

1,1,2-Triarylalkene als „passive“ Estrogenrezeptorantagonisten
Synthese und pharmakologische Untersuchungen

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Veronika Lubczyk

Berlin 2002

Dekan: Prof. Dr. K. Seppelt

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Gust

2. Gutachter: PD. Dr. H. Pertz

Datum der Disputation: 30.10.2002

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 1997 bis September 2002 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin. Die Dissertation wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Gust angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. R. Gust für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Freiheit bei der Bearbeitung des gestellten Themas,

Frau Prof. Dr. M. Schäfer-Korting für die freundliche Aufnahme in ihr Zelllabor und die Bereitstellung diverser Arbeitsgeräte,

Herrn Dr. K. Fiebig für die Bereitstellung der Ultrazentrifuge,

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises, insbesondere Frau S. Bergemann, Frau S. Busch, Herrn M. von Rauch, Frau U. Shihada und Frau I. Schnautz für die angenehme und förderliche Arbeitsatmosphäre,

den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie, Frau B. Gartz, Frau G. Rehork, Herrn J. Lindemann und Herrn A. Kannegiesser, für die Aufnahme der Spektren,

der Fleischzentrale Kasel-Golzig für die Erlaubnis Kälberuteri aus ihren frischen Schlachtabfällen herauszuschneiden,

den Assistentinnen und Assistenten des 1. Semesterpraktikums für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die nicht immer nur fachlichen Diskussionen

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

1,1,2-Triarylalkene als „passive“ Estrogenrezeptorantagonisten

Synthese und pharmakologische Untersuchungen

Tamoxifen (TAM), das in der Behandlung des hormonabhängigen Mammakarzinoms eingesetzt wird, ist ein Prodrug, das durch Hydroxylierung in 4-Position des A-Rings zum 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) aktiviert wird. Dieses besitzt einen 8-fach höheren RBA-Wert als TAM und ist ein reines Antiestrogen an hormonabhängigen Brustkrebszellen, dessen Wirkung durch die Dimethylaminoethoxy-Seitenkette in 4-Position des B-Rings vermittelt wird.

Da eine Reihe O-acylierter Triarylalkenderivate jedoch eine schwache aber signifikante antagonistische Wirkung auch ohne eine basische Seitenkette aufwies, war ein Ziel dieser Arbeit die Notwendigkeit einer solchen Seitenkette für die antagonistische Wirkung auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Hierzu wurden 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkene (BisOHR), 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene (TrisOHR), 1-(3-Fluor-4-hydroxyphenyl)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)alkene (FTrisOHR) und deren O-Methylether mit unterschiedlich langen C2-Alkylseitenketten synthetisiert. Von BisOHPr und TrisOHPr und deren O-Methylethern wurden Derivate mit unterschiedlich substituierter C2-Propylseitenkette dargestellt. Von allen Verbindungen wurden die Affinität zum ER, die agonistische und antagonistische Wirkung an der hormonabhängigen MCF-7-2a-Zelllinie sowie die Proliferationshemmung an *in vitro* Testmodellen untersucht. Die Rezeptoraffinität und die antagonistische Wirkung zeigten eine eindeutige Abhängigkeit von der Art und Länge der Seitenkette an C2. Die erfolgreichsten Verbindungen waren BisOHEt, TrisOHEt sowie FTrisOHBu, die eine 4-OHT vergleichbare antagonistische Wirkung auf molekularer Ebene zeigten.

Aufgrund der fehlenden Seitenkette kann diese Wirkung nicht nach dem für 4-OHT vorgeschlagenen Mechanismus vermittelt werden. Ein möglicher Wirkmechanismus ist der kürzlich für ein Tetrahydrochrysenderivat vorgeschlagene „passive“ Antagonismus.

Die antiproliferative Wirkung konnte nicht mit der Länge der Seitenkette korreliert werden. Die erfolgreichsten antiproliferativen Verbindungen waren BisOMePrNH₂ und TrisOMePrNH₂, die sogar eine zytozide Wirkung an MCF-7-Zellen aufwiesen.

Ferner wurden Voruntersuchungen zur Fluoreszenzmarkierung von ER-Liganden durchgeführt. Die Konjugation eines Triarylalkens mit einem Fluoreszenzfarbstoff erschien als besonders geeignete Methode, da die Molekülgeometrie des Triarylalkens auf diese Weise nicht beeinflusst wird. Im Hinblick auf eine potentielle Anwendung in der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FKS) wurde Rhodamin B als Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt. Dieser wurde über einen Hexylspacer mit den Triarylalkenen verbunden. Die resultierenden fluoreszenzmarkierten Triarylalkene **27** und **33Z** erwiesen sich jedoch aufgrund ihrer geringen Rezeptoraffinität und ihrer Fluoreszenzcharakteristika nicht als geeignet für den Einsatz in der FKS.

1,1,2-Triarylalkenes as „passive“ estrogen receptor antagonists

Syntheses and pharmacological evaluation

Tamoxifen (TAM) is widely used in the treatment of hormone dependent breast cancer. TAM itself acts as prodrug, which is activated by hydroxylation of the 4-position of the A-ring. The resulting 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) possesses an 8 times higher binding affinity to the estrogen receptor (ER) and acts as pure anti-estrogen in hormone dependent tumor cells. The dimethylaminoethoxy side chain in 4-position of the B-ring seems to be crucial for the anti-estrogenic activity.

As it could be previously shown a series of O-acyl triarylalkene derivatives possessed weak but significant antagonistic effects, without bearing a basic side chain. Therefore in this work the necessity of a basic side chain for the antagonistic effects of triarylalkenes was examined on molecular level.

According to this 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkenes (BisOHR), 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)-alkenes (TrisOHR), 1-(3-Fluor-4-hydroxyphenyl)-1,2-bis(4-hydroxyphenyl)alkenes (FTrisOHR) and the corresponding O-methylethers with different C2-alkyl side chains were synthesized. Additionally BisOHPr and TrisOHPr derivatives with different functional groups at the alkyl side chain were synthesized. Receptor binding affinity, agonistic and antagonistic properties on the MCF-7-2a hormone dependent breast cancer cell line and the cytotoxic properties were examined. Receptor binding affinity and antagonistic properties were influenced by the length and the functional groups at the end of the side chain at C2. The most active compounds BisOHEt, TrisOHEt and FTrisOHBu possessed similar antagonistic properties on molecular level as 4-OHT.

These strong antagonistic effects cannot be mediated by the mode of action that is known for 4-OHT, as the examined compounds do not bear a basic side chain. It might rather be assumed that the antagonistic properties are exerted by a mode of action termed “passive antagonism” which was proposed recently for a tetrahydrochrysene derivative.

The cytotoxic properties could not be correlated with the length of the C2-alkyl side chain. The most active compounds were the O-methylated amines BisOMePrNH₂ and TrisOMePrNH₂ which showed even cytotoxic effects on MCF-7 cells.

Furthermore investigations on the fluorescence labelling of ER-ligands were carried out. To achieve this goal conjugation of a triarylalkene with a fluorescent probe seemed the most suitable method. Two positions of the triarylalkene scaffold were chosen for conjugation by overlay with E2. Regarding an application of the conjugates in fluorescence correlation spectroscopy the triarylalkenes were connected with rhodamine b by means of a hexyl spacer. The resulting compounds **27** and **33Z** still require optimisation according to ER-affinity and fluorescence characteristics in view of their future application.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	1
1	Einleitung und Problemstellung.....	4
1.1	Brustkrebs	4
1.1.1	Vorkommen.....	4
1.1.2	Ursachen.....	5
1.1.3	Klassifizierung	5
1.1.4	Therapie	6
1.1.5	Hormontherapeutika.....	7
1.2	Der Estrogenrezeptor - Struktur und Aktivierung	8
1.2.1	Historisches.....	8
1.2.2	Der Aufbau der Estrogenrezeptoren	10
1.2.3	Rezeptortransformation und Genaktivierung.....	13
1.2.4	Koregulatoren und Wachstumsfaktoren	15
1.2.5	ER α und ER β	16
1.3	Agonistische Wirkung	18
1.4	Antagonistische Wirkung	19
1.5	Problemstellung	19
2	Synthetischer Teil.....	24
2.1	Übersicht über die synthetisierten Verbindungen	24
2.2	Synthese der Triarylalkene.....	27
2.2.1	Synthese des Triarylalken-Grundgerüsts	27
2.2.2	Synthese von 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid 2	28
2.2.3	Synthese der Desoxybenzoine 6a, 7a, 8a.....	28
2.2.4	Alkylierung der Desoxybenzoine	29
2.2.5	Grignard-Reaktion zum Triarylalken-Grundgerüst.....	29
2.2.6	Strukturmodifikationen an der Nitrilfunktion.....	30

2.2.6.1	Hydrolyse der Nitrile zu Carbonsäuren.....	31
2.2.6.2	Reduktion der Nitrile zu Aminen	31
2.2.7	Abspaltung der O-Methylschutzgruppe.....	32
2.2.8	Strukturmodifikationen der Amine.....	33
2.2.8.1	Veresterung.....	33
2.2.8.2	Esterhydrolyse.....	34
2.3	Synthese der fluoreszenzmarkierten Verbindungen	34
2.3.1	Fluoreszenzmarkierung der Seitenkette	34
2.3.2	Fluoreszenzmarkierung am Triarylalken-Grundgerüst.....	38
3	Analytik der fluoreszenzmarkierten Verbindungen.....	44
3.1	Allgemeines zur Fluoreszenz	44
3.1.1	Strukturelle Voraussetzungen für Fluoreszenz	45
3.2	Fluoreszenzmarkierte ER-Liganden.....	45
3.2.1	Einsatzmöglichkeiten.....	45
3.2.2	Voraussetzungen.....	47
3.2.3	Fluoreszenzmarkierungsmethoden.....	47
3.2.3.1	Konjugate	48
3.2.3.2	Inhärent fluoreszierende Liganden	49
3.2.3.3	Photofluorogene Verbindungen.....	51
3.2.4	Auswahl einer geeigneten Fluoreszenzmarkierungsmethode	52
3.3	Fluoreszenzmarkierung der Triarylalkene.....	53
3.3.1	UV-Spektren	55
3.3.2	Fluoreszenzspektren	58
3.3.3	Zusammenfassung	62
4	Biochemische und pharmakologische Untersuchungen	64
4.1	Bestimmung der relativen Bindungsaffinität zum ER (RBA-Wert)....	64
4.2	Testung der agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung auf molekularer Ebene im Luciferase-Assay.....	65

4.2.1	Allgemeines.....	65
4.2.2	Ermittlung der agonistischen Wirkung im Luciferase-Assay.....	68
4.2.3	Ermittlung der antagonistischen Wirkung im Luciferase-Assay.....	71
4.3	<i>In vitro</i>-Zytotoxizitätstest.....	71
4.3.1	Der Kristallviolett-Assay	72
4.3.2	Die MCF-7-Zelllinie	75
4.3.3	Die MDA-MB-231-Zelllinie.....	76
5	Testergebnisse	78
5.1	Allgemeines	78
5.2	Ergebnisse der <i>in vitro</i>-Untersuchungen.....	79
5.2.1	Pharmakologische Eigenschaften der Leitstrukturen	79
5.2.2	1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkene und deren O-Methylether	81
5.2.2.1	Relative Bindungsaffinität zum ER.....	81
5.2.2.2	Agonistische Wirkung.....	82
5.2.2.3	Antagonistische Wirkung.....	82
5.2.2.4	Ergebnisse der Zytotoxizitätstest an der MCF-7-Zelllinie	83
5.2.3	1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene und deren O-Methylether	85
5.2.3.1	Relative Bindungsaffinität zum ER	85
5.2.3.2	Agonistische Wirkung.....	86
5.2.3.3	Antagonistische Wirkung.....	87
5.2.3.4	Ergebnisse der Zytotoxizitätstest an der MCF-7-Zelllinie	88
5.2.4	1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-(3-fluor-4-hydroxyphenyl)alkene und deren O-Methylether	90
5.2.4.1	Relative Bindungsaffinität zum ER	90
5.2.4.2	Agonistische Wirkung.....	90
5.2.4.3	Antagonistische Wirkung.....	91
5.2.5	Seitenkettensubstituierte Triarylalkene	92
5.2.5.1	Relative Bindungsaffinität zum ER	92
5.2.5.2	Agonistische Wirkung.....	93

5.2.5.3	Antagonistische Wirkung	94
5.2.5.4	Ergebnisse der Zytotoxizitätstests an der MCF-7-Zelllinie.....	95
5.2.5.5	Ergebnisse der Zytotoxizitätstests an der MDA-MB-231-Zelllinie	99
5.2.6	Fluoreszenzmarkierte Verbindungen und ihre Vorstufen.....	100
5.2.6.1	Relative Bindungsaffinität zum ER	100
5.2.6.2	Agonistische Wirkung	100
5.2.6.3	Antagonistische Wirkung	101
5.3	Zusammenfassung der Testergebnisse	102
5.3.1	C2-alkylsubstituierte Triarylalkene	102
5.3.2	Seitenkettensubstituierte Triarylalkene	105
5.3.3	Fluoreszenzmarkierte Verbindungen und ihre Vorstufen.....	107
6	Diskussion der Testergebnisse.....	109
6.1.1	Wechselwirkung von E2 mit der LBD des ER.....	111
6.1.2	Nicht-steroidale Agonisten.....	113
6.1.3	Antagonistische Wirkung	114
6.1.3.1	„Aktiver“ Antagonismus.....	114
6.1.3.2	„Reiner“ Antagonismus.....	116
6.1.3.3	„Passiver“ Antagonismus.....	119
6.1.4	Triarylalkene ohne basische Seitenkette - passive Antagonisten ?	123
6.1.5	Ergebnisse der Zytotoxizitätstests	125
6.1.6	Untersuchung der fluoreszenzmarkierten Verbindungen.....	129
7	Zusammenfassung und Ausblick	134
8	Experimenteller Teil.....	138
8.1	Allgemeine Angaben	138
8.1.1	Synthetischer und analytischer Teil	138
8.1.1.1	Chemikalien.....	138
8.1.1.2	Verwendete Geräte	138

8.1.2	Biochemischer und pharmakologischer Teil.....	139
8.1.2.1	Biologisches Material	139
8.1.2.2	Verwendete Geräte	140
8.1.2.3	Verbrauchsmaterialien	141
8.1.2.4	Chemikalien und Lösungen.....	142
8.1.2.5	Zellkulturmedien.....	143
8.2	Synthesevorschriften - Analytische Daten	145
8.2.1	Synthese der Ethanone.....	145
8.2.2	Alkylierung der Ethanone	147
8.2.3	Synthese der Triarylalkene	157
8.2.4	Hydrolyse der Nitrilfunktion zur Säure.....	170
8.2.5	Reduktion der Nitrilfunktion zum Amin	171
8.2.6	Abspaltung der Methylschutzgruppe	173
8.2.7	Veresterung der Amine	184
8.2.8	Synthese der hydroxysubstituierten Amide	187
8.2.9	Synthese der fluoreszenzmarkierten Verbindungen.....	189
8.2.9.1	Fluoreszenzmarkierung an der C2-Seitenkette.....	189
8.2.9.2	Fluoreszenzmarkierung am Triarylalken-Grundgerüst	194
8.3	Biochemischer Teil, <i>in vitro</i>-Modelle	199
8.3.1	Estrogenrezeptoraffinitätsbestimmung.....	199
8.3.1.1	Bereitung des Zytosols aus biologischem Material	199
8.3.1.2	Bestimmung des RBA-Werts	199
8.3.2	Allgemeine zellbiologische Arbeitsmethoden	201
8.3.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	201
8.3.2.2	Passagieren der Zellen	201
8.3.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	201
8.3.2.4	Zellzahlbestimmung	202
8.3.2.5	ct - FCS.....	202
8.3.3	Testung auf agonistische Wirkung (Luciferase-Assay)	203
8.3.3.1	Zellkultur	203

8.3.3.2	Anzucht der Zellen vor einem Test	203
8.3.3.3	Aussaat der Zellen.....	203
8.3.3.4	Substanzzugabe	204
8.3.3.5	Zellernte und Zellyse	204
8.3.3.6	Messung der Luminiszens	204
8.3.3.7	Bestimmung des Proteingehalts der Zellen	205
8.3.3.8	Auswertung.....	206
8.3.3.9	Testung auf antagonistische Wirkung.....	206
8.3.4	Zytotoxizitätstests	206
8.3.4.1	Aussaat der Zellen.....	207
8.3.4.2	Substanzzugabe.....	207
8.3.4.3	Messpunktnahme (Abstoppen).....	208
8.3.4.4	Bestimmung der Zellmasse im Kristallviolett-Assay (Anfärben).....	208
9	Anhang.....	210
9.1	Zeit-Wirkungs-Kurven der Zytotoxizitätstest	210
9.1.1	Zeit-Wirkungs-Kurven der Tests an der MCF-7-Zelllinie.....	210
9.1.2	Zeit-Wirkungs-Kurven der Zytotoxizitätstests an der MDA-MB-231-Zelllinie	221
9.2	Ergebnisse der Testung auf antagonistische Wirkung im Luciferase- Assay (Konzentrations-Aktivierungs-Kurven)	223
10	Literaturverzeichnis.....	232

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
abs.	wasserfreies Lösungsmittel
AF-1	Aktivierungsfunktion 1 der Estrogenrezeptoren
AF-2	Aktivierungsfunktion 2 der Estrogenrezeptoren
ATCC	American Type culture Collection
ber.	berechnet
BHT	2,6-Di- <i>tert.</i> -butyl-4-methoxyphenol
BSA	Bovines Serumalbumin
Bz	Benzyl-
CAT	Chloramphenicol- Acetyl - Transferase
CBP	cAMP response element binding protein binding protein
CREB	cAMP response element binding protein
ct-FCS	Charcoal treated FCS
d	Tag
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	Dicyclohexylharnstoff
DES	Diethylstilbestrol
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
E2	Estradiol
EMEM	Eagle´s Minimum essential Medium
ER	Estrogen Rezeptor
ER α	Estrogen Rezeptor α
ER β	Estrogen Rezeptor β
ERE	Estrogen response element
FCS	Fetal Calf Serum
FKS	Fluoreszenz - Korrelations - Spektroskopie
gef.	gefunden
h	Stunden
Ko β Bu	Kaliumtertiärbutanolat
LBD	Ligandenbindungsdomäne
Lsg.	Lösung
min	Minuten
NCor	Nuclear receptor Corepressor
NLS	Nuclear localizing signal
PBS	Phosphate buffered saline
Ph	Phenyl-
Phth	Phthalimidyl-
RAL	Raloxifen
Rho	Rhodaminyl-

RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
SERM	Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator
SHR	Steroidhormonrezeptor
SRC-1/3	steroid receptor coactivator 1/3
TAF	TBP associated factors
TAM	Tamoxifen
TATA	Basensequenz TATAAA innerhalb des Promoters von Genen
TBAHSO ₄	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TBP	TATA-box binding protein
TFII	Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase II