Wirkung (**53b**:  $T/C_{\text{korr}} (114 \text{ h}) = 8.1\%$ ) zu erreichen (Abb. 66a). Eine zusätzliche Substitution des Phenylrings in 2-Position führte zur Reduktion der Wirkung (**53c** [2-OCH<sub>3</sub>]:  $T/C_{\text{korr}} (69 \text{ h}) = 34.9\%$ , **53f** [2-F]:  $T/C_{\text{korr}} (117 \text{ h}) = 51.5\%$ ). Eine Ausnahme stellte die 2-Substitution durch ein Chloratom (Abb. 66b) dar (**53e** [2-Cl]:  $T/C_{\text{korr}} (69 \text{ h}) = 12.1\%$ ), die keine Verringerung der Wachstumshemmung im Vergleich zum Benzimidazol **53b** zur Folge hatte. Zusätzliche Substitution in

m-Stellung wurde toleriert und führte nicht zur Abnahme der Wirkung (**53b**:  $T/C_{\text{korr}} (114 \text{ h}) = 8.1\%$ , **53d** [m-OCH<sub>3</sub>]:  $T/C_{\text{korr}} (69 \text{ h}) = 9.9\%$ ). Die nur geringe anti-proliferative Wirkung der Verbindung **53f** korreliert gut mit den Beobachtungen im Luciferase-Assay, bei dem keine Abnahme der Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu verzeichnen war. Somit ist die Zytotoxizität und nicht die Antiestrogenität in der Gruppe der 2-(4-Methoxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole als Ursache für die Abnahme der E2-induzierten Aktivierung zu sehen.

### 9.1.3.1.3 Antiproliferative Wirkung an der MDA-MB 231 Zelllinie

Die neu synthetisierten Verbindungen wurden zusätzlich an der hormonunabhängigen MDA-MB 231 Zelllinie untersucht (Abb. 67).

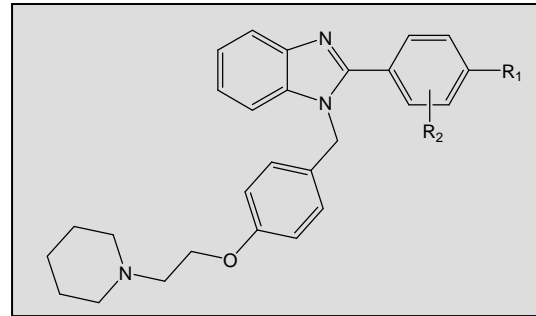


**Abb. 67:** Antiproliferative Wirkung der Verbindungen **53b** und **53d** in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M. Weitere Ergebnisse sind im Anhang dargestellt, n=16.

Lediglich die Verbindungen **53b** und **53d** zeigten in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M einen zytostatischen Einfluss (**53b**:  $T/C_{\text{korr}} (97 \text{ h}) = 1.9\%$ , **53d** [m-OCH<sub>3</sub>]:  $T/C_{\text{korr}} (45 \text{ h}) = 10.0\%$ ) auf das Zellwachstum (Abb. 67). Das Ausmaß der Zytotoxizität an der hormonabhängigen MCF-7 Zelllinie und der hormonunabhängigen MDA-MB 231 Zelllinie war annähernd gleich.

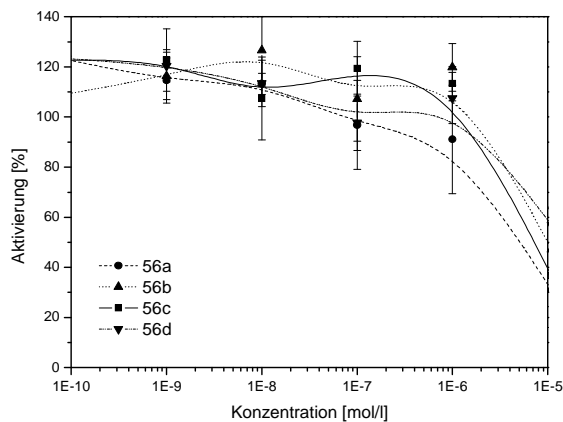
### 9.1.3.2 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
56a	OH	H
56b	OH	2-OH
56c	OH	2-Cl
56d	OH	2-F



**Abb. 68:** 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole.

#### 9.1.3.2.1 Agonistische und antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen



**Abb. 69:** Antagonistische Wirkung der Verbindungen **56a-d** ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M), n=3.

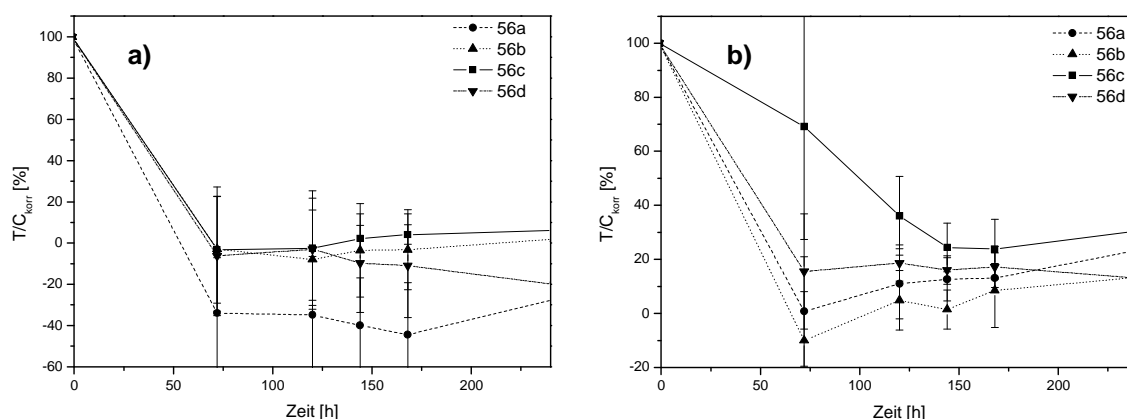
Alle Verbindungen zeigten keinen wesentlichen Unterschied im Verlauf ihrer Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Die Aktivierung fiel bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M auf Werte zwischen 30-60% ab (Abb. 69). Die hydroxylierten Derivate waren deutlich wirksamer als ihre entsprechenden O-methylierten Analoga.

Verb.	Aktivierung [%] bei $10^{-5}$ M
<b>56a</b>	-29.1
<b>56b</b>	-23.5
<b>56c</b>	-36.3
<b>56d</b>	-12.7

**Tab. 20:** Agonistische Wirkung der Verbindungen **56a-d** ( $1 \times 10^{-5}$  M), n=3.

Für keine der getesteten Verbindungen konnte eine agonistische Wirkung festgestellt werden (Tab. 20). Die negativen Werte der Aktivierung lassen sich wiederum durch eine mögliche Zytotoxizität erklären.

#### 9.1.3.2.2 Antiproliferative Wirkung an der MCF-7 Zelllinie



**Abb. 70:** Antiproliferative Wirkung der Verbindungen **56a-d**, n=16.

**a)**  $1 \times 10^{-5}$  M.

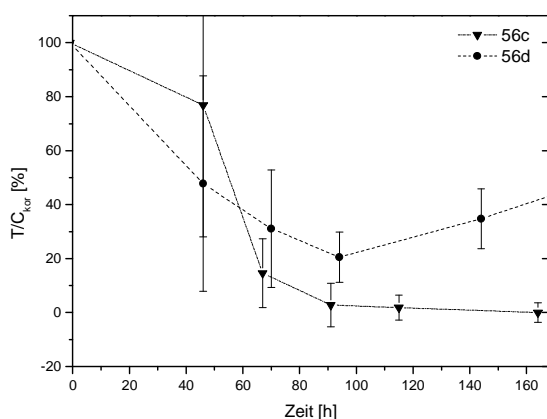
**b)**  $5 \times 10^{-6}$  M.

Weitere Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

Die antiproliferativen Eigenschaften der hydroxylierten Benzimidazole waren gegenüber ihren O-methylierten Analoga deutlich erhöht (**53b** [ $4'$ -OCH<sub>3</sub>]:  $T/C_{\text{korr}}(114 \text{ h}) = 8.1\%$ , **56a** [ $4'$ -OH]:  $T/C_{\text{korr}}(168 \text{ h}) = -44.6\%$ ) (Abb. 70a). Aufgrund der Überlagerung der Zeit-Wirkungs-Kurven der Verbindungen **56b-d** bei einer

Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M, sind zur besseren Darstellung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen zusätzlich die Kurvenverläufe in einer Konzentration von  $5 \times 10^{-6}$  M aufgeführt. Dabei wird deutlich, dass die Einführung von Halogenatomen in 2-Position des Phenylrings zu einer Abschwächung der Wirkung führte (**56a** [4'-OH]:  $T/C_{\text{korr}} (72 \text{ h}) = 0.7\%$ , **56c** [2-Cl]:  $T/C_{\text{korr}} (168 \text{ h}) = 23.8\%$ , **56d** [2-F]:  $T/C_{\text{korr}} (240 \text{ h}) = 12.9\%$ ), wobei der Effekt des Chloratoms stärker ausgeprägt war (Abb. 70b). Eine zusätzliche Hydroxygruppe in dieser Position hatte bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-6}$  M eine leichte Steigerung der Zytotoxizität zur Folge (**56b** [2-OH]:  $T/C_{\text{korr}} (72 \text{ h}) = -10.0\%$ ). Aufgrund der starken Zytotoxizität der Verbindungen in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M ist diese wiederum als Ursache für den starken Abfall der E2-induzierten Aktivierung (Luciferase-Assay) bei dieser Konzentration zu sehen. Eine antagonistische Wirkung am ER spielt daher eher keine Rolle.

### 9.1.3.2.3 Antiproliferative Wirkung an der MDA-MB 231 Zelllinie



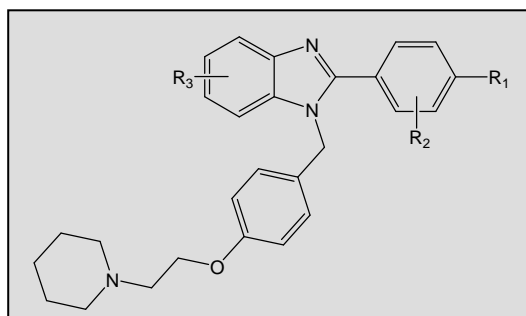
**Abb. 71:** Antiproliferative Wirkung der Verbindungen **56c-d** ( $10^{-5}$  M),  $n=16$ .

Weitere Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

An der MDA-MB 231 Zelllinie konnte nur für die halogenierten Benzimidazole ein zytostatischer/zytotoxischer Einfluss auf das Zellwachstum festgestellt werden, der bei der chlorierten Verbindung (**56c**:  $T/C_{\text{korr}} (164 \text{ h}) = 0\%$ ) stärker ausgeprägt war als bei der fluorierten Verbindung (**56d**:  $T/C_{\text{korr}} (94 \text{ h}) = 20.5\%$ ). Nach dem Erreichen eines Minimums bei 94 h war für das fluorierte Benzimidazol **56d** ein erneuter Anstieg der Zellzahl zu verzeichnen (Abb. 71).

### 9.1.3.3 5-(6)-Methoxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1H-benzimidazole

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>54a</b> <sup>1)</sup>	H	H	5-/6-OCH <sub>3</sub>
<b>54b I</b>	OCH <sub>3</sub>	H	5-OCH <sub>3</sub>
<b>54b II</b>	OCH <sub>3</sub>	H	6-OCH <sub>3</sub>
<b>54c</b> <sup>1)</sup>	OCH <sub>3</sub>	2-OCH <sub>3</sub>	5-/6-OCH <sub>3</sub>
<b>54d I</b>	OCH <sub>3</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	5-OCH <sub>3</sub>
<b>54d II</b>	OCH <sub>3</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	6-OCH <sub>3</sub>
<b>54e</b> <sup>1)</sup>	OCH <sub>3</sub>	2-Cl	5-/6-OCH <sub>3</sub>
<b>54f</b> <sup>1)</sup>	OBz	H	5-/6-OCH <sub>3</sub>

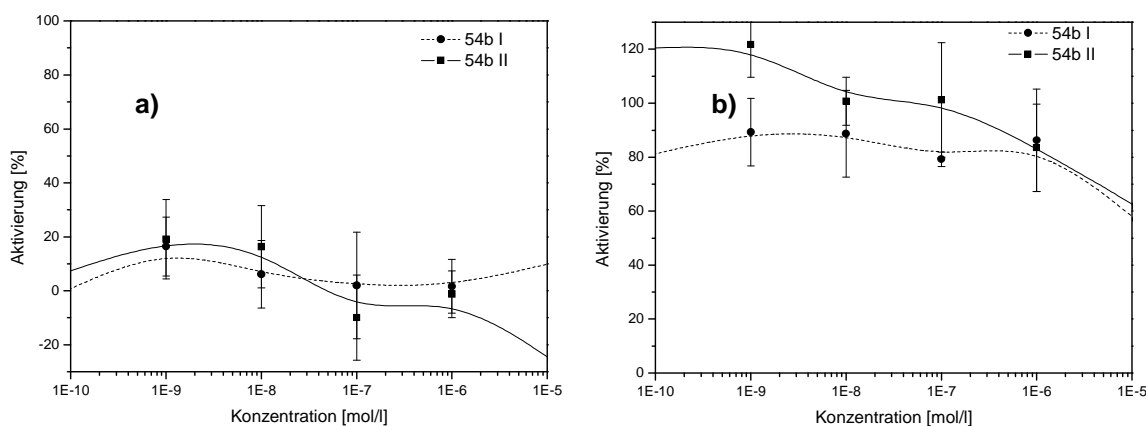


**Abb. 72:** 5-(6)-Methoxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1H-benzimidazole.

<sup>1)</sup> Isomerengemisch (5-OCH<sub>3</sub> oder 6-OCH<sub>3</sub>).

#### 9.1.3.3.1 Agonistische und antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen

Die agonistische und antagonistische Wirkung des 5- bzw. 6-Methoxy-Isomeren der Verbindung **54b** wurde exemplarisch für diese Gruppe der Benzimidazole in einem Konzentrationsbereich von 10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> M getestet (Abb. 73a, b).

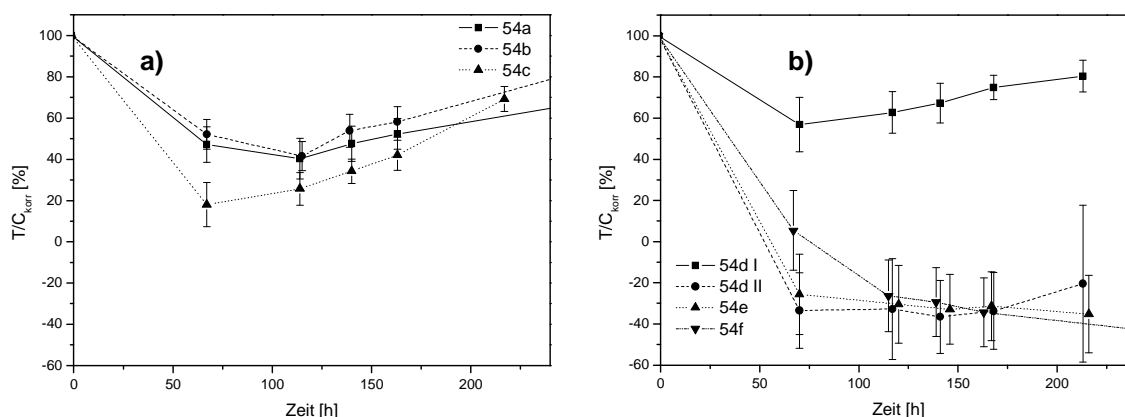


**Abb. 73: a)** Agonistische Wirkung der Verbindungen **54b I+II** (10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> M), n=3.

**b)** Antagonistische Wirkung der Verbindungen **54b I+II** (10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> M), n=3.

Keines der beiden Isomeren wies eine agonistische Wirkung auf. Bei der Testung auf antagonistische Wirkung war kein wesentlicher Wirkungsunterschied bei den Isomeren der Verbindung **54b** zu verzeichnen war. Die Abnahme der Aktivierung bei der Bestimmung der Antiestrogenität korreliert wiederum gut mit den anti-proliferativen Eigenschaften, die im Folgenden beschrieben sind und nur in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M deutlich ausgeprägt waren. Bei den übrigen Verbindungen dieser Gruppe wurde auf die Isomerentrennung größtenteils verzichtet, da diese nur schwer zu verwirklichen war.

### 9.1.3.3.2 Antiproliferative Wirkung an der MCF-7 Zelllinie



**Abb. 74:** Antiproliferative Wirkung der Verbindungen in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M,  $n=16$ .

**a) 54a, 54b und 54c.**

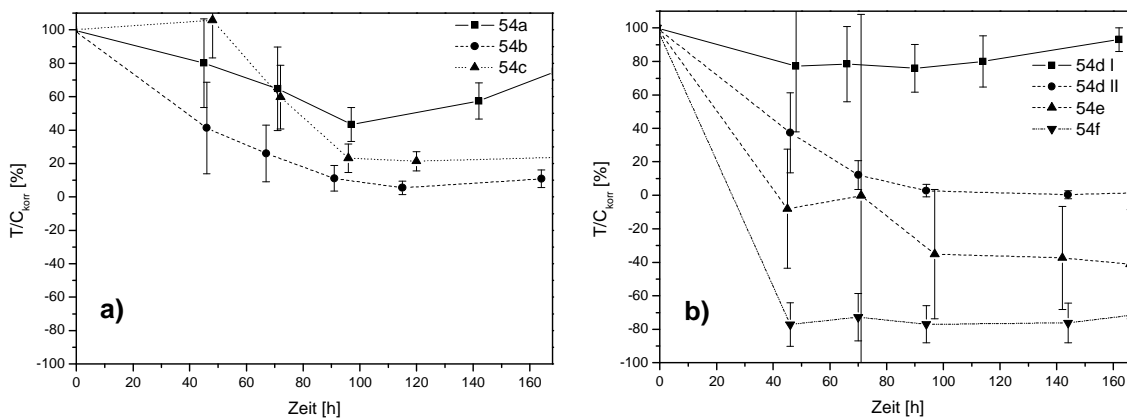
**b) 54d I+II, 54e und 54f.**

Weitere Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

Alle Verbindungen zeigten an der MCF-7 Zelllinie in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M einen antiproliferativen (**54a, 54b, 54c** und **54d I**) bzw. zytoziden Einfluss (**54d II, 54e** und **54f**) (Abb. 74a, b). Auch in einer Konzentration von  $5 \times 10^{-6}$  M verlaufen die Kurven der Verbindungen **54d II, 54e** und **54f** nahezu identisch, so dass keine Aussage über den Zusammenhang von Struktur und Wirkung getroffen werden kann (nicht dargestellt). Verbindung **54a**, die lediglich eine Methoxygruppe in 5- bzw. 6-Position des Benzimidazolrings trägt, zeigte eine antiproliferative Wirkung (**54a**:  $T/C_{\text{korr}} (114 \text{ h}) = 40.3\%$ ). Eine zusätzliche Methoxygruppe in 4-Position des

Phenylrings bewirkte keine wesentliche Veränderung der Aktivität (**54b**:  $T/C_{\text{korr}} (115 \text{ h}) = 41.6\%$ ), während die Einführung einer Methoxygruppe in 2- und 4-Position eine leicht gesteigerte Zytotoxizität zur Folge hatte (**54c**:  $T/C_{\text{korr}} (67 \text{ h}) = 18.0\%$ ). Bemerkenswert ist der deutlich unterschiedliche Effekt der Isomeren der Verbindung **54d**. Das 5-Methoxy-Isomer **54d I** zeigte lediglich einen schwachen Einfluss auf das Zellwachstum (**54d I**:  $T/C_{\text{korr}} (70 \text{ h}) = 56.9\%$ ), während die zytotoxische Wirkung des 6-Methoxy-Isomers (**54d II**:  $T/C_{\text{korr}} (141 \text{ h}) = -36.6\%$ ) deutlich ausgeprägt war.

### 9.1.3.3 Antiproliferative Wirkung an der MDA-MB 231 Zelllinie



**Abb. 75:** Antiproliferative Wirkung der Verbindungen in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $n=16$ .

**a) 54a, 54b und 54c.**

**b) 54d I, 54d II, 54e und 54f.**

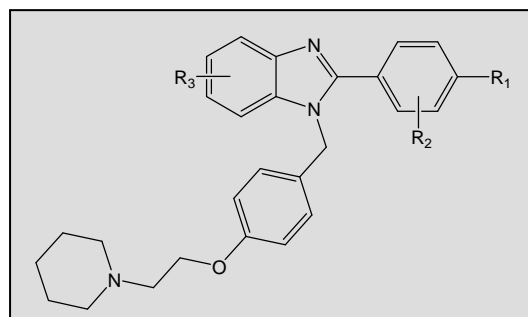
Weitere Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

An der MDA-MB 231 Zelllinie waren ähnliche Tendenzen zu beobachten wie an der MCF-7 Zelllinie (Abb. 75a, b). Beide Isomeren der Verbindung **54d** zeigten auch an der MDA-MB 231 Zelllinie einen unterschiedlichen Einfluss, wobei die stärkere Wirkung wiederum vom 6-Methoxy-Isomer ausging (**54d I**:  $T/C_{\text{korr}} (90 \text{ h}) = 75.8\%$ , **54d II**:  $T/C_{\text{korr}} (144 \text{ h}) = 0.4\%$ ). Die zytotoxischen Eigenschaften der Benzimidazole **54e** ( $T/C_{\text{korr}} (166 \text{ h}) = -41.1\%$ ) und **54f** ( $T/C_{\text{korr}} (46 \text{ h}) = -77.1\%$ ) waren wiederum am stärksten ausgeprägt.



### 9.1.3.4 5-(6)-Hydroxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>57a I</b>	H	H	5-OH
<b>57a II</b>	H	H	6-OH
<b>57b I</b>	OH	H	5-OH
<b>57b II</b>	OH	H	6-OH
<b>57c</b> <sup>1)</sup>	OH	2-OH	5-(6)-OH
<b>57d I</b>	OH	2-Cl	5-OH
<b>57d II</b>	OH	2-Cl	6-OH
<b>57e I</b>	OH	2-F	5-OH
<b>57e II</b>	OH	2-F	6-OH



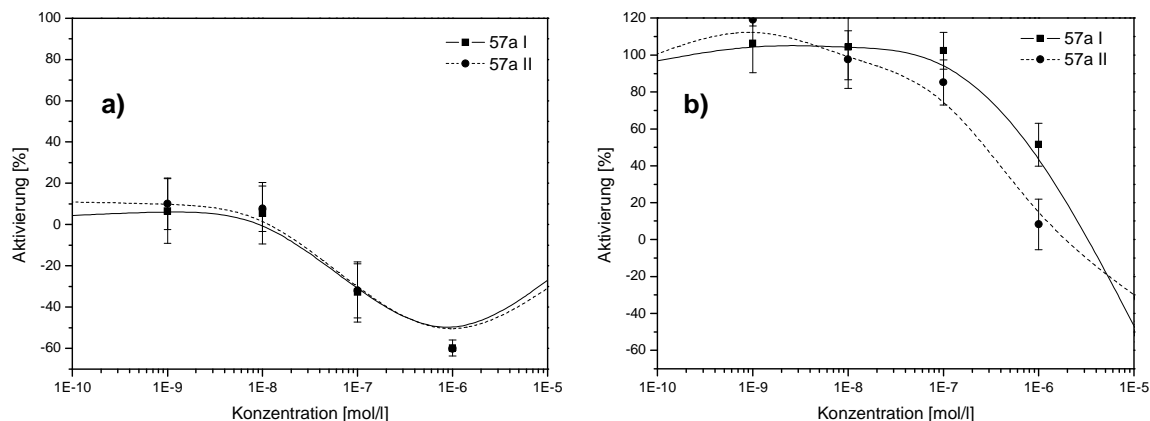
**Abb. 76:** 5-(6)-Hydroxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole.

<sup>1)</sup> Isomergemisch (5-OH oder 6-OH).

#### 9.1.3.4.1 Agonistische und antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen

Da keine agonistische Wirkung zu erwarten war, wurden nur für die beiden Isomeren der Verbindung **57a** exemplarisch Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Estrogenität in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M aufgenommen (Abb. 77a).

Für die anderen Verbindungen erfolgte die Bestimmung der agonistischen Aktivität in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M (Tab. 21). Die negativen Werte lassen sich durch die beobachtete Zytotoxizität erklären.



**Abb. 77: a)** Agonistische Wirkung der Verbindungen **57a I+II** ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M), n=3.

**b)** Antagonistische Wirkung der Verbindungen **57a I+II** ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M), n=3.

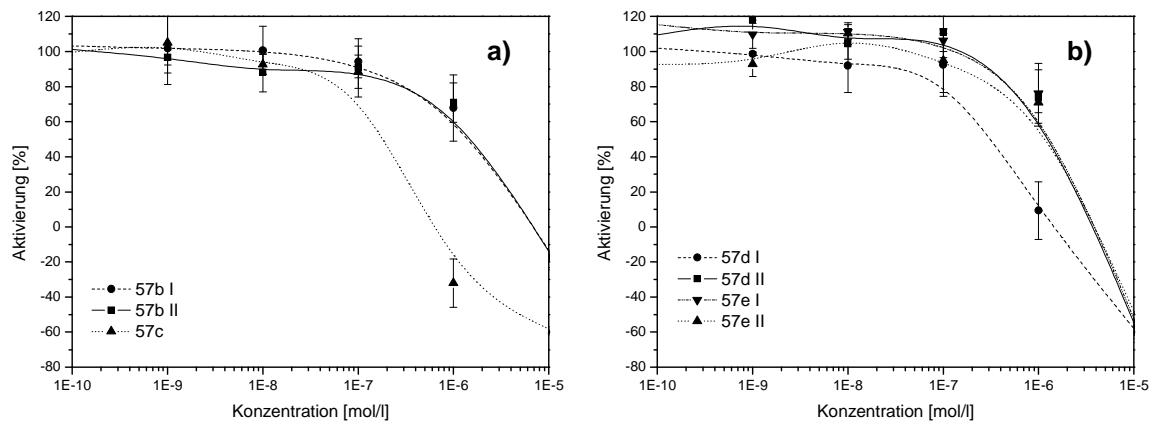
Verbindung	Aktivierung bei $10^{-5}$ M [%]	Verbindung	Aktivierung bei $10^{-5}$ M [%]
<b>57a I</b>	-25.6	<b>57d I</b>	-50.1
<b>57a II</b>	-29.7	<b>57d II</b>	-50.4
<b>57b I</b>	-43.8	<b>57e I</b>	-49.4
<b>57b II</b>	-35.4	<b>57e II</b>	-51.8
<b>57c</b>	-51.7		

**Tab. 21:** Agonistische Wirkung der Verbindungen **57a I+II**, **57b I+II**, **57c**, **57d I+II** und **57e I+II** ( $10^{-5}$  M), n=3.

Verb.	Aktivierung bei $10^{-6}$ M [%]	IC <sub>50</sub> [nM]	Verb.	Aktivierung bei $10^{-6}$ M [%]	IC <sub>50</sub> [nM]
<b>57a I</b>	41.6	849	<b>57d I</b>	10.3	313
<b>57a II</b>	13.9	284	<b>57d II</b>	57.8	1220
<b>57b I</b>	57.9	1350	<b>57e I</b>	59.6	1310
<b>57b II</b>	59.0	1440	<b>57e II</b>	54.2	1130
<b>57c</b>	-17.3	179			

**Tab. 22:** Antagonistische Wirkung der Verbindungen **57a I+II**, **57b I+II**, **57c**, **57d I+II** und **57e I+II**, n=3.

Keine der getesteten Verbindungen zeigte eine agonistische Wirkung (Tab. 21) an der MCF-7 2a Zelllinie, während alle Verbindungen eine Hemmung der E2-induzierten Luciferase-Expression aufwiesen (Tab. 22, Abb. 77b, Abb. 78a, b). Die Reduktion der E2-bedingten Luciferase-Expression war gegenüber den O-methylierten Analoga deutlich erhöht. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den jeweiligen 5- und 6-Hydroxy-Isomeren war nicht zu verzeichnen.

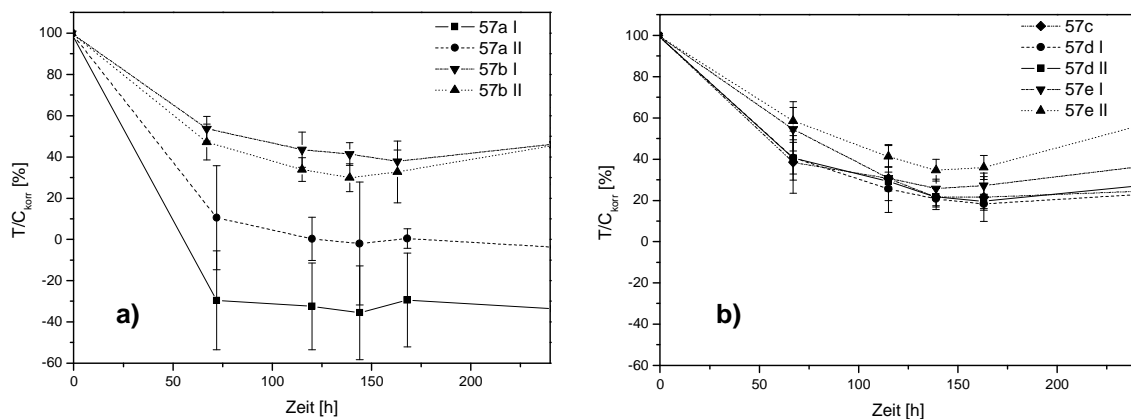


**Abb. 78:** Antagonistische Wirkung der Verbindungen in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M.

**a)** 57b I+II und 57c, (n=3).

**b)** 57d I+II und 57e I+II, (n=3).

#### 9.1.3.4.2 Antiproliferative Wirkung an der MCF-7 Zelllinie



**Abb. 79:** Antiproliferative Wirkung der Verbindungen in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M, n=16.

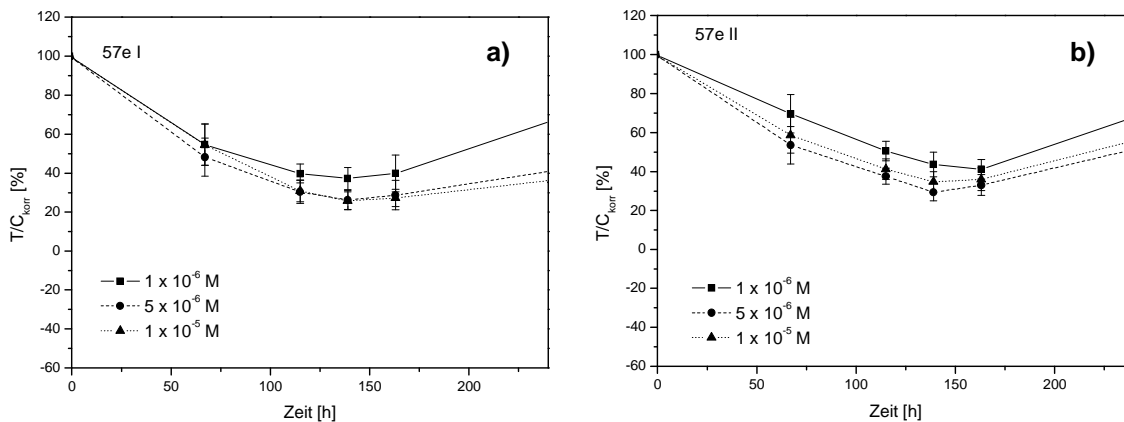
**a)** 57a I+II, 57b I+II.

**b)** 57c, 57d I+II und 57e I+II.

Weitere Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

Innerhalb der Isomerenpaare der Verbindungen **57b**, **57d** und **57e** war kein Wirkungsunterschied zwischen den 5- und 6-Hydroxy-Isomeren zu verzeichnen. Das Substitutionsmuster des Phenylrings hatte keinen Einfluss auf die Wirkungsstärke. Ihre Zeit-Wirkungs-Kurven zeigten einen nahezu identischen Verlauf. Ein deutlicher Wirkungsunterschied war lediglich bei den Stellungsisomeren der Verbindung **57a** ersichtlich. Das 5-Hydroxy-Isomer **57a I** wirkte deutlich zytozid ( $T/C_{\text{korr}}(144 \text{ h}) = -35.5\%$ ), während der zytozide Einfluss des 6-Hydroxy-Isomers **57a II** ( $T/C_{\text{korr}}(240 \text{ h}) = -3.8\%$ ) schwächer ausgeprägt war. Die Einführung von Substituenten am Phenylring führte immer zu einem Wirkungsverlust. Alle weiteren getesteten Verbindungen waren in einer Konzentration von  $10^{-5} \text{ M}$  antiproliferativ (Abb. 79a, b).

Bei genauerer Betrachtung der Zeit-Wirkungs-Kurven in allen drei getesteten Konzentrationen fällt jedoch auf, dass sich die Wirkung in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  und  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  nur unwesentlich unterscheidet. Exemplarisch ist an dieser Stelle das Isomerenpaar der Verbindung **57e** aufgeführt (Abb. 80).



**Abb. 80:** Antiproliferative Wirkung in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  und  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

**a) 57e I**,  $n=16$ .

**b) 57e II**,  $n=16$ .

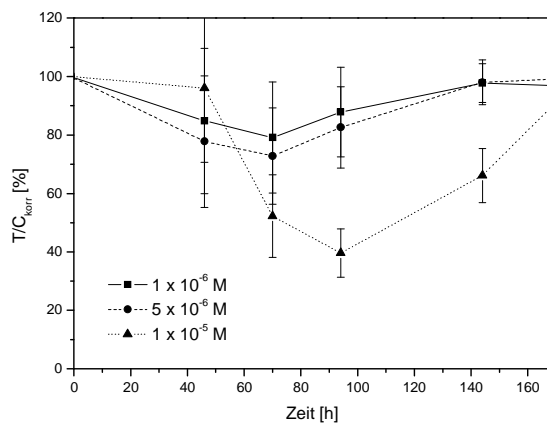
Weitere Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

Die Gruppe der 5-(6)-Hydroxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole weist im Vergleich zu den 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazolen eine gesteigerte Hemmung der E2-induzierten

Luciferase-Expression auf, während ihre Zytotoxizität an MCF-7 Zellen geringer ist (Ausnahme: **57a**). Daher wird deutlich, dass bei Verbindungen mit einer Hydroxygruppe in 5- oder 6-Position des Benzimidazolgerüsts neben Zytotoxizität auch ein antiestrogener Effekt auftritt.

#### 9.1.3.4.3 Antiproliferative Wirkung an der MDA-MB 231 Zelllinie

Lediglich für Verbindung **57c** konnte in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M ein antiproliferativer Effekt gemessen werden ( $T/C_{\text{korr}}(94 \text{ h}) = 39.6\%$ ). Nach dem Erreichen eines Minimums nach 94 h war aber auch hier ein deutlicher Anstieg der Zellzahl zu verzeichnen (Abb. 81).

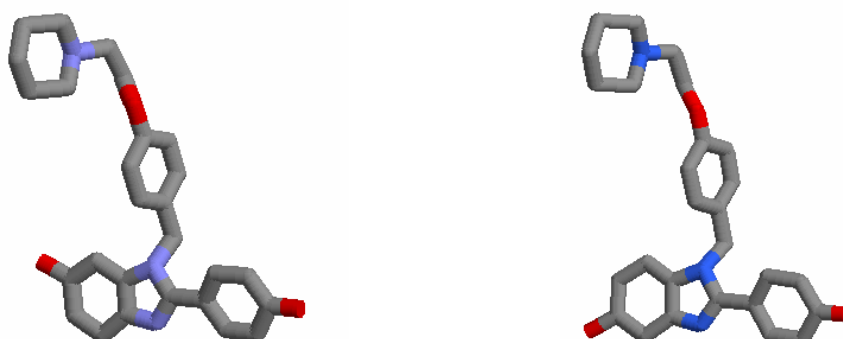


**Abb. 81:** Antiproliferative Wirkung des Benzimidazols **57c** in den Konzentrationen  $1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  und  $1 \times 10^{-5}$  M,  $n = 16$ .

## 9.1.4 Diskussion der Testergebnisse

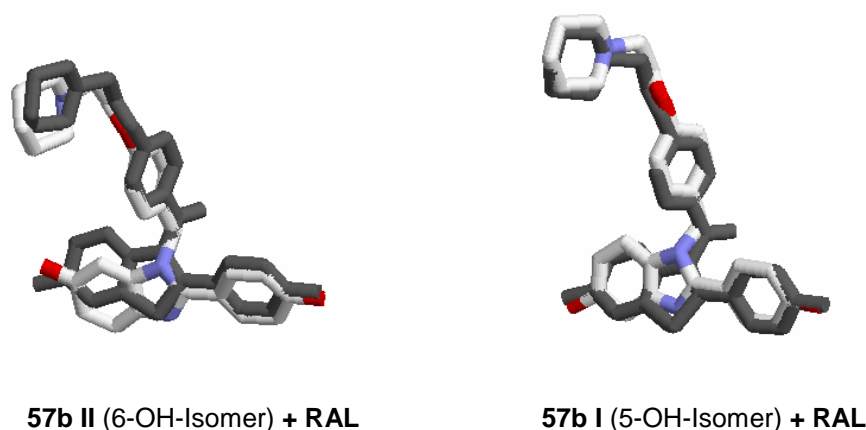
### 9.1.4.1 Vorbetrachtungen - Molecular Modeling-Untersuchungen

Die Ermittlung der Raumstruktur der neuen Wirkstoffe mittels Molecular Modeling ermöglicht unter anderem die Bestimmung der Abstände zwischen funktionellen Gruppen. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Entfernung der 5-OH- bzw. 6-OH-Gruppe zur phenolischen Hydroxygruppe an C(4). Die räumliche, energie-minimierte Struktur der Isomeren der Verbindung **57b** ist in Abbildung 82 dargestellt. Anhand des O-O-Abstands können Aussagen über die mögliche Interaktion der Verbindungen mit dem Estrogenrezeptor getroffen werden. Der Abstand der Hydroxygruppen ist je nach Isomer verschieden. Er beträgt im 6-Hydroxy-Isomer 11.48 Å, während die Sauerstoffatome der analogen 5-Hydroxy-Verbindung nur 11.38 Å voneinander entfernt sind.



**Abb. 82:** Konformation der Verbindungen **57b I** (rechts) und **57b II** (links) im Energieminimum.

Verglichen mit dem O-O-Abstand im Estradiol (10.9 Å) und Raloxifen (10.79 Å) ist eine ähnliche Orientierung der Hydroxygruppen mit Wechselwirkungen zu His 524, Glu 353 und Arg 394 des ER $\alpha$  vorstellbar. Bei der betrachteten Überlagerung der aus der Röntgenkristallstrukturanalyse entnommenen Raloxifen-Konformation mit den energieminierten Strukturen der Isomeren der Verbindung **57b** wird deutlich, dass das 5-Hydroxy-Isomer **57b I** besser mit Raloxifen zur Deckung gebracht werden kann als das analoge 6-Hydroxy-Isomer **57b II** (Abb. 83).



**Abb. 83:** Überlagerung von RAL mit **57b II** (links) und **57b I** (rechts). Bei der Energieminimierung von **57b I** und **57b II** wird eine dem RAL analoge Konformation der Seitenkette angenommen.

Bringt man die Hydroxygruppen und das Stickstoffatom des Piperidinrings der Verbindungen **57b II** und **RAL** zur Deckung, sind das Benzimidazol- und Thiophengerüst gegeneinander verdreht, während beide bei der Überlagerung von **57b I** mit **RAL** annähernd in einer Ebene liegen. Eine unterschiedliche Affinität der beiden Isomeren zum Estrogenrezeptor, verbunden mit unterschiedlicher antagonistischer Wirkung, ist demnach durchaus vorstellbar.

#### 9.1.4.2 Agonistische und Antagonistische Wirkung an MCF-7 2a Zellen

Alle Benzimidazolderivate, die mindestens über eine Hydroxygruppe verfügen, zeigten im Luciferase-Assay eine deutliche Abnahme der E2-induzierten Luciferase-Expression. Für die 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole konnte in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  M die Wirkung einer  $10^{-9}$  M E2-Lösung um gut 50% gehemmt werden. Die Abnahme der Aktivierung ist hierbei eher auf zytotoxische als auf antiestrogene Eigenschaften zurückzuführen. Die Gruppe der 5- bzw. 6-Hydroxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole ergab bereits in einer Konzentration von  $10^{-7}$ - $10^{-6}$  M gleiche Ergebnisse. Die 5- bzw. 6-OH-Gruppe ist Voraussetzung für die antagonistische Wirkung der neu synthetisierten Benzimidazole. Die Blockade der 5-(6)-Hydroxygruppe am Benzimidazol, durch Überführung in den Methylether, führte zu einem vollständigen Wirkungsverlust. Verbindungen mit nur einer Hydroxygruppe

am Phenylring und unsubstituierten Benzimidazolgerüst büßten deutlich an Wirkung ein. Dieser Wirkungsverlust lässt sich unter Annahme eines Raloxifen-analogen Bindungsmodus durch fehlende Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Glu 353 und Arg 394 des ER $\alpha$  erklären, die für ausreichende ER-Ligand-Interaktionen erforderlich sind. Ähnliche Beobachtungen wurden von Grese *et al.* an einer Reihe Raloxifenanaloga gemacht <sup>[178, 204]</sup>. Hierbei führte die Blockade (OCH<sub>3</sub>) bzw. Entfernung der 6-OH-Gruppe sowohl zu einer Verringerung der Rezeptoraffinität als auch zur Verminderung der Wachstumshemmung an MCF-7 Zellen ( $\geq 100$ -fach).

Lediglich für die Gruppe der 5-(6)-Hydroxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)-benzyl]-1*H*-benzimidazole konnte eine antagonistische Wirkung am ER festgestellt werden, während für die übrigen Benzimidazole die Abnahme der E2-induzierten Luciferase-Expression in der Zytotoxizität an MCF-7 Zellen begründet ist.

Die neu synthetisierten 5- bzw. 6-Hydroxy-Benzimidazole zeigen eine deutlich geringere Hemmung der Gentranskription als ähnliche Verbindungen (Pipendoxifen: IC<sub>50</sub> = 1.5 nM <sup>[247]</sup>, Raloxifen: IC<sub>50</sub> = 0.72 nM <sup>[247]</sup>). Eine mögliche Erklärung ist im verringerten Abstand der Hydroxygruppen (**57b I** [5-OH]: 11.38 Å bzw. **57b II** [6-OH]: 11.48 Å) im Vergleich zu Raloxifen (11.7 Å) zu sehen (Kap. 9.1.4.1), der die Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Glu 353, Arg 394 und His 524 beeinträchtigt. Auch die im Vergleich zu Raloxifen und Indolanaloga gesteigerte Hydrophilie der Benzimidazolderivate kann hierbei eine Rolle spielen, da der ER eine lipophile Ligandenbindungstasche aufweist.

Für die antagonistische Wirkung der hier synthetisierten Verbindungen macht es keinen eindeutigen Unterschied, ob sich die Hydroxygruppe in 5- bzw. 6-Position des Benzimidazols befindet. Die zu Beginn der Arbeit durchgeführten Molecular Modeling Untersuchungen zeigten geringe Unterschiede in der räumlichen Orientierung der Stellungsisomeren, so dass sich ein unterschiedlich stark ausgeprägter Antagonismus vermuten ließ. Jedoch ist nicht außer Acht zu lassen, dass die Ligandenbindungstasche des ER ein beachtliches Volumen (450 Å<sup>3</sup>) <sup>[79]</sup> aufweist und sehr unterschiedliche Liganden toleriert werden. Die geringen Konformationsunterschiede der 5- und 6-OH-Isomere scheinen bei annähernd gleichem O-O-Abstand für die ER-Interaktionen deshalb nicht von Bedeutung zu sein. Auch Ergebnisse an einer Reihe von N-Alkylindolen <sup>[248]</sup> und N-Benzylindolen <sup>[206]</sup>, konnten

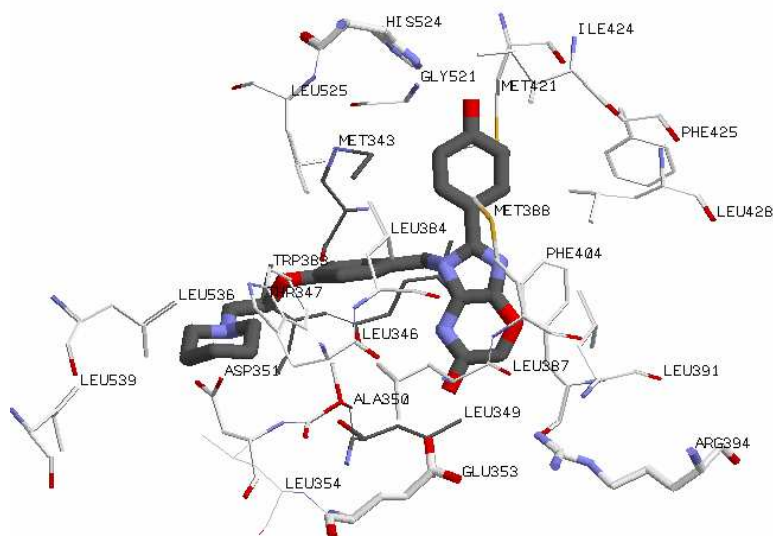


keinen merklichen Unterschied in der Bindungsaffinität der 5- bzw. 6-OH Isomeren belegen. Im Gegensatz dazu konnte an einer Reihe Raloxifenanaloga gezeigt werden, dass die Stellung der Hydroxygruppe für die Wirkung von entscheidender Rolle ist. Interessanterweise zeigt das 5-OH Isomer des Raloxifens (**5-OH-RAL**) bei 3-facher Reduktion der Bindung an den ER keinen signifikanten anti-proliferativen Effekt auf das Wachstum von MCF-7 Zellen (**RAL**: RBA = 34%, **5-OH-RAL**: RBA = 10%; MCF-7 Zellproliferation: **RAL** [IC<sub>50</sub>]: 0.2 nM, **5-OH-RAL** [IC<sub>50</sub>]: 100 nM) <sup>[204]</sup>.

Die 4'-Hydroxygruppe spielt für die antagonistische Wirkung eine untergeordnete Rolle. So zeigten die Isomeren der Verbindung **57a**, die durch das Fehlen der phenolischen OH-Gruppe gekennzeichnet sind, sogar eine stärkere Wirkung als Verbindung **57b**, die eine 4'-OH-Gruppe besitzt. Hierbei ist jedoch die deutlich gesteigerte Zytotoxizität der Verbindung **57a** gegenüber den übrigen 5-(6)-OH-Benzimidazolen nicht außer Acht zu lassen.

Substituenten in o-Stellung des Phenylrings (OH, Cl, F) werden vom ER toleriert, eine 2-OH Gruppe führte sogar zu einer leichten Steigerung der antiestrogenen Wirkung.

Bei keiner der getesteten Verbindungen war, wie erwartet, in einem Konzentrationsbereich von 10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> M eine agonistische Wirkung zu beobachten. Eine Ursache hierfür ist in der basischen Seitenkette zu sehen. Während die Hydroxygruppe am Benzothiophenring des Raloxifens Wechselwirkungen mit Glu 353 und Arg 394 eingeht, bildet die phenolische Hydroxygruppe eine Wasserstoffbrücke zu His 524 des ER $\alpha$  aus. Die Seitenkette interagiert mit Asp 351 und verhindert so die Reorientierung der Helix 12, die den Ligand in die Rezeptortasche einschließen muss, damit eine agonistische Wirkung zustande kommen kann <sup>[249]</sup>. Aufgrund der ähnlichen Orientierung der synthetisierten Benzimidazole im Vergleich zum Raloxifen sind ähnliche Wechselwirkungen zu erwarten. Abbildung 84 zeigt die mögliche Orientierung der neu synthetisierten Benzimidazole in der LBD des ER $\alpha$ .



**Abb. 84:** Mögliche Orientierung des 6-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazols **57b II** in der LBD des ER $\alpha$ .

#### 9.1.4.3 Zytotoxizität an der MCF-7 Zelllinie und MDA-MB 231 Zelllinie

Die Untersuchungen an der hormonabhängigen MCF-7 Zelllinie und der hormonunabhängigen MDA-MB 231 Zelllinie zeigten, dass die Zytotoxizität der neu synthetisierten Verbindungen nicht mit der antagonistischen Wirkung am ER korreliert. Während für alle Verbindungen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Zytotoxizität auf MCF-7 Zellen (ER+) zu verzeichnen war, trat eine antagonistische Wirkung am ER nur bei Benzimidazolen auf, die eine Hydroxygruppe in 5- bzw. 6-Position des Benzimidazolgerüsts besitzen.

Erste Hinweise auf die zytotoxische Wirkung in höheren Konzentrationen wurden bereits im Luciferase-Assay erhalten. Alle Benzimidazole mit mindestens einer Methoxy- bzw. Hydroxygruppe zeigten an der MCF-7 Zelllinie in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M einen hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum. Das am Phenylring und Benzimidazolgerüst unsubstituierte Derivat war an beiden Zelllinien wirkungslos. Der zytostatische/zytotoxische Effekt an den hormonunabhängigen MDA-MB 231 Zellen trat nur bei einzelnen Verbindungen auf.

Die Beteiligung des ER an den antiproliferativen Eigenschaften der 5- bzw. 6-OH-Benzimidazole ist durchaus vorstellbar. Jedoch kann der ER nicht als alleinige

Ursache für die beobachtete Zytotoxizität gesehen werden, denn auch Verbindungen, die im Luciferase-Assay keine Wirkung zeigten, wiesen beachtliche zytotoxische Eigenschaften auf. Auch die Wachstumshemmung hormonunabhängiger MDA-MB 231 Zellen ist nicht auf Wechselwirkungen mit dem ER zurückzuführen und spricht für die Beteiligung weiterer Mechanismen.

In der Reihe der am Benzimidazolgerüst unsubstituierten Verbindungen waren die hydroxylierten Derivate deutlich wirksamer als ihre methoxylierten Analoga. Alle Verbindungen der Gruppe der 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole wiesen in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M eine zytozide Wirkung an der MCF-7 Zelllinie auf. Die Wirkung wurde durch Substituenten in 2-Position des Phenylrings abgeschwächt. Die Zytotoxizität der 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole war stärker als die der analogen 5- bzw. 6-OH-Benzimidazole.

In der Reihe der 5-(6)-Hydroxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole war lediglich für Verbindung **57a** ein wesentlicher Wirkungsunterschied der 5- und 6-OH-Isomeren an der hormonabhängigen Zelllinie zu beobachten. Die Zytotoxizität der übrigen Isomerenpaare war deutlich schwächer ausgeprägt und zeigte keinen Unterschied zwischen den Stellungsisomeren. Die Zeit-Wirkungs-Kurven aller Verbindungen dieser Gruppe (Ausnahme: **57a**) waren nahezu identisch. Die Substitution des Phenylrings bewirkte keine Veränderung der Wachstumshemmung. Eine Rezeptorsättigung bei den 5-(6)-Hydroxy-Benzimidazolen lässt sich vermuten, da kein merklicher Unterschied in den Zeit-Wirkungs-Kurven in Abhängigkeit von der Konzentration zu vermerken war, während Aggregate in den mit MCF-7 Zellen beschickten 96-Loch-Platten in einer Substanzkonzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M mikroskopisch nicht zu beobachten waren.

Eine Struktur-Wirkungskorrelation an der MDA-MB 231 Zelllinie ist für die neu synthetisierten Benzimidazole nicht nachweisbar.

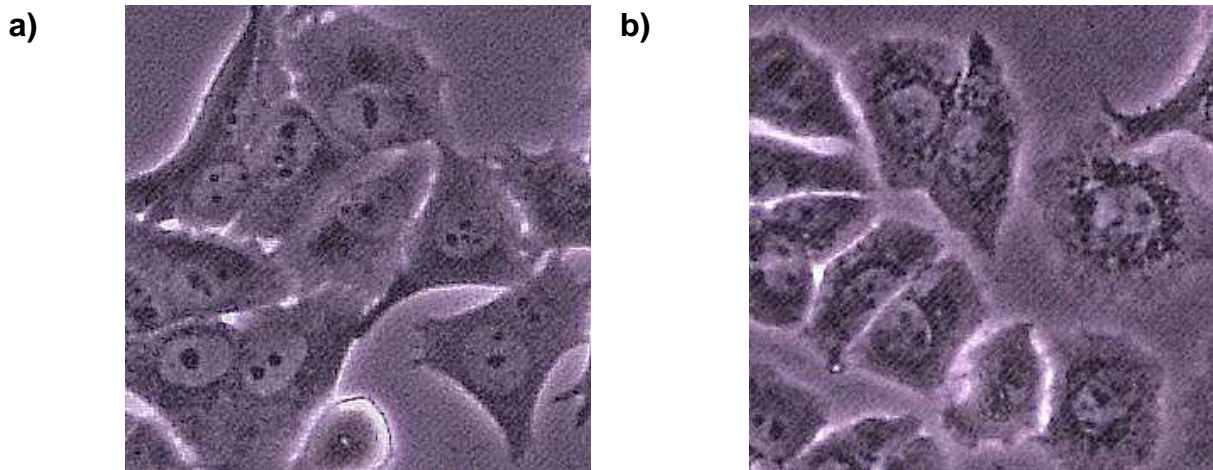
## 9.2 Mikroskopische Beobachtungen an MCF-7 Zellen

Die mikroskopische Betrachtung der Zellen ermöglicht durch Beobachtung der Zellmorphologie bereits ab dem Zeitpunkt der Substanzzugabe die Beurteilung des Wirkungseintrittes. Zusätzlich können möglicherweise Hinweise auf den Wirkungsmechanismus erhalten werden.

Nachfolgend sind exemplarisch die Zellbilder von MCF-7 Zellen nach Inkubation mit Verbindung **56a** dargestellt (Abb. 85a, b, 86a, b). Diese Substanz wurde für die Darstellung gewählt, da sie die stärkste Zytotoxizität aufweist und Veränderungen in der Zellmorphologie am deutlichsten zu erkennen waren. Nach erfolgter Substanzzugabe wurden die MCF-7 Zellen in regelmäßigen Abständen mikroskopisch betrachtet.

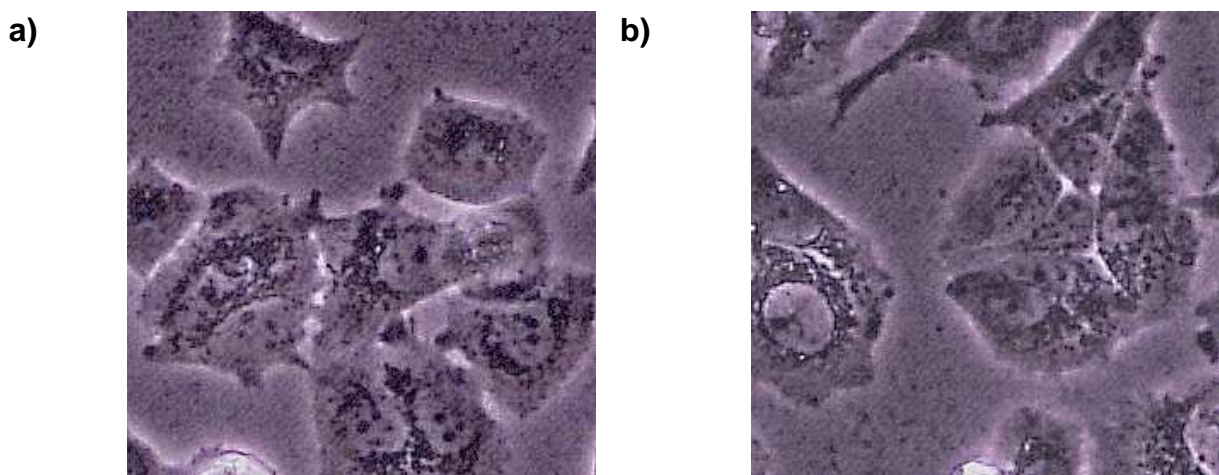
### 9.2.1 Testergebnisse

Abbildung 85a zeigt MCF-7 Zellen, die ohne Substanz inkubiert wurden. Die Zellen hafteten gut am Flaschenboden. Zellkern und Zellplasma waren deutlich voneinander abgegrenzt. Bereits 24 h nach der Substanzzugabe (Abb. 85b) waren dunkle Ablagerungen um den Zellkern zu erkennen, die innerhalb der nächsten 24 h stark zunahmten. Eine deutliche Zytotoxizität, die durch zahlreiche Zelltrümmer und veränderte Zellmorphologie gekennzeichnet war, setzte 48 h nach der Substanzzugabe ein (Abb. 86a). Nach 72 h (86b) war keine deutliche Abgrenzung des Zellkerns gegenüber dem Zellplasma mehr zu beobachten. Zahlreiche Zellfragmente waren vorhanden.



**Abb. 85:** a) MCF-7 Zellen ohne Substanz.

b) MCF-7 Zellen + Verbindung **56a** nach 24 h Inkubation.



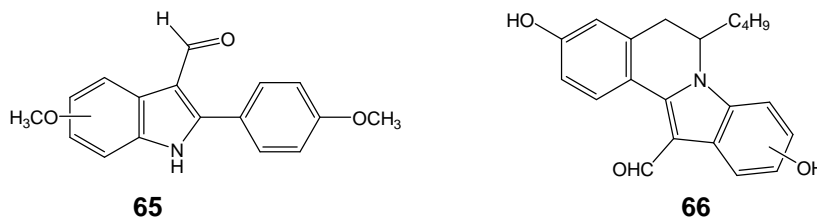
**Abb. 86:** a) MCF-7 Zellen + Verbindung **56a** nach 48 h Inkubation.

b) MCF-7 Zellen + Verbindung **56a** nach 72 h Inkubation.

### 9.2.2 Diskussion der Testergebnisse

Die Interaktion mit dem Tubulinsystem, sowohl durch Verhinderung der Polymerisation der  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulinheterodimere (z.B. durch Vinca-Alkaloide) als auch durch Stabilisierung der polymeren Struktur (z.B. durch Taxol) kann als Angriffsort für Zytostatika gesehen werden. Die wichtigste Funktion der Mikrotubuli ist die Bildung des Spindelapparates, der für die korrekte Verteilung der Chromosomen in sich teilenden Zellen verantwortlich ist. Den Benzimidazolen strukturähnliche methoxy-

substituierte 3-Formyl-2-phenylindole (**65**)<sup>[250]</sup> und 12-Formyl-5,6-dihydroindolo[2,1-a]isochinoline (**66**)<sup>[251]</sup> (Abb. 87) zeigen bei zytotoxischer Wirkung an MDA-MB 231 und MCF-7 Zellen eine Inhibierung der Tubulinpolymerisation. Hierbei ist eine Zerstörung des zellulären Netzwerkes der Mikrotubuli und Tubulinkondensation um den Zellkern, analog dem Colchicin, zu vermerken<sup>[250]</sup>.



**Abb. 87:** Inhibitoren der Tubulinpolymerisation.

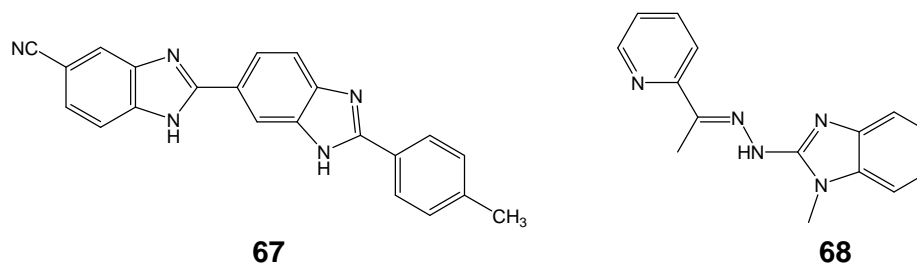
Wie aus den Abbildungen 85b und 86a, b ersichtlich, waren auch bei den neu synthetisierten Benzimidazolen Ablagerungen um den Zellkern zu vermerken, so dass dieser Wirkungsmechanismus für die Zytotoxizität in Frage kommt. Um konkrete Aussagen treffen zu können, sind weiterführende Arbeiten erforderlich.

Eine Vielzahl weiterer Mechanismen stellt eine mögliche Erklärung für die beobachtete Zytotoxizität der Benzimidazolderivate dar:

- Topoisomerase I + II - Hemmung
- Hemmung der DNA-Synthese (Hemmung der Purinsynthese)
- Interkalation zwischen die DNA-Stränge
- Vermittlung der Zytotoxizität über andere Rezeptoren (z.B. A<sub>1</sub>-AR)
- Aminosäure- und Purinantagonisten

Für viele zytotoxisch wirksame Verbindungen ist bekannt, dass sie die nukleären DNA-Topoisomerasen hemmen. Topoisomerasen sind daran beteiligt, nötige topologische und konformelle Änderungen der DNA zu produzieren, die Voraussetzung für die Vorgänge der Replikation und Transkription sind. Die meisten

Krebstherapeutika sind dabei Hemmstoffe der Topoisomerase II (Etoposid, Doxorubicin, Daunorubicin), während für die Topoisomerase I nur wenige Inhibitoren bekannt sind (Camptothecin). Auch für die Gruppe der 2,5'-Bi-1*H*-benzimidazole (**67**) ist bekannt, dass sie ihre Zytotoxizität über Inhibierung der Topoisomerase I entfalten (Abb. 88) <sup>[252]</sup>.



**Abb. 88:** 2,5'-Bi-1*H*-benzimidazole (**67**) und 2-Benzimidazolylhydrazone (**68**).

Das Zellwachstum kann aber auch durch sämtliche Vorgänge vermindert werden, die Einfluss auf die DNA- und Proteinbiosynthese zeigen. Substituierte Benzimidazole können als potentielle Aminosäure- (Tryptophan, Phenylalanin) und Purin-antagonisten angesehen werden. Da Krebsgewebe als stark proliferierendes Gewebe einen hohen Bedarf an Aminosäuren besitzt, kann die Aufnahme von Aminosäureantimetaboliten das Wachstum der Krebszellen negativ beeinflussen <sup>[253]</sup>. Die Reduktion der Nukleinsäuresynthese ist u.a. Ergebnis einer verringerten Purin *de novo* Synthese. Hall *et al.* konnte die inhibitorische Wirkung der 2-Benzimidazolylhydrazone (**68**) auf drei regulatorische Enzyme (PRPP-Amido-transferase, IMP-Dehydrogenase, Dihydrofolat-Reduktase), die in die Purinsynthese involviert sind, belegen (Abb. 88). Des Weiteren ist die DNA selbst Angriffsort dieser Verbindungen. Wie CT-DNA-Studien („calf thymus“-DNA) vermuten lassen, bewirken die 2-Benzimidazolylhydrazone sowohl die Alkylierung der Nukleotidbasen als auch Interkalation zwischen die Basenpaare <sup>[254]</sup>.

Um exakt klären zu können, welche Mechanismen im Einzelnen an der Zytotoxizität der synthetisierten Benzimidazole beteiligt sind, ist die Durchführung weiterführender Arbeiten erforderlich.

Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus stellte sich zunächst die Frage, ob die Zytotoxizität auf extrazellulärer (Interaktion mit membranären Rezeptoren) und/oder intrazellulärer (z.B. DNA-Interkalation, ER-Bindung) Ebene stattfindet.

### 9.3 Zeitabhängige Zellaufnahme

Die zytotoxische Wirkung der Benzimidazole kann sowohl auf intrazellulärer (z.B. DNA-Interkalation, Hemmung der Purinsynthese) als auch auf extrazellulärer Ebene (z.B. AR-Blockade) entfaltet werden. Damit eine Verbindung in der Zelle wirksam werden kann, ist zunächst die Durchdringung der Zellmembran erforderlich. Bei ausreichender Lipophilie kann die Zellmembran durch passive Diffusion passiert werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Stoffaufnahme über spezielle Transportproteine (Kanäle, Carrier, Pumpen) <sup>[255]</sup>. Die durchgeführten Zellaufnahmestudien sollten zeigen, ob intrazelluläre Mechanismen als Erklärungsmöglichkeit der Zytotoxizität in Frage kommen.

Die Fluoreszenz der synthetisierten Benzimidazole ermöglichte die Quantifizierung der in die Zelle aufgenommenen Menge über die Messung ihrer Emission. Dabei muss die Fluoreszenz außerhalb der zellulären Eigenemission liegen. Dazu wurden die Zellen mit Substanz inkubiert und nach 6 h bzw. 24 h ihr Gehalt an Benzimidazol bestimmt und auf den zellulären Proteingehalt bezogen. Unter Berücksichtigung des mittleren Zellvolumens und des mittleren Proteingehaltes kann auf die intrazelluläre Konzentration geschlossen werden <sup>[256, 257]</sup>. Aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften wurde Verbindung **57a II** für die Untersuchung der Zellaufnahme ausgewählt (Kap. 8.4).

#### 9.3.1 Testergebnisse

Für die eingesetzte Substanzkonzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M ergab sich für Verbindung **57a II** nach 6 h eine intrazelluläre Konzentration von 27  $\mu\text{M}$ , die nach 24 h deutlich erhöht war (284  $\mu\text{M}$ ). Daraus ergibt sich ein Anreicherungsgrad (Verhältnis der



intrazellulären Substanzkonzentration zur Konzentration im Extrazellulärmedium) in den Zellen von 2.7 bzw. 28.4 gegenüber der Konzentration im Kulturmedium.

### 9.3.2 Diskussion der Testergebnisse

Für Verbindung **57a II** konnte exemplarisch mittels Fluoreszenzmessungen gezeigt werden, dass eine Aufnahme in die Zelle erfolgt. Somit kommen für die Zytotoxizität sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Mechanismen in Frage. Der Zusammenhang zwischen Struktur der Verbindungen und Zellaufnahme wurde nicht untersucht, da die Fluoreszenzeigenschaften der übrigen Benzimidzolderivate für die Bestimmung der Zellaufnahme nicht geeignet waren (Fluoreszenz im Bereich der zellulären Eigenemission, geringe Intensität) und die Protein- und gegebenenfalls DNA-Abtrennung erforderlich wäre.

## 9.4 DNA-Interkalation

Eine mögliche Erklärung für die Zytotoxizität auf intrazellulärer Ebene ist die Interkalation der Verbindungen zwischen die DNA-Basenpaare. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den in Kapitel 9.2.2 beschriebenen 2-Benzimidazolylhydrazonen und der Fluoreszenzlöschung der Benzimidazole durch DNA-Lösung (Kap. 8.4.4) wurde die interkalierende Wirkung der neu synthetisierten Benzimidazole an CT-DNA als möglicher Wirkungsmechanismus hinsichtlich der antiproliferativen Eigenschaften untersucht.

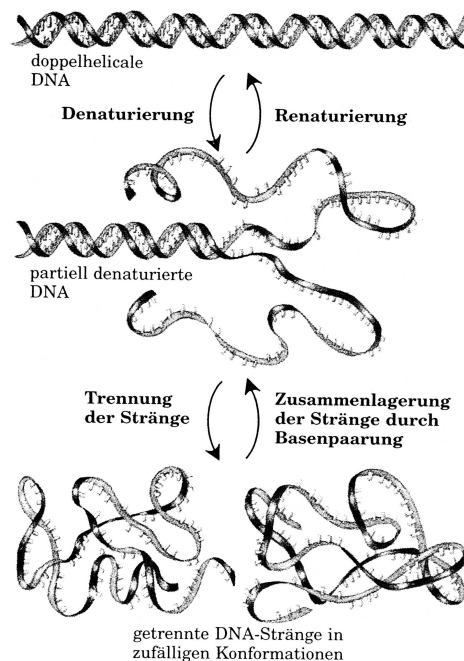
### 9.4.1 Denaturierung der DNA

Die beiden Doppelstränge der DNA werden rasch getrennt und nehmen eine zufällige ungeordnete Knäuelkonfiguration an, wenn die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren aufgehoben werden (Abb. 89). Dazu kann es durch Säure- bzw. Basenzugabe, aber auch durch Erwärmen der DNA-Lösung kommen.

Dieser Prozess der Denaturierung geht mit einer Änderung der physikalischen Eigenschaften einher (z.B. Verringerung der Viskosität nativer DNA beim Zerfall in ihre Einzelstränge). Das Aufwinden der Doppelhelix wird Schmelzen genannt und tritt bei einer bestimmten Temperatur ( $T_m$ ) auf.

Der Schmelzpunkt  $T_m$  bezeichnet die Temperatur, bei der die Helixstruktur zur Hälfte verloren gegangen ist. Dieser ist stark von der Basenzusammensetzung abhängig.

Eine Möglichkeit zur Messung des DNA-Schmelzpunkts liegt in der Extinktionsmessung bei 260 nm (UV-Absorptionsmaximum für Nukleotide). Infolge des Zusammenbruches der Basenpaarungen nimmt die Extinktion über das gesamte Spektrum zu, wenn die Doppelhelix zu Einzelsträngen schmilzt. Dieser Effekt wird auch als Hyperchromie bezeichnet <sup>[258]</sup>.



**Abb. 89:** Schritte der reversiblen Denaturierung und Renaturierung der DNA <sup>[258]</sup>.

Die Bindung kleiner Moleküle an Einzel- und Doppelstrang-DNA beeinflusst die Stabilität und damit das Schmelzverhalten der DNA. Es kommt zur Erhöhung der Schmelztemperatur, wenn ein Molekül höhere Affinität zur Doppelstrang-DNA als zur Einzelstrang-DNA aufweist. Hingegen wird die Schmelztemperatur durch bevorzugte Bindung an Einzelstrang-DNA erniedrigt <sup>[259, 260]</sup>.

Um die Bindungsaffinität der neu synthetisierten Benzimidazole zur Einzel- und Doppelstrang-DNA zu untersuchen, wurden DNA-Schmelzkurven in An- und Abwesenheit der Verbindungen aufgenommen. Die Versuche wurden in 1.0 mM Phosphatpuffer (pH 7.3) mit Kalbsthymus-DNA (CT-DNA) in einer Konzentration von 150  $\mu$ M, bezogen auf die Basenpaare, durchgeführt. Die Konzentration des Benzimidazols wurde so gewählt, dass ein Substanz/Basenpaar-Verhältnis von 0.4 erhalten wurde. Die Messung der Extinktion wurde von 30 bis 90°C durchgeführt.  $T_m$  wird bei halbmaximaler Hyperchromie abgelesen.

#### 9.4.2 Testergebnisse

Der Schmelzpunkt  $T_m$  der verwendeten CT-DNA liegt in dem verwendeten Phosphatpuffer bei 64°C. Die Hyperchromie beträgt hierbei 0.46. Nach Zugabe der zu untersuchenden Benzimidazole erfolgte jeweils nur eine leichte Rechtsverschiebung der DNA-Schmelzkurve. Die Schmelzpunkttemperaturdifferenz  $\Delta T_m$  betrug bei einem Substanz-DNA-Verhältnis von 0.4 maximal 3°C (Erhöhung der Schmelztemperatur).

#### 9.4.3 Diskussion der Testergebnisse

Für klassische Interkalatoren werden bereits bei einem Substanz-DNA-Verhältnis von 0.1 wesentlich stärkere Schmelztemperaturverschiebungen gemessen <sup>[261, 262]</sup>. Die Interkalation kommt für die Erklärung der Zytotoxizität deshalb nicht in Frage. Die geringfügige Änderung von  $T_m$  deutet daher auf eine nicht-interkalierende DNA-Wechselwirkung hin. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den durchgeführten Fluoreszenzuntersuchungen in DNA-Lösung (Kap. 8.4.4), bei denen nach Zugabe

der DNA-Lösung zur Substanzverdünnung eine Verringerung der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen war.

Es lässt sich leicht vorstellen, dass die bei einem pH-Wert von 7.3 auftretende kationische Ladung des Piperidinrings der Benzimidazole (Kap. 6.2.2) mit anionischen Ladungen (Phosphatgruppen) der DNA in Wechselwirkung treten kann und somit zur Stabilisierung der DNA beiträgt. Eine Stabilisierung der DNA führt zu einer Erhöhung von  $T_m$ . In der Literatur wird mehrfach über eine zusätzliche Stabilisierung des Ligand-DNA-Komplexes durch starke elektrostatische Interaktion zwischen einer geladenen Aminogruppe und benachbarten DNA-Phosphatgruppen berichtet <sup>[263-265]</sup>.

## 9.5 Affinität zum Adenosinrezeptor

Da die zytotoxische Wirkung der neu synthetisierten Verbindungen möglicherweise in Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Adenosinrezeptoren steht, wurde für einige Verbindungen die Affinität zum  $A_1$ -,  $A_{2a}$ - und  $A_3$ -AR mit Hilfe von Radioligand-Bindungassays bestimmt. Die Benzimidazole weisen strukturelle Ähnlichkeit zu bereits vorhandenen AR-Liganden (Kap. 1.3.2) auf. Es wurden strukturell möglichst unterschiedliche Benzimidazole für die Testung ausgewählt. Der  $A_1$ -AR-Bindungsassay wurde unter Verwendung von Ratten-Cortex und dem  $A_1$ -AR-selektiven Radioliganden [ $^3$ H]CCPA durchgeführt. CADO wurde zur Bestimmung der unspezifischen Bindung eingesetzt. Für das  $A_{2a}$ -AR-Bindungsassay sind Ratten-Striatum, der selektive Radioligand-Antagonist [ $^3$ H]-MSX-2 und NECA (Bestimmung der unspezifischen Bindung) erforderlich. Membranen von CHO-Zellen, die stabil mit dem humanen  $A_3$ -AR transfiziert wurden und der Radioligand [ $^3$ H]PSB-11 fanden bei der Bestimmung der Affinität zum  $A_3$ -AR Anwendung. Die unspezifische Bindung wurde mittels R-PIA erhalten. Die Ermittlung der totalen Bindung (spezifische + unspezifische Bindung) wurde in allen Untersuchungen durch Inkubation des entsprechenden Radioliganden in Tris/DMSO mit dem Rezeptor und anschließender Radioaktivitätsmessung ermittelt. Die Differenz aus totaler Bindung und unspezifischer Bindung ergibt die spezifische Bindung des jeweiligen Liganden. Nach erfolgter Inkubation von Rezeptor, Radioligand und Testverbindung in 96-Loch-Platten wurden die Platten filtriert und die Filter mehrfach gewaschen. Die

Radioaktivität auf dem Filter wird nach dem Versetzen mit einem Szintillationscocktail und erneuter Inkubation mit einem Mikroplatten-Szintillations- und Lumineszenzzähler gemessen <sup>[266]</sup>.

### 9.5.1 Testergebnisse

Anhand der Radioligand-Bindungsassays konnte eine Affinität zum A<sub>1</sub>-AR nachgewiesen werden (Tab. 23). Dabei zeigte nur Verbindung **57b** eine nennenswerte Affinität, bei hoher Selektivität zum A<sub>1</sub>-AR (51%). Offensichtlich sind die Hydroxygruppen am Phenylring und am Benzimidazolring essentiell für die Wirkung. Aus diesem Grund ist auch für die Verbindungen **57d** (2-Cl) und **57e** (2-F), die sich nur geringfügig von Verbindung **57b** unterscheiden, eine Affinität zum A<sub>1</sub>-AR zu erwarten. Für Verbindung **57b** wurde zusätzlich ein K<sub>i</sub>-Wert von 3.7 µM ermittelt (Abb. 90). AR-Agonisten leiten sich vom Adenosin ab, wobei nur geringe Modifikationen am Riboseteil erlaubt sind, während der Adenosinteil stärkere Veränderungen zulässt. Aufgrund des Fehlens des Riboseteils bei den neu synthetisierten Benzimidazolen kann von einer antagonistischen Wirkung ausgegangen werden.

Verb.	A <sub>1</sub> -AR (rat cortex) vs. [ <sup>3</sup> H]CCPA	A <sub>2a</sub> -AR (rat striatum) vs. [ <sup>3</sup> H]MSX-2	A <sub>3</sub> -AR (human recombinant) vs. [ <sup>3</sup> H]PSB-11
	% Inhibierung ± SEM	% Inhibierung ± SEM	% Inhibierung ± SEM
<b>53d</b>	13 ± 4	0	13 ± 4
<b>56a</b>	12 ± 3	16 ± 4	0
<b>57a I</b>	14 ± 6	0	0
<b>57a II</b>	9 ± 4	23 ± 6	7 ± 9
<b>57b</b>	51 ± 7	0	6 ± 5

**Tab. 23:** Ergebnisse des Radioligand-Bindungsassays an den A<sub>1</sub>-, A<sub>2a</sub>- und A<sub>3</sub>-AR (n=3).

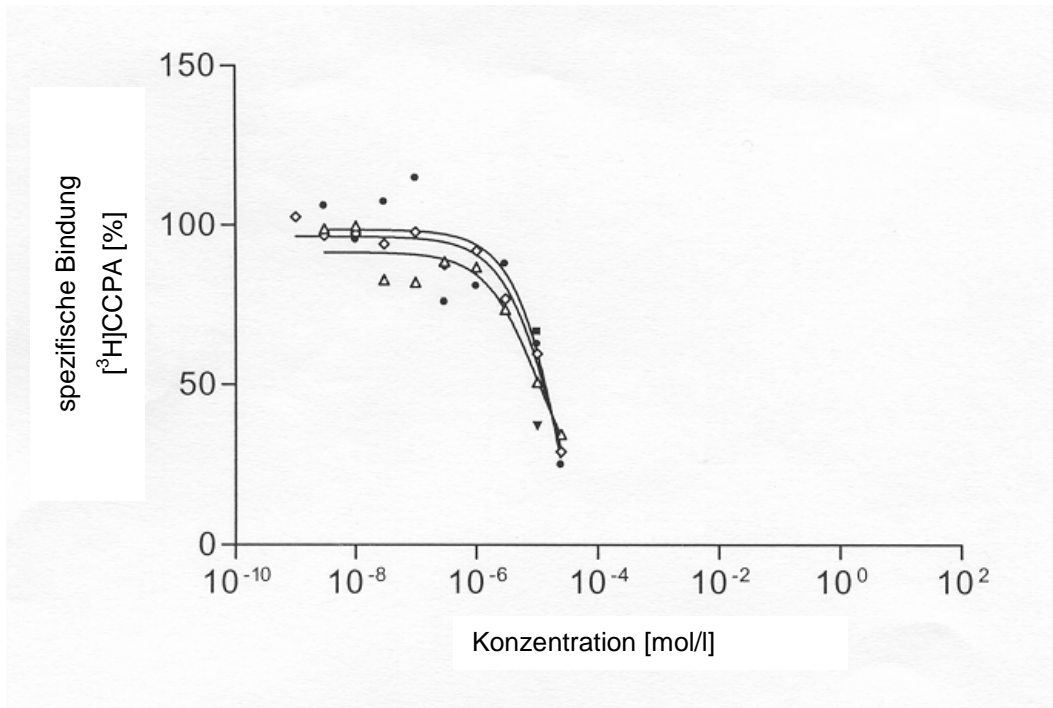
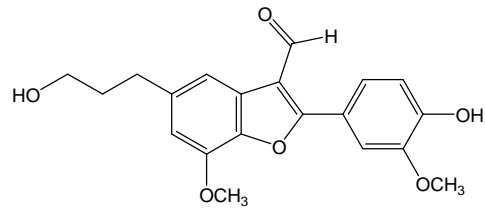


Abb. 90:  $K_i$ -Wert-Bestimmung der Verbindung **57b** ( $n=3$ ).

### 9.5.2 Diskussion der Testergebnisse

Verbindung **57b** zeigt Ähnlichkeit zu einem selektiven und potenten  $A_1$ -AR-Antagonisten (Abb. 91) aus *Salvia milthiorrhiza* Bunge ( $IC_{50} = 17$  nm) <sup>[267, 268]</sup>. Wie bereits in Kapitel 1.3.3 beschrieben, sind die AR an der Regulierung der Zellproliferation beteiligt. Für  $A_1$ -AR-Antagonisten ist eine proliferative Wirkung auf MCF-7 Zellen in der Literatur beschrieben (Kap. 1.3.3). Antagonisten am  $A_1$ -AR können somit den ER-vermittelten antiproliferativen Eigenschaften der 5-(6)-OH-Benzimidazole entgegenwirken und die Zytotoxizität abschwächen. Dafür spricht auch, dass die Isomere der Verbindung **57a**, die durch das Fehlen der 4'-OH-Gruppe gekennzeichnet sind, eine deutlich gesteigerte Zytotoxizität, bei fehlender Affinität zum  $A_1$ -AR, aufweisen. Benzimidazol **57b**, das sowohl eine Hydroxygruppe am Benzimidazol- als auch am Phenylring trägt, kann durch die Affinität zum  $A_1$ -AR möglicherweise das Zellwachstum beeinflussen. Alle übrigen Verbindungen mit beiden für die  $A_1$ -AR Affinität benötigten Hydroxygruppen (**57c-e**), zeigten eine ebenfalls deutlich verringerte Zytotoxizität, die eine  $A_1$ -AR-Affinität vermuten lässt. Zur Bestätigung dieser Annahme sind jedoch weitere AR-Bindungsstudien erforderlich.



**Abb. 91:** A<sub>1</sub>-AR-Antagonist aus *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

Neben der Affinität der Benzimidazole zum ER spielen also auch Interaktionen mit dem AR eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Zellwachstums.

Aufgrund der hohen Selektivität gegenüber den anderen Rezeptorsubtypen lässt sich das Benzimidazol **57b** als Leitstruktur für die Entwicklung selektiver A<sub>1</sub>-AR-Liganden verwenden.

