

SYNTHESE, PHARMAKOLOGISCHE TESTUNG UND
STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN SUBSTITUIERTER TRIARYLPYRROLE MIT
ESTROGENEN UND CYTOTOXISCHEN EIGENSCHAFTEN

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

ANJA SCHÄFER
aus Bremen

Januar 2010

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2006 bis Dezember 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. Ronald Gust (Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin) angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Surmann

Disputation am 17.03.2010

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Ronald Gust,

dem ich für die Überlassung des interessanten und vielfältigen Themas sowie für die große Freiheit bei dessen Bearbeitung herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin:

Den Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises Prof. Gust, die mir durch ihre Bereitschaft zu wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Diskussionen eine große Hilfe waren, insbesondere Sandra Alscher, Ewelina Fogelström, Annegret Hille, Elena Mazzanti, Sandra Meieranz, María Proetto, Friederike Schwegler, Ana Scutaru, Maxi Wenzel, Dr. Kai Bochert, Dr. Matthias Goebel, Magnus Krüger und Gerhard Rubner;

Thomas Rudolf zusätzlich für das Korrekturlesen des experimentellen Teils;

Nora Reitner außerdem für ihre unermüdliche Energie und die Durchsicht der vorliegenden Arbeit;

Der Praktikumsgruppe um Dr. Barbara Grimm für die angenehme Zusammenarbeit;

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie: Eleonore Christmann-Österreich, Bettina Zeisig, Gudrun Rehork, Andreas Kannegießer und Jürgen Lindemann für die Aufnahme der Spektren;

Und Rasmus Kornrumpf für das Bereitstellen von Grundnahrungsmitteln.

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis.....	2
2 Theoretische Grundlagen.....	6
2.1 Brustkrebs.....	6
2.2 Die Estrogenrezeptoren - Aufbau und Genaktivierung.....	6
2.3 Selektive Estrogenrezeptormodulatoren.....	10
2.4 Moleküle mit heterocyclischer Kernstruktur als Liganden der Estrogenrezeptoren...	13
3 Problemstellung.....	18
4 Synthesen.....	22
4.1 Übersicht über die synthetisierten Verbindungen.....	22
4.2 Synthese der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)...	25
4.2.1 Herstellung von 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid.....	25
4.2.2 Friedel-Crafts-Acylierung mit 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid.....	25
4.2.3 Friedel-Crafts-Acylierung mit Alkanoylchloriden.....	28
4.2.4 α -Bromierung von Arylketonen.....	30
4.2.5 Synthese von 1,4-Diketonen aus α -Bromketonen und 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethanon.....	31
4.2.6 Ringschluß zu substituierten 2,3,5-Triaryl-1H-pyrrolen.....	32
4.2.7 Etherspaltung von methoxylierten 2,3,5-Triaryl-1H-pyrrolen.....	34
4.3 Synthese der 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B).....	36
4.3.1 Synthese von 1,3-Bis(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion.....	36
4.3.2 C-Alkylierung von 1,3-Bis(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion.....	37
4.3.3 Ringschluss von 1,3-Bis(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dionderivaten und Diethyl-2-aminomalonat zum jeweiligen Pyrrol-2-carbonsäureethylester.....	38
4.3.4 Esterverseifung und Decarboxylierung von 3,5-Diaryl- 1H-Pyrrol-2-carbonsäureethylestern.....	40
4.3.5 N-Arylierung von 3,5-Diaryl-1H-pyrrolen mit 4-Iodanisol.....	41
4.3.6 Etherspaltung von methoxylierten 1,2,4-Triaryl-1H-pyrrolen.....	43
4.4 Synthese der 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B).....	43
4.4.1 Synthese von N-Methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-N-methylacetamid.....	43
4.4.2 Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)pentan-2-on.....	44
4.4.3 Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)butan-1-on.....	45
4.4.4 α -Bromierung von Arylketonen.....	45
4.4.5 Synthese von 1,4-Diketonen aus α -Bromketonen und 1-(4-Methoxyphenyl)- pentan-2-on.....	45
4.4.6 Ringschluß von 1,4-Diketonen zu 3,5-Dialkyl-1,2,4-triaryl-1H-pyrrolen.....	46
4.4.7 Etherspaltung von methoxylierten 3,5-Dialkyl-1,2,4-triaryl-1H-pyrrolen.....	47
4.5 Synthese der 1,3,4-Triarylpyrrole (Typ C).....	47
4.5.1 Synthese von 3-(Dimethylamino)-1,2-bis(4-methoxyphenyl)-2-propen-1-on aus 1,2- Bis(4-methoxyphenyl)ethanon.....	47
4.5.2 Ringschluß von 3-(Dimethylamino)-1,2-bis(4-methoxyphenyl)-2-propen-1-on und Diethyl-2-aminomalonat zum Pyrrol-2-carbonsäureethylester.....	48
4.5.3 Esterverseifung und Decarboxylierung von 3,4-Diaryl-1H-pyrrol- 2-carbonsäureethylester.....	48
4.5.4 N-Arylierung von 3,4-Diaryl-1H-pyrrol mit 4-Iodanisol.....	49
4.5.5 Etherspaltung von methoxylierten 1,3,4-Triaryl-1H-pyrrolen.....	49
5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole... 	50
5.1 UV/Vis-spektrometrische Untersuchungen ausgesuchter Verbindungen.....	50

3 1 Inhaltsverzeichnis

5.2 Untersuchungen zur Stabilität und Reinheit mittels HPLC und MS.....	51
5.2.1 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A).....	52
5.2.2 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A).....	53
5.2.3 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B).....	55
5.2.4 5-Propyl-1,2,4-triarylpyrrol und 4-Propyl-2,3,5-triarylpyrrol.....	56
5.2.5 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B).....	57
5.2.6 Pyrrole - Reaktivität und Stabilität.....	59
5.2.6.1 Die Diels-Alder-Reaktion mit Pyrrolen.....	60
5.2.6.2 Singulett-Sauerstoff und Photosensitizer.....	62
5.2.7 Strukturaufklärung der Zerfallsprodukte.....	64
5.2.7.1 Mögliche Produkte der Reaktion zwischen Pyrrolen und Sauerstoff.....	64
5.2.7.2 LC-MS-Untersuchungen ausgewählter Verbindungen.....	67
5.2.7.3 Isolierte Zerfallsprodukte einer ausgewählten Verbindung.....	73
5.2.8 Beeinflussung der Stabilität durch Substituenten.....	77
5.3 Verhalten einer ausgewählten Verbindung gegenüber Singulett-Sauerstoff.....	80
5.4 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit.....	82
5.5 Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften.....	83
5.6 ¹H-NMR-Untersuchungen zur Drehbarkeit der Aromaten.....	84
6 Pharmakologie.....	90
6.1 Verwendete Zelllinien.....	90
6.2 Testung auf Hemmung der Zellproliferation.....	91
6.2.1 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B).....	92
6.2.2 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A).....	93
6.2.3 In den Aromaten fluorierte/ chlorierte 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A).....	94
6.2.4 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A).....	96
6.2.5 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B).....	97
6.2.6 1,3,4-Triarylpyrrole (Typ C).....	98
6.3 Bestimmung der estrogenen und antiestrogenen Wirkung.....	101
6.3.1 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B).....	102
6.3.2 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A).....	103
6.3.3 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B).....	104
6.3.4 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A).....	105
6.3.5 In o-Position der Aromaten Cl-substituierte 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A).....	106
6.3.6 In o-Position der Aromaten F-substituierte 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A).....	107
6.3.7 Coinkubation mit 4-Hydroxytamoxifen.....	109
6.3.8 Testung dreier Abbauprodukte einer ausgewählten Verbindung auf Estrogenität.....	111
6.4 Prostaglandin E₂-Assay: Hemmung der Cyclooxygenasen.....	113
7 Diskussion und Ausblick.....	116
7.1 Zusammenfassung.....	126
7.2 Summary.....	128
8 Experimenteller Teil.....	130
8.1 Synthesen.....	130
8.1.1 Verwendete Geräte und Chemikalien.....	130
8.1.2 Synthesevorschriften und analytische Daten.....	131
8.1.2.1 Synthese der 2,3,5-Triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A).....	131
8.1.2.2 Synthese der 1,2,4-Triarylpyrrole (Typ B).....	150
8.1.2.3 Synthese der 1,2,4-Triaryl-3,5-dialkylpyrrole (Typ B).....	158
8.1.2.4 Synthese der 1,3,4-Triarylpyrrole (Typ C).....	163
8.2 Biochemische und pharmakologische Methoden.....	165
8.2.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien.....	165
8.2.2 Allgemeine Kultivierungsbedingungen.....	166
8.2.2.1 Passagieren und Mediumwechsel.....	166
8.2.3 Testung auf Hemmung der Zellproliferation.....	167

8.2.3.1 Aussaat der Zellen.....	167
8.2.3.2 Substanzzugabe.....	167
8.2.3.3 Abstoppen des Zelltests.....	168
8.2.3.4 Färben und Auswertung.....	168
8.2.4 Luciferaseassay für Estrogenität und Antiestrogenität.....	169
8.2.4.1 Kultivierung und Aussaat der Zellen.....	169
8.2.4.2 Substanzzugabe.....	169
8.2.4.3 Abstoppen des Zelltests.....	170
8.2.4.4 Auswertung.....	170
8.2.5 Testung auf Hemmung der Cyclooxygenase.....	170
8.3 HPLC-Methode zur Untersuchung der Stabilität.....	171
8.3.1 HPLC-System.....	171
8.3.2 Geräte zur Inkubation der Proben.....	171
8.3.3 Mobile Phase.....	171
8.3.4 Versuchsbedingungen.....	171
8.3.5 LC-MS.....	171
8.4 UV/Vis-Messungen und Bestimmung der Sättigungslöslichkeit.....	172
9 Anhang.....	174
9.1 Diagramme des zeitabhängigen Cytotoxizitätstests.....	174
9.2 Abkürzungen.....	179
9.3 Lebenslauf.....	181
9.4 Wissenschaftliche Beiträge.....	182
9.5 Quellen.....	182

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Brustkrebs

Brustkrebs ist mit einem Anteil von 27,8 % der Erkrankungen die häufigste Tumorart bei Frauen. Es sterben in Deutschland jedes Jahr etwa 17.000 Frauen daran, obwohl die Mortalität seit Mitte der 90er Jahre leicht sinkt¹. Jedes Jahr tritt Brustkrebs in Deutschland bei 57.000 Frauen neu auf. Das Risiko, am Mammacarcinom zu erkranken, steigt unter anderem mit höherem Lebensalter, Übergewicht und früher Menarche; es ist aber auch erhöht, wenn bereits eine Verwandte an Brustkrebs erkrankt ist²⁻⁴. Mittlerweile wird Brustkrebs allerdings auch bei jüngeren Frauen immer häufiger entdeckt, wobei dies nicht an einer tatsächlichen Erhöhung der Inzidenz liegen muss, sondern auch durch den breiten Einsatz von Mammographiescreenings bedingt sein kann^{5, 6}.

Allgemein kann das Mammacarcinom durch Bestrahlung, Chemotherapie und Operation therapiert werden. Bei Estrogenabhängigkeit des Tumorwachstums kann mit selektiven Estrogenrezeptor-modulatoren (SERMs, siehe unten), Antiestrogenen oder Aromataseinhibitoren gegen ihn vorgegangen werden. Letztere unterdrücken die Synthese des natürlichen Estrogens 17 β -Estradiol (E2).

Etwa zwei Drittel der Brusttumoren sind Estrogenrezeptor (ER) positiv⁷. Diese Tumorzellen werden durch Estrogene in ihrer Proliferation angeregt. Von diesen ER-positiven Tumoren sprechen jedoch nur 55 % auf eine endokrine Therapie an (siehe unten)⁸, wobei dieser Wert sich auf 70 % erhöht, wenn der Tumor ER und Progesteronrezeptor (PR) positiv ist⁹. Daher ist eine Verbesserung der endokrinen Therapie nach wie vor Gegenstand der Forschung.

2.2 Die Estrogenrezeptoren - Aufbau und Genaktivierung

Die ER sind ligandeninduzierbare, zur Superfamilie der nucleären Hormonrezeptoren gehörende Transkriptionsfaktoren¹⁰. Die Aktivierung oder Inhibierung dieser Rezeptoren beeinflusst Wachstum, Differenzierung und die physiologische Funktion vieler Gewebe, darunter natürlich die Fortpflanzungsorgane¹¹ aber auch Knochen¹², Leber¹³ und das kardiovaskuläre System^{14, 15}.

Ein Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und Estrogenen wurde schon früh vermutet, jedoch erst 1962 schrieb Jensen die gewebe selektiven Wirkungen des E2 der Interaktion desselben mit einem spezifischen Rezeptor zu¹⁶ (Strukturformel von E2 siehe Abbildung 2.2, dort ist auch die Bezeichnung des Ringsystems und die Nummerierung der Hydroxygruppen angegeben). Dieser Rezeptor wurde in den 1980er Jahren durch Green sequenziert und bekam später den Namen ER α ¹⁷, denn 10 Jahre danach gelang es Kuiper in Rattenprostata einen weiteren ER nachzuweisen und zu sequenzieren, welchen man dann zur Unterscheidung ER β nannte^{18, 19}. Von den ER existieren jeweils mehrere Splicingvarianten unterschiedlicher

7 2 Theoretische Grundlagen

Aminosäureanzahl. ER β ist allerdings keine solche, denn das Gen, welches für ihn codiert, liegt auf Chromosom 14²⁰, während sich das für ER α auf Chromosom 6 befindet²¹. Der ER β wurde ursprünglich in Ratten entdeckt. Dieser Ratten-ER β hat eine Länge von 485 Aminosäuren¹⁸. Im Menschen fand man zuerst einen ER β mit 477 Aminosäuren¹⁹, später entdeckte man die in Bezug auf die Transaktivierung 2-3fach aktivere Form²² mit 530 Aminosäuren²³, welche auch die häufigste Splicevariante darstellt.

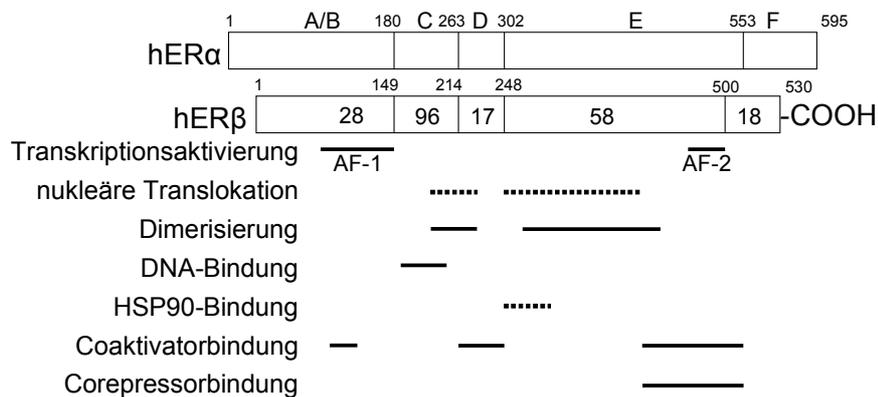


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Domänen A-F; Prozentsatz der Homologie zwischen ER α und ER β (nach²³⁻²⁵) ist im ER β -Schema gekennzeichnet. Über dem jeweiligen Rezeptorschema ist die Nummerierung der Aminosäuren angegeben.

Normalerweise besitzen nucleäre Rezeptoren sechs Regionen (A-F, Abbildung 2.1)²⁵. Die Region A/B ist nicht sehr stark konserviert. In ihr befindet sich die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion 1 (AF-1). Bei ER β ist die AF-1 nur sehr schwach funktionsfähig²⁶. Aus Abbildung 2.1 ist ersichtlich, dass die beiden am stärksten konservierten Regionen die Regionen C und E sind. Die Region C enthält die DNA-Bindungsdomäne (DBD)²⁷ und ist für die Dimerisierung des Rezeptors verantwortlich²⁵. Weiter *downstream* befindet sich die Region D („*hinge region*“). Sie ist wenig charakterisiert und erlaubt dem Rezeptor, sich an dieser Stelle zu knicken. Wird sie verändert, beeinträchtigt dies die Funktion des Rezeptors nicht²⁸. Die Aufgaben von Region E sind komplex. Sie ist zuständig für Dimerisierung, nucleäre Lokalisation, Transaktivierung und enthält die Ligandenbindungsdomäne²⁷(LBD). Sind keine Liganden gebunden, liegt der Rezeptor unter anderem an ein Hitze-Schock-Protein (HSP 90) assoziiert vor²⁹. Dieses bindet ebenfalls in Region E. In dieser Region liegt eine zweite Aktivierungsfunktion (AF-2), sie ist hormonabhängig. Für die viele Vorgänge sind beide synergistisch funktionierenden Aktivierungsfunktionen nötig. Region F beeinflusst die Antagonist/Agonist-Aktivität von Antiestrogenen^{28, 30}.

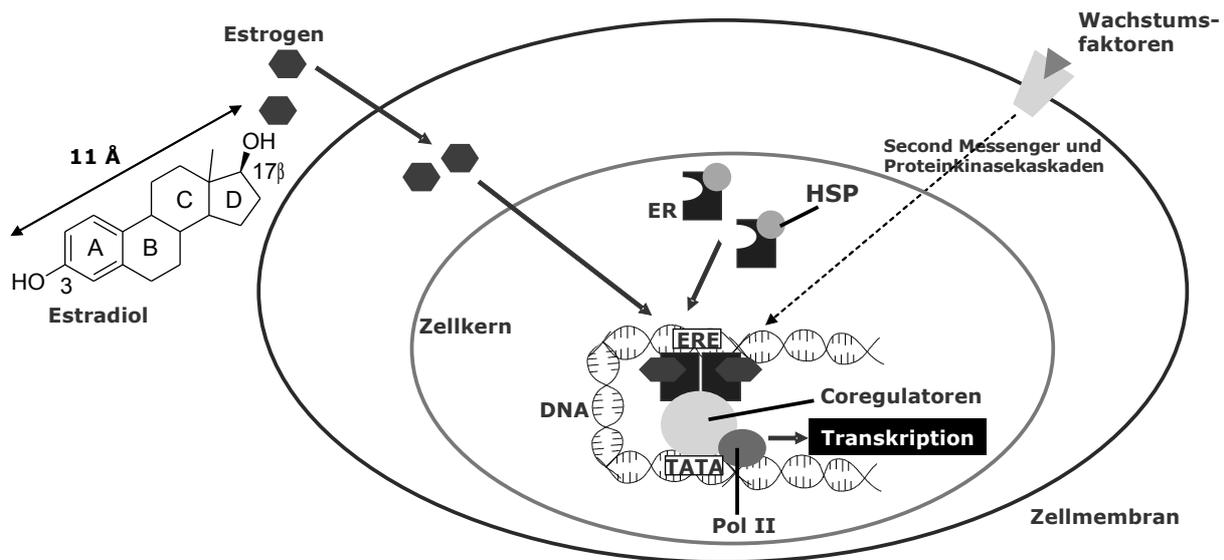


Abbildung 2.2: Links: Strukturformel des natürlichen Liganden Estradiol (E2). Rechts: Modell der Transkriptionsaktivierung, vereinfacht nach Katzenellenbogen^{25, 31}. ERE: *estrogen response element*; HSP: Hitzeschockprotein; ER: Estrogenrezeptor; DNA: *deoxyribonucleic acid*; TATA: TATA-Box; Pol II: RNA Polymerase II. Die DNA wird zur Ablesung C-förmig gebogen.

Wird ein Ligand gebunden, werden die verschiedenen Hitzeschockproteine (70 und 90) abgespalten. Hierdurch verändert der Rezeptor seine Form und dimerisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Homodimere aus ER α / ER β als auch Heterodimere aus je einem ER α und einem ER β bilden, welche ebenfalls in der Lage sind, Transkription auszulösen, wobei Homodimere aus ER β die geringste Aktivität aufweisen^{23, 32}. Der ER hält sich auch ohne Ligand hauptsächlich im Zellkern auf³³. Nach Andocken des Liganden bindet der Ligand-Rezeptor-Komplex an die DNA, an sogenannte *estrogen response elements* (ERE, Abbildung 2.2). ERE haben die palindromische Struktur 5'-GGTCAnnnTGACC-3', wobei n eine beliebige DNA-Base darstellt³⁴. 25 bis 30 Basenpaare vor dem ERE befindet sich die TATA-Box (TATA wegen des Thymin und Adenin-Motivs), hier binden verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF)³⁵. An diesen Komplex und am ER an Region D und E binden die sogenannten Coregulatoren (Erläuterung siehe unten). Dieser Präinitiationskomplex sorgt nun für die Ablesung der DNA mittels RNA-Polymerase II. Dies ist der „klassische“ Weg der Signaltransduktion.

Daneben kann der ER allerdings auch zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren, beispielsweise dem *specificity protein 1* (sp-1), sogenanntes *tethering* betreiben. Dabei bindet der ER selbst nicht direkt an die DNA, sondern an ein jeweils weiteres Protein. Dadurch kann z.B. die Ablesung von Genen für *transforming growth factor α* (TG α) induziert werden³⁶. Beim *tethering* können sich E2- und SERM-gebundene ER unterschiedlich verhalten³⁷.

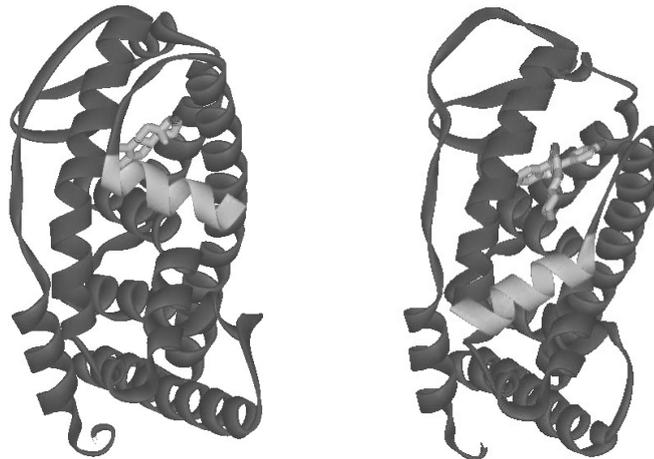


Abbildung 2.3: Links: Bindung von E2 in der LBD eines ER α -Monomers, Helix 12 (H12) hellgrau dargestellt. Rechts: Andere Positionierung von H12 bei Bindung von RAL. Nach: Brzozowski et al³⁸.

Welche Gene abgelesen werden, ist von diversen Faktoren abhängig: Verschiedene Liganden können zu unterschiedlichen Konformationen des Rezeptors führen (Abbildung 2.3). Bindet der natürliche Agonist E2, kommt es zu einem Verschließen der Bindungstasche durch Helix 12 (H12)³⁸. Bei Bindung der SERMs Raloxifen (RAL) oder Tamoxifen (TAM) (siehe weiter unten) kann H12 die Bindungstasche nicht verschließen, sondern wird verschoben (Abbildung 2.3). Dadurch kann sich die AF-2 nicht ausbilden, so dass keine Interaktion mehr zwischen ihr und bestimmten Coregulatoren stattfinden kann. Da Coaktivatoren so schlechter rekrutiert werden können, haben die Verbindungen hauptsächlich antiestrogene, aber teilweise auch estrogenen Eigenschaften. Außerdem gibt es noch reine Antagonisten, wie z.B. Fulvestrant (ICI 182 780), welche die Struktur des ER sehr stark verändern, woraufhin er einem schnellen Abbau unterliegt³⁹. Daher nennt man diese Antagonisten auch SERDs (selektive ER *down*-Regulatoren). E2 führt zwar ebenfalls zu einer *down*-Regulation von ER-Protein⁴⁰, diese tritt jedoch erst nach längerer Exposition auf. Im Gegensatz zum einfachen Modell der Signalauslösung: Ligand + Rezeptor → Effekt handelt es sich bei den ER um Rezeptoren mit „dreiteiliger“ Rezeptorpharmakologie. Zusätzlich zu Rezeptor (ER α oder β , Splicingvariante) und Ligand ((partieller) Agonist, Antagonist, SERM) sind noch verschiedene Coaktivatoren und Corepressoren nötig, mit welchen die je nach Gewebe unterschiedlichen Wirkungen ausgelöst werden⁴¹. Durch ihre An- oder Abwesenheit in der entsprechenden Zelle können sie die Zellantwort auf den Liganden stark beeinflussen. Wichtige Coregulatoren sind beispielsweise SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*) oder N-CoR (*nuclear receptor corepressor*)⁴². Bei vielen Coaktivatoren, z.B. auch bei SRC-1, handelt es sich um Histonacetylasen. Die DNA ist sehr kompakt um Histone gewunden. Durch Acetylierung der Histone wird dieser feste Zusammenhalt abgeschwächt und die DNA lässt sich leichter ablesen. Auf diesem Weg führen die Coaktivatoren zu einer Verstärkung der DNA-Ablesung⁴³. Die meisten Coregulatoren binden am ER an die AF-2⁴⁴.

Bindet ein Agonist an ER α , werden beispielsweise über Expressierung von TGF α das Wachstum und Zellteilung angeregt⁴⁵. Ebenfalls beeinflusst der ER die Expressierung des PR^{46, 47}. Diese Kommunikation und Beeinflussung verschiedener Signalwege untereinander wird als *crosstalk* bezeichnet.

Die beiden ER-Subtypen weisen eine unterschiedliche Verteilung in den jeweiligen Geweben auf^{48, 49} (Abbildung 2.4). Da sie jeweils die Expressierung voneinander modulieren, spricht man von einer „ying-yang-Beziehung“ der Rezeptoren⁵⁰. Des Weiteren beeinflusst der natürliche Ligand E2 die Proteinsynthese verschiedenartig in unterschiedlichen Geweben⁵¹, was zum Teil auf die Coregulatorrekrutierung zurückzuführen ist. In gesundem Brustgewebe ist die Expressierung von ER β normalerweise höher als jene von ER α ⁵². Interessanterweise ist dieses Gleichgewicht bei vielen Brusttumoren gestört: Die Expressierung von ER α wird hochreguliert und/oder die von ER β herunterreguliert oder es kommt sogar zu einem völligen Verlust von ER β ⁵³. Werden ER negative-Brustkrebszellen mit ER β transfiziert, zeigen sie eine deutlich schwächere Proliferation⁵⁴. Es wird vermutet, dass ER β eine kontrollierende Wirkung auf den proliferationsvermittelnden ER α ausübt. Es soll nur erwähnt werden, dass es auch eine membranständige Form des ER gibt, bei der diskutiert wird, ob sie Ursache für die beobachteten nichtgenomischen Effekte ist, welche innerhalb von Minuten auftreten können^{55, 56}.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mechanismen, durch welche Liganden des ER wirken, ungeheuer komplex sind, und dass das heutige Modell wahrscheinlich der Realität noch immer nicht gerecht wird.

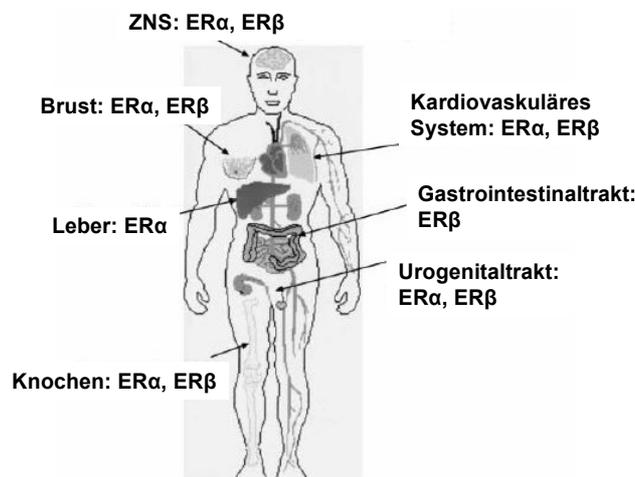


Abbildung 2.4: Verteilung der ER-Subtypen im menschlichen Gewebe nach Gustafsson⁴⁹

2.3 Selektive Estrogenrezeptormodulatoren

In den frühen 70er Jahren wurde der nicht steroidale SERM Tamoxifen (TAM, Abbildung 2.5) in die Therapie des Mammacarcinoms eingeführt^{57, 58}. Dieser wird noch immer sehr häufig angewandt

11 2 Theoretische Grundlagen

und reduziert nach einer Übersicht über die vorhandenen Studien die jährliche durch Brustkrebs verursachte Todesrate um 31 %⁵⁹. Bei TAM handelt es sich um ein Triphenylethylen mit basischer Seitenkette, welches die Estrogenwirkung im Brustgewebe kompetitiv inhibiert⁶⁰. 1977 fand Jordan heraus, dass nicht so sehr TAM selbst, sondern vor allem sein Metabolit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT, etwa 50mal stärkere Transaktivierung als TAM⁶¹, Abbildung 2.5) die Effekte hervorruft⁶². Allerdings verhält sich TAM im Endometriumgewebe wie ein Agonist und erhöht so die Inzidenz von Endometriumkarzinomen⁶³. Zudem entwickeln viele Patienten eine Resistenz⁶⁴.

Es wurde vermutet, dass die N-Methylgruppen an der basischen Seitenkette zu Formaldehyd abgebaut werden, was zu Tumoren führen könnte. Daher wurden statt Methylgruppen Pyrrolidin- oder andere Ringe verwendet⁶⁵.

Außerdem hatte sich in Tierversuchen mit Ratten eine Leberkrebserhöhung durch DNA-Adduktbildung unter anderem mit dem Metaboliten α -Hydroxytamoxifen gezeigt^{66, 67}. Die Bildung dieses Metaboliten sollte verhindert werden, indem man die Ethylkette des TAM mit dem nebenstehenden Aromaten zu einem Ring schloss (Abbildung 2.5). Jedoch stellte sich diese Vermutung als nicht zutreffend heraus. Zum einen entstehen in Ratten dennoch DNA-Addukte⁶⁸, zum anderen entstehen diese im Menschen gar nicht⁶⁹.

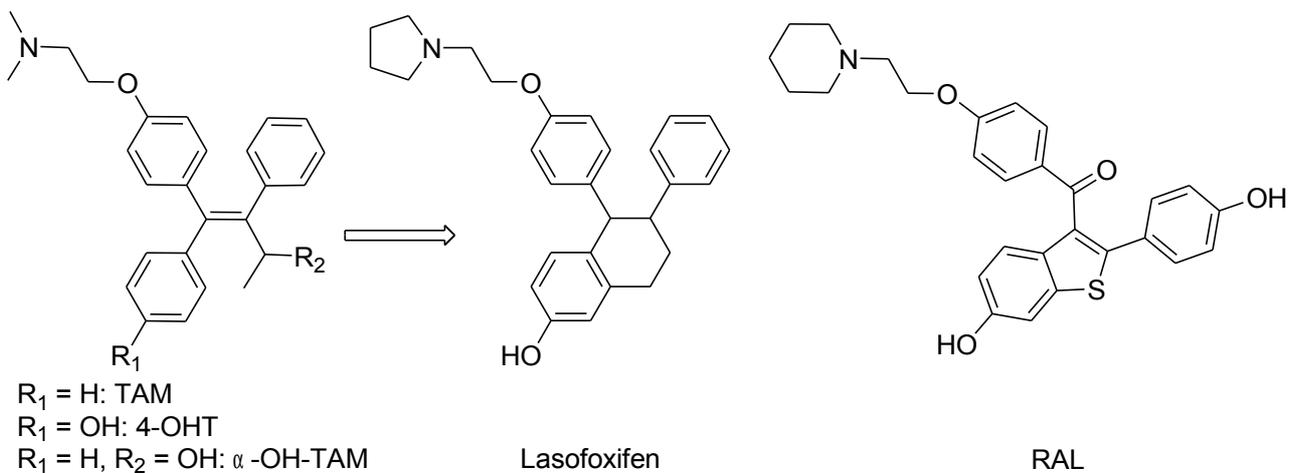


Abbildung 2.5: Liganden des ER: TAM: Tamoxifen, das erste SERM, 4-OHT: 4-Hydroxytamoxifen, der aktive Metabolit des TAM, α -OH-TAM: α -Hydroxytamoxifen: Metabolit, welcher in Ratten DNA-Addukte bildet, daneben das in der Z-Form fixierte Lasofoxifen (Beispiel); RAL: das SERM Raloxifen

Die TAM-Derivate sind ebenfalls am ER wirksam. Um ihre Eigenschaften zu modifizieren, veränderte man sowohl „offenkettige“ als auch Derivate mit geschlossenem Cyclus, in welchen zusätzlich Heteroatome eingeführt wurden, weiter.

1984 wurde ein SERM mit einem Heterocyclus (Benzothiophen) als zentraler Struktur synthetisiert^{70, 71}. Diese Substanz, später Raloxifen (RAL, Abbildung 2.5) genannt, fand zunächst in der Therapie der Osteoporose Verwendung^{72, 73} und ist neben TAM das zweite wichtige SERM. Seit 2007 kann es auch zur Brustkrebsprävention bei Frauen mit hohem Brustkrebsrisiko oder

Osteoporose eingesetzt werden⁷⁴. Raloxifen hat weniger uterotrophe Effekte als TAM⁷². RAL und TAM liegen anders in der Bindungstasche des ER als E2. Alle drei Liganden bilden Wasserstoffbrücken zwischen einer OH-Gruppe mit Glutaminsäure (Glu) 353, Arginin (Arg) 394 und einem strukturell konservierten Wassermolekül aus (Nummerierung der Aminosäuren nach ER α). Die zweite OH-Gruppe von RAL oder E2 interagiert jeweils mit Histamin (His) 524. Zusätzlich reicht die basische Seitenkette von RAL oder TAM in einen Seitenkanal der Bindungstasche und bildet Wasserstoffbrücken mit Asparaginsäure (Asp) 351 aus³⁸ (Abbildung 2.6, dargestellt ist RAL im Vergleich zu E2). Für die Interaktion mit beiden polaren Aminosäuren muss der O-O Abstand (wie bei E2 zwischen der 3- und 17 β -OH-Gruppe, siehe Abbildung 2.2) etwa 10,9-12,5 Ångström (Å) betragen⁷⁵. Interessanterweise wird RAL durch Ersatz der Asp 351 durch Tyrosin zu einem partiellen Agonisten des ER⁷⁶.

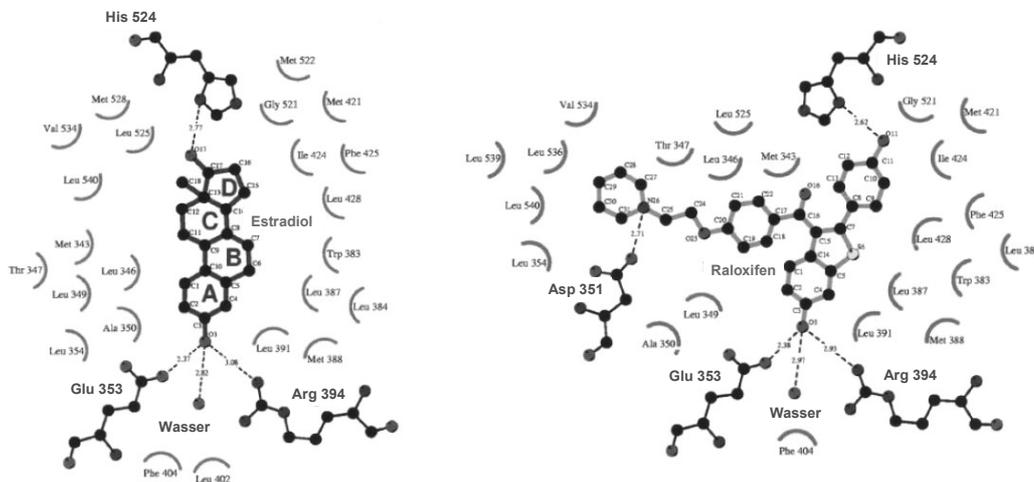


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung von E2 und RAL in der Ligandenbindungsdomäne von ER α nach Brzozowski³⁸. Sowohl E2 als auch RAL bilden Wasserstoffbrücken zwischen ihrer Hydroxyfunktion und Glutaminsäure (Glu) 353, Arginin (Arg) 394 und einem strukturell konservierten Wassermolekül aus. Die zweite OH-Gruppe interagiert jeweils mit Histamin (His) 524. Bei RAL reicht die basische Seitenkette in einen Seitenkanal der Bindungstasche und bildet Wasserstoffbrücken mit Asparaginsäure (Asp) 351 aus.

SERMs haben einige Vorteile: Ihre Nebenwirkungen sind, im Gegensatz zu klassischer Chemotherapie, relativ gering: neben der bereits erwähnten Resistenzentwicklung und dem vermehrten Auftreten von Endometriumcarinomen (bei TAM) handelt es sich hauptsächlich um „hot flashes“, aber auch erhöhte Thromboseneigung und erhöhte Inzidenz von Schlaganfällen. Sie können in der Prävention von Brustkrebs eingesetzt werden, verringern auch Osteoporose und damit verbundene Knochenbrüche⁷⁷.

SERMs verstärken die Produktion von wachstumshemmenden Faktoren wie z.B. *transforming growth factor β* (TGF- β). Sie unterdrücken die Wachstumsstimulation von *epidermal growth factor* (EGF)⁷⁸ und induzieren Apoptose. Außerdem stehen die vom SERM besetzten Rezeptoren nicht für Estrogene zur Verfügung. Das Binden von Estrogenen jedoch führt zum Ablesen von Wachstumsfaktorgenen, zur Stimulation der DNA-Synthese und letztlich zur Zellproliferation. So verhindern SERMs das (Krebs-) Zellwachstum und Metastasierung^{31, 79}.

13 2 Theoretische Grundlagen

Seit einiger Zeit wird TAM, zumindest beim postmenopausalen Mammacarcinom, immer mehr von den in Studien überlegenen Aromatasehemmern der dritten Generation (namentlich Anastrozol) verdrängt. Auch das 2004 für die Therapie des metastasierten Mammacarcinoms zugelassene Fulvestrant wird verstärkt eingesetzt, zumal es bei TAM-Resistenz noch wirkt^{80, 81}. Allerdings haben auch diese Nebenwirkungen: Aromatasehemmer verstärken den Knochenabbau sicher⁸², bei Fulvestrant gibt es Hinweise darauf aus Tierversuchen⁸³.

2.4 Moleküle mit heterocyclischer Kernstruktur als Liganden der Estrogenrezeptoren

Allgemein kann die estrogene Potenz einer Verbindung durch Angabe der halbmaximalen Wirkkonzentration angegeben werden (EC_{50} , siehe Kapitel 6.3 „Bestimmung der estrogenen Wirkung“). Die Fähigkeit einer Verbindung, E2 aus der Ligandenbindungstasche zu verdrängen, wird mit der RBA (*relative binding affinity*) angegeben. Die im folgenden vorgestellten Verbindungen werden durch diese beiden Werte charakterisiert, um sie miteinander vergleichen zu können. Ist kein Rezeptorsubtyp angegeben, wurde nicht überprüft, über welchen ER-Subtyp die jeweilige Verbindung wirkt.

Es wurden bereits einige substituierte Heterocyclen mit unterschiedlichen Affinitäten zum Estrogenrezeptor synthetisiert und getestet. Durch Modifikation sowohl der Heterocyclen als auch der Arylsubstituenten wurde versucht, $ER\alpha/ER\beta$ -selektive oder Substanzen mit ungewöhnlichem Bindungsmodus zu finden, um auf diesem Weg neue SERMs zu entwickeln. Durch geringe Änderungen an den Molekülen lassen sich Agonisten oder Antagonisten, Substanzen mit zum Teil starker Rezeptorsubtypselektivität oder aber auch Substanzen darstellen, welche kaum noch Wirkung an den Estrogenrezeptoren zeigen.

Auch nichtaromatische substituierte Heterocyclen können Liganden des ER sein, beispielsweise die sogenannten Pip-N-Et und Im-N-Et (Abbildung 2.7c bzw. d).

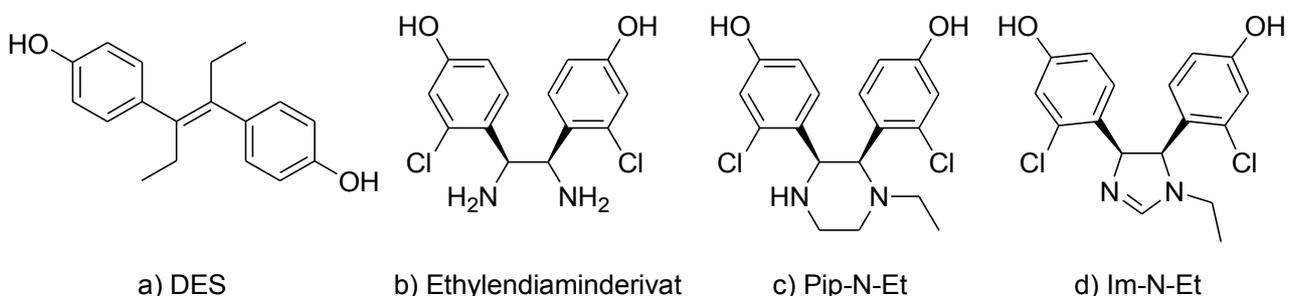


Abbildung 2.7: a) Diethylstilbestrol (DES), RBA: 400 %⁷⁵; b) 1,2-Diamino-1,2-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-ethan, EC_{50} : 1500 nmol/L, RBA: < 0,1 %⁸⁴; c) (2R,3S)/(2S,3R)-N-Ethyl-2,3-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-piperazin (Pip-N-Et), EC_{50} : 210 nmol/L⁸⁵ und RBA: 0,42 %⁸⁶; d) (4R,5S)/(4S,5R)-N-Ethyl-4,5-bis(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin (Im-N-Et): EC_{50} : 15 nmol/L⁸⁵, RBA: < 0,1 %⁸⁴. EC_{50} : siehe Kapitel 6.3.

Diese wurden über ein Ethylendiaminderivat (Abbildung 2.7b) durch Gust et al.⁸⁷ von Diethylstilbestrol (DES, Abbildung 2.7a), einem ER-Agonisten mit RBA = 400%⁷⁵, abgeleitet. Das Ethylendiaminderivat selbst ist ein sehr schwacher ER-Agonist (RBA <0,1 %, EC₅₀: 1500 nmol/L⁸⁴). Pip-N-Et hat einen O-O Abstand von 6,5-7,1 Å⁸⁸; Im-N-Et von ca. 5,1 Å⁸⁷. Die beiden Moleküle können aufgrund dieses OH-Gruppen-Abstandes nicht wie E2 mit den Aminosäuren Glu 353, Arg 394, H₂O (3-OH-Gruppe bei E2) und His 524 (17β-OH, siehe oben, als „Typ I-Estrogene“ bezeichnet) interagieren. Daher wurde ein zweiter Bindungsmodus am ER postuliert, bei welchem eine OH-Gruppe mit Glu 353, Arg 394 und H₂O, die andere hingegen in die gleiche Seitentasche wie TAM oder RAL eintaucht und entweder analog mit Asp 351⁸⁷ oder mit Threonin (Thr) 347⁸⁹ Wasserstoffbrücken ausbildet. Pip-N-Et zeigt eine RBA von 0,42 %, Im-N-Et von <0,1 %, allerdings lösen sie dennoch beide Genaktivierung aus (EC₅₀ 210 nmol/L bzw. 15 nmol/L). Es wurde vermutet, dass sie aufgrund ihres anderen Bindungsmodus („Typ II-Estrogene“) E2 schlecht aus der LBD verdrängen können und die RBA deswegen sehr niedrig sind.

Durch Alkylierung eines Stickstoffs und Chlorierung der Aromaten konnten sowohl die RBA als auch die EC₅₀ stark verbessert werden⁹⁰.

Verbindungen mit heteroaromatischer Kernstruktur können auch solche Typ II-Estrogene sein: Das ebenfalls zwei hydroxylierte Aromaten tragende N-Ethyl-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)imidazol (RBA = 1,26, EC₅₀ schwächer als 1000 nmol/L⁸⁸, Abbildung 2.8a) besitzt ein planares Ringsystem mit einem O-O Abstand von 8,8-8,9 Å⁸⁷ und kann daher ebenfalls nicht wie E2 oder DES mit der LBD interagieren.

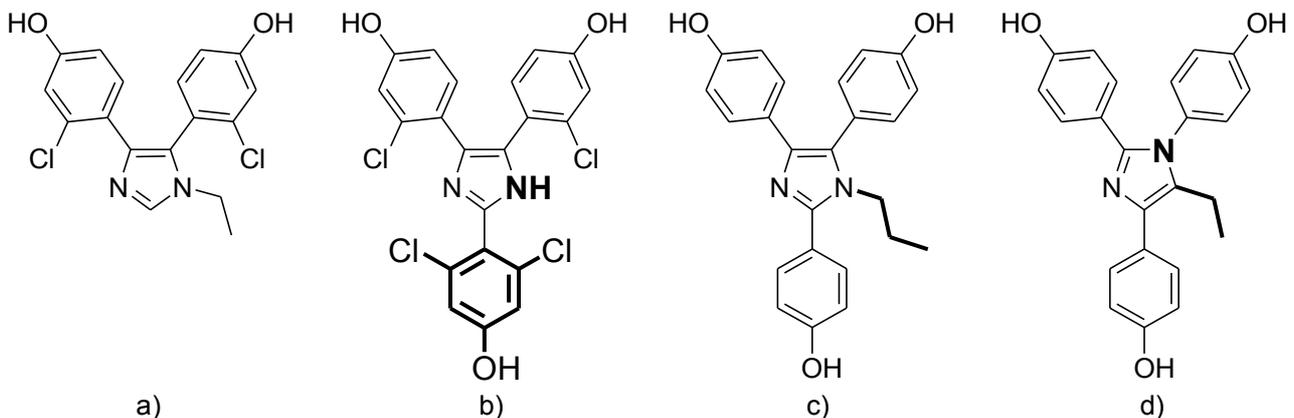


Abbildung 2.8: a) Diarylimidazol (RBA = 1,26, EC₅₀ > 1000 nmol/L⁸⁸), b) Triarylimidazol mit Chlor (RBA: 0,19 %, EC₅₀ > 1000 nmol/L⁹¹), c) Triarylimidazol mit Propylkette (RBA = 0,62 %⁹²), d) Triarylimidazol mit anderem Substitutionsmuster und Ethylkette (RBA = 0,11 %, EC₅₀ = 77 nmol/L⁹³). (Veränderungen zum vorigen Molekül jeweils fett)

Auch ein Triarylimidazol (Abbildung 2.8b) mit drei hydroxylierten Aromaten ist trotz Substitution mit Chlor ein sehr schwaches Estrogen (RBA: 0,19 %, EC₅₀ schwächer als 1000 nmol/L⁹¹). Fink führte bei einem analogen Triarylimidazol ohne Chlorsubstitution eine Propylkette in C1 ein und erhielt eine RBA von 0,62 %⁹²(Abbildung 2.8c).

15 2 Theoretische Grundlagen

Werden die Stickstoffe im Imidazolring verschoben, ergibt sich das in Abbildung 2.8d gezeigte Substitutionsmuster. Dieses Triarylimidazol hat eine RBA von 0,11 % und eine EC_{50} von 77 nmol/L⁹³. Insgesamt sind Imidazole also eher schwache Agonisten des ER.

Die Arbeitsgruppe um Katzenellenbogen hat um die Jahrtausendwende sehr viele arylsubstituierte heteroaromatische Verbindungen mit ER-Aktivität synthetisiert und getestet. Imidazole, Isoxazole und Thiazole zeigten eine schwache Bindungsaffinität zum ER, aber bestimmte Pyrazole, welche in ihrer räumlichen Ausrichtung eine große Ähnlichkeit zu Raloxifen besitzen, wiesen eine hohe Affinität zum ER auf⁹².

Einige substituierte Pyrazole besitzen $ER\alpha$ -Selektivität⁹⁴. Die hormonell aktivste Verbindung der Katzenellenbogen-Arbeitsgruppe, das sogenannte Propylpyrazoltriol (PPT, Abbildung 2.9c), band 410mal besser an $ER\alpha$ als an $ER\beta$ ⁹⁴. PPT hatte eine RBA von 49 % an $ER\alpha$.

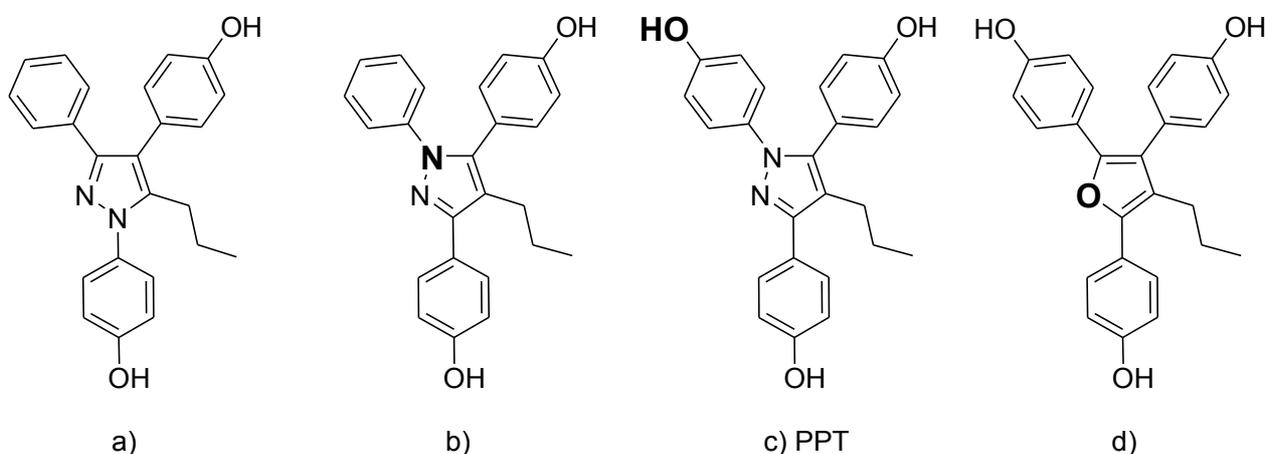


Abbildung 2.9: a) dihydroxyliertes Triarylpyrazol, RBA: 16 %⁹⁵; b) dihydroxyliertes Triarylpyrazol (fett markiert: veränderte Position des Stickstoffes), RBA: 25 %⁹⁵; c) sogenanntes Propylpyrazoltriol (PPT), RBA: 49 %⁹⁴; d) Triarylfuran, RBA 4 %⁹⁶

Es konnte festgestellt werden, dass immer die an allen drei Aromaten hydroxylierten Verbindungen die beste Aktivierung des ER zeigten (siehe Abbildung 2.9). Von den zwei möglichen Pyrazolisomeren hatten die jeweils nur dihydroxylierten Verbindungen RBAs von 16 % und 25 % (Abbildung 2.9a und b)⁹⁵.

Katzenellenbogen et al. synthetisierten ebenfalls Furane mit⁹⁷ und ohne basische Seitenkette⁹⁶. Diese zeigten jeweils antiestrogene („modifizierende“) und estrogene Effekte und wiesen ebenfalls eine Präferenz für $ER\alpha$ auf. An nur zwei Aromaten hydroxylierte Furane weisen teilweise Aktivität an $ER\beta$ auf⁹⁶. Das propylsubstituierte Triarylfuran bevorzugte $ER\alpha$ gegenüber $ER\beta$ 56fach und zeigte eine RBA von 4 % (Abbildung 2.9d). Substituierte Furane sind also schwächere Agonisten als Pyrazole, hingegen binden sie besser als Imidazole.

Insgesamt kann für die substituierten Heterocyclen folgendes Pharmakophor definiert werden (Abbildung 2.10)⁹²: Die heteroaromatische Kernstruktur trägt einen Phenolring, welcher den A-Ring von E2 (Bezeichnung der Ringe siehe Abbildung 2.2) imitiert. Üblicherweise gibt es einen zweiten

hydrophil substituierten Aromaten. Zwei weitere Substituenten, von welchen einer ebenfalls aromatisch sein kann, können vorhanden sein.

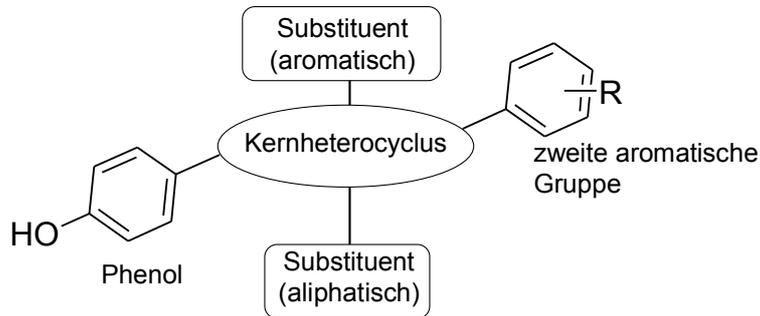


Abbildung 2.10: Pharmakophormodell für Liganden des ER mit heterocyclischer Kernstruktur⁹²

Es stellte sich die Frage, ob der zentrale Heteroaromat lediglich die Substituenten in einer für den ER günstigen Form präsentiert, oder ob er auf die Bindungsaffinität und die Transkriptionsaktivierung einen Einfluss hat. Durch systematischen Austausch des Heteroatoms kann dieser Frage nachgegangen werden.

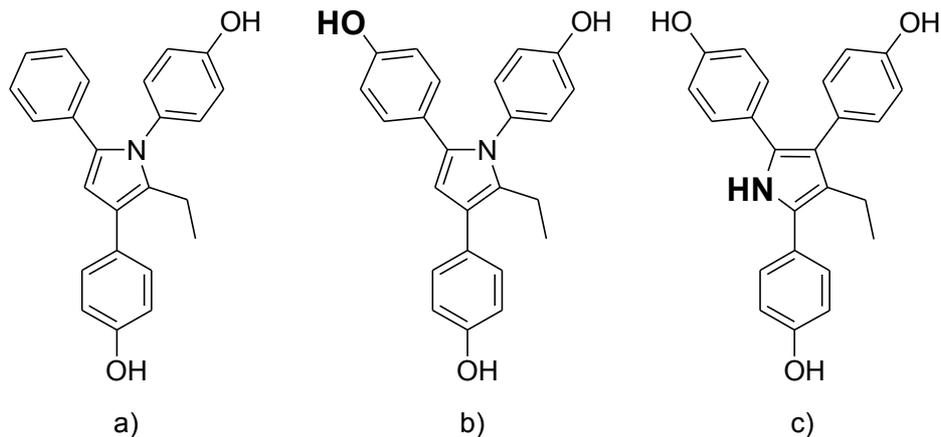


Abbildung 2.11: a) Von Katzenellenbogens Mitarbeitern synthetisiertes Pyrrrol mit einem RBA-Wert von 0,5 %⁹⁶; b) Hoffmann Typ 2: RBA: 0,02 %, EC₅₀: 25 nmol/L⁹⁸; c) Hoffmann Typ 1: RBA: 0,07 %, EC₅₀: 38 nmol/L⁹⁸.

Für ihre Veröffentlichung über die substituierten Furane hatten Katzenellenbogen et al. auch ein Pyrrrol synthetisiert⁹⁶ (Abbildung 2.11a). Dieses verfügte, verglichen mit den Furanen und Pyrazolen, über eine sehr niedrige Bindungsaffinität für den ER (0,5 %), obwohl es doch eine sehr große strukturelle Ähnlichkeit zu ihnen besaß.

Von Hoffmann⁹⁸ wurden daraufhin zwei Typen von Triarylpyrrolen synthetisiert und getestet. Ihre Rezeptorbindungsaffinität ist sehr schwach ausgeprägt (RBA = 0,02 bzw. 0,07 %), allerdings sind sie in der Lage, Transkriptionsaktivierung auszulösen (EC₅₀: 25 und 38 nmol/L; Abbildung 2.11b und c).

3 Problemstellung

Verschiedene substituierte Heterocyclen können Liganden des ER sein. Ausgehend von bereits in diesem Arbeitskreis synthetisierten Strukturen⁹⁸ soll nun eine weitere Optimierung stattfinden. Die Untersuchung der Eigenschaften von Triarylpyrrolen soll aus mehreren Gründen weiter verfolgt werden: Zum einen soll die Frage geklärt werden, warum Pyrazole soviel potentere Liganden als Imidazole sind. Durch Synthese von Pyrrolen, welche naturgemäß nur einen Stickstoff tragen, kann erforscht werden, welcher Stickstoff der Imidazole oder Pyrazole für diesen Unterschied verantwortlich sein könnte (siehe Abbildung 3.1). Zum anderen soll der Einfluß einer Positionsveränderung des Stickstoffs in Bezug auf die Substituenten auf die Lage des Moleküls in der Ligandenbindungsdomäne und als Konsequenz die Estrogenität, bestimmt werden. So kann die für den Rezeptor vorteilhafteste Positionierung ermittelt werden. Durch Vergleich der estrogenen Eigenschaften analog substituierter Triarylpyrrol-Verbindungen und Vergleiche mit den von Hoffmann synthetisierten Verbindungen können dann Rückschlüsse über den Einfluss des Charakters des Kernmoleküls auf das Bindungsverhalten am ER gezogen werden. Da Hoffmann zeigen konnte, dass ein unsubstituierter Stickstoff des Pyrrolrings ungünstig für die estrogenen Eigenschaften ist, sollen nur am Stickstoff substituierte Derivate synthetisiert werden.

Hoffmann konnte durch Chlorierung in den Aromaten (erhöhte Lipophilie) eine Kombination von Cytotoxizität und Estrogenität erreichen. Es könnte für eine Therapie von Vorteil sein, wenn die Substanzen toxisch wirken und sich in Zellen mit ER bevorzugt anreichern („*drug targeting*“). Daher wird dieser Ansatz weiter verfolgt und um fluorierte Moleküle erweitert.

Es soll der Einfluß der Pyrrole auf den Estrogenrezeptorgehalt untersucht werden. In diesem Zusammenhang könnte geklärt werden, ob die neuen Pyrrole ER α selektiv herunterregulieren und so das in Kapitel 2 erwähnte natürliche Gleichgewicht zwischen ER α und ER β wiederherstellen können.

19 3 Problemstellung

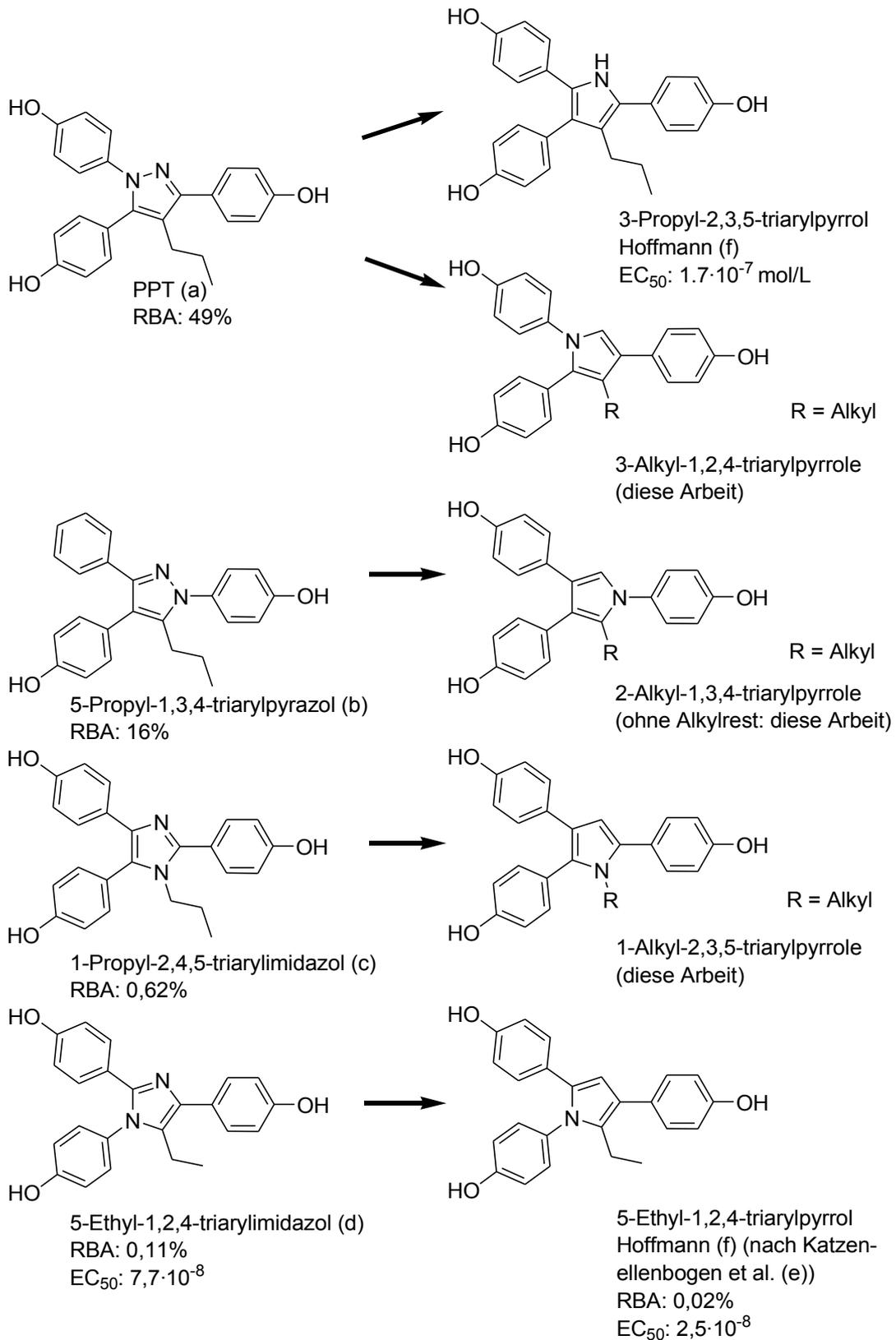


Abbildung 3.1: Triarylsubstituierte Heterocyclen als Liganden des ER. Strukturen, RBA und EC₅₀ aus: a) Stauffer⁹⁴, b) Stauffer⁹⁵, c) Fink⁹², d) Wiglenda⁹³, e) Mortensen⁹⁶ und f) Hoffmann⁹⁸

Darüber hinaus ist beabsichtigt, Triarylpyrrole mit zwei Alkylketten zu synthetisieren (Abbildung 3.2), um die lipophilen Eigenschaften zu verstärken, aber dennoch die estrogenen Eigenschaften beizubehalten. Da sich in vorhergehenden Arbeiten bereits mit Propylrest substituierte Heteroaromaten als am potentesten herausgestellt hatten, bleibt ein Alkylrest ein Propylrest, während der andere in seiner Länge variiert wird. Da die Ligandenbindungstasche mit 450 \AA^3 fast das doppelte Volumen von E2 (250 \AA^3) hat³⁸, sollte der größere Raumsanspruch der Moleküle kein Problem darstellen.

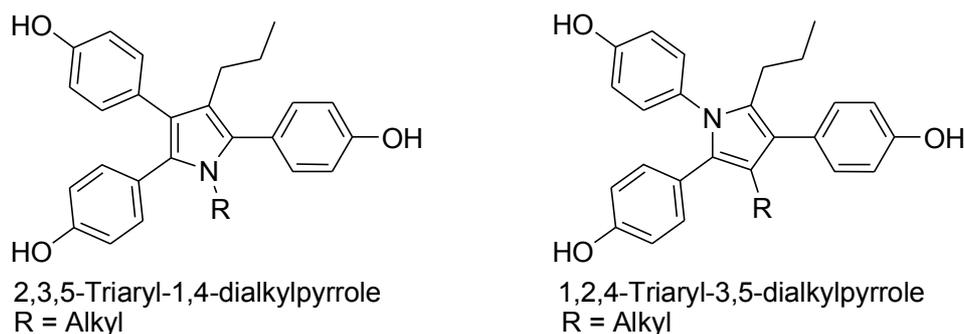


Abbildung 3.2: Die beiden dialkylierten Triarylpyrrole mit unterschiedlicher Position des Stickstoffs, welche synthetisiert werden sollen.

Außer auf Estrogenität und Cytotoxizität werden die dargestellten Substanzklassen mittels HPLC auf ihre Stabilität gegenüber Luftsauerstoff getestet. Instabilität diesem gegenüber stellt bei Pyrrolen eine typische Eigenschaft dar und diese stünde einer Verwendung der Substanzen als Arzneistoffe entgegen.

Hinreichend antiproliferativ wirksame Substanzen werden nach Bestimmung ihres IC_{50} -Wertes (halbmaximale *inhibitory concentration*) an einer ER positiven (MCF-7 Zellen) und ER negativen (MDA-MB-231-Zellen) Zelllinie zusätzlich auf zeitabhängige Cytotoxizität an MCF-7-Zellen getestet. Wenn die Verbindungen etwa an der hormonabhängigen Zelllinie eine stärkere Cytotoxizität zeigen als an der hormonunabhängigen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die toxische Wirkung über den ER vermittelt wird. Die Bestimmung der Cytotoxizität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit soll aufzeigen, wie schnell die Substanzen toxisch wirken und ob die Zellen sich wieder erholen. Hierbei wäre eine schnelle Wirkung und keine Erholung erwünscht, da die Brustkrebszellen ja nachhaltig an ihrer Proliferation gehindert werden sollen.

4 Synthesen

Die in dieser Arbeit synthetisierten Pyrrole kann man je nach Substitutionsmuster in drei Strukturklassen einteilen: 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (**Typ A**), 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (**Typ B**) und 1,3,4-Triarylpyrrol (**Typ C**) (siehe Abbildung 4.1).

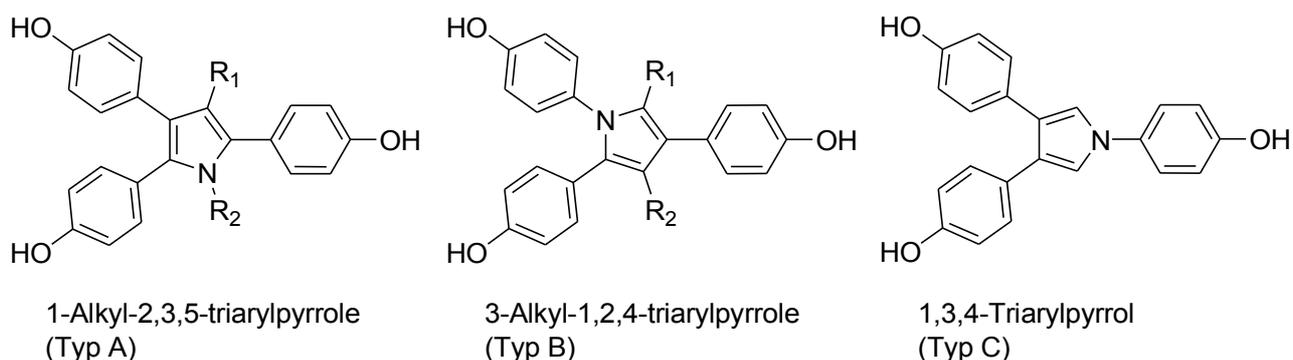
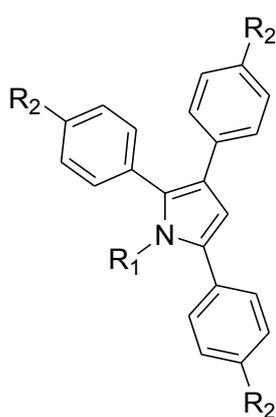


Abbildung 4.1: Substitutionsmuster der drei in dieser Arbeit dargestellten Substanzklassen von Triarylpyrrolen. R₁ = H oder Alkyl; R₂ = Alkyl

4.1 Übersicht über die synthetisierten Verbindungen

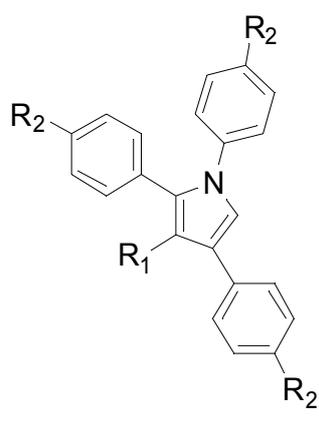
1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)



R ₁	R ₂	Verbindung
Met	OCH ₃	19
Et	OCH ₃	20
Prop	OCH ₃	21
i-Bu	OCH ₃	22
i-Pent	OCH ₃	23
Met	OH	37
Et	OH	38
Prop	OH	39
i-Bu	OH	40
i-Pent	OH	41

Tabelle 4.1:

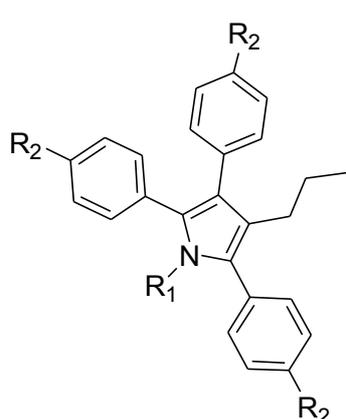
3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)



R ₁	R ₂	Verbindung
H	OCH ₃	67
Met	OCH ₃	68
Et	OCH ₃	69
Prop	OCH ₃	70
H	OH	71
Met	OH	72
Et	OH	73
Prop	OH	74

Tabelle 4.2

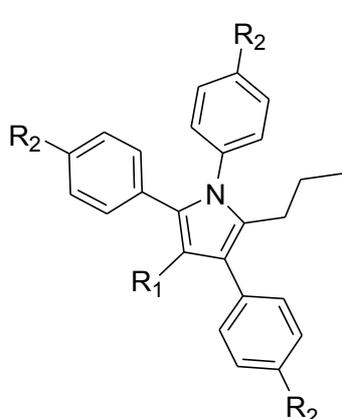
1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)



R ₁	R ₂	Verbindung
Met	OCH ₃	34
Et	OCH ₃	35
Prop	OCH ₃	36
Met	OH	52
Et	OH	53
Prop	OH	54

Tabelle 4.3

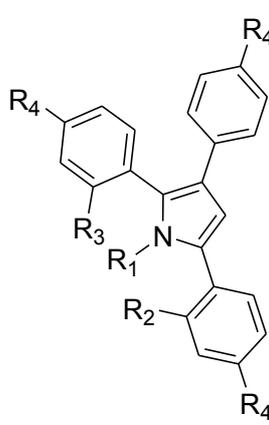
3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)



R ₁	R ₂	Verbindung
Met	OCH ₃	83
Et	OCH ₃	84
Prop	OCH ₃	85
Met	OH	86
Et	OH	87
Prop	OH	88

Tabelle 4.4

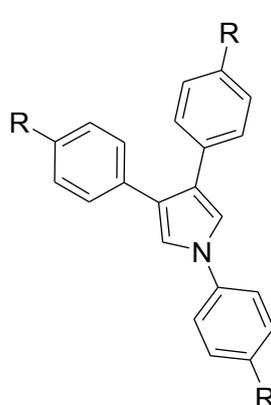
1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole mit Fluor- oder Chlorsubstituenten in den ortho-Positionen der Aromaten (Typ A)



R ₁	R ₄	R ₃	R ₂	Verbindung
Met	OCH ₃	Cl	H	24
Met	OCH ₃	F	H	25
Met	OCH ₃	H	Cl	26
Met	OCH ₃	H	F	27
Prop	OCH ₃	Cl	H	28
Prop	OCH ₃	F	H	29
Prop	OCH ₃	H	Cl	30
Prop	OCH ₃	H	F	31
Met	OCH ₃	F	F	32
Prop	OCH ₃	F	F	33
Met	OH	Cl	H	42
Met	OH	F	H	43
Met	OH	H	Cl	44
Met	OH	H	F	45
Prop	OH	Cl	H	46
Prop	OH	F	H	47
Prop	OH	H	Cl	48
Prop	OH	H	F	49
Met	OH	F	F	50
Prop	OH	F	F	51

Tabelle 4.5

1,3,4-Triarylpyrrole (Typ C)



R	Verbindung
OCH ₃	92
OH	93

Tabelle 4.6

4.2 Synthese der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)

4.2.1 Herstellung von 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid

4-Methoxyphenylessigsäure wurde mit Thionylchlorid versetzt und vorsichtig erhitzt. Während des leichten Siedens entwichen HCl-Gas und SO₂. Ist die Gasentwicklung beendet (je nach Ansatzgröße etwa 45 bis 90 min), wird die Reaktion durch Entfernen des Heizbades gestoppt (Abbildung 4.2).

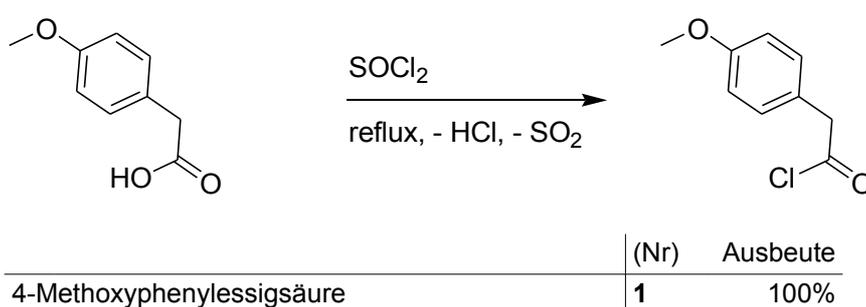


Abbildung 4.2: Herstellung von 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid (**1**)

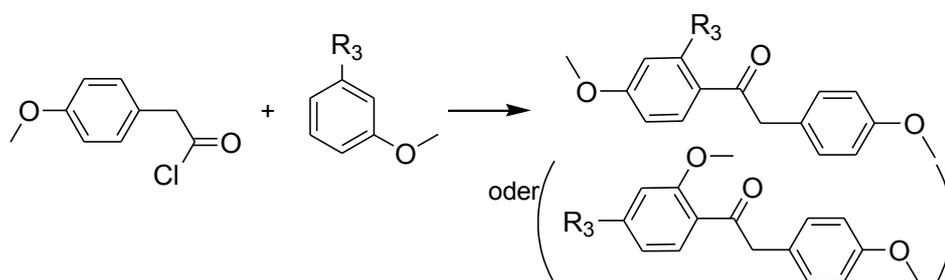
Aufgrund seiner hohen Reaktivität wurde das entstandene 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid (**1**) sofort weiter umgesetzt.

4.2.2 Friedel-Crafts-Acylierung mit 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid

Die Anisolderivate wurden in Dichlormethan gelöst und mit AlCl₃ versetzt^{61, 99}. Man kühlte mittels Eisbad auf 0°C. Da die Elektrophilie von 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid selbst nicht für die Reaktion ausreicht, wurde die Lewisäure Aluminiumchlorid zur Aktivierung des Acylierungsmittels benutzt. 4-Methoxyphenylessigsäure-chlorid wurde langsam zugetropft und bildete mit dem AlCl₃ einen Komplex. Es erfolgte ein elektrophiler Angriff dieses Komplexes am Anisolderivat unter Bildung einer Carbonylverbindung. Da AlCl₃ auch mit dieser einen stabilen Komplex bildet, setzt man es im Überschuss ein. Das Eisbad wurde nach dem Zutropfen entfernt und der Ansatz unter DC-Kontrolle weitergerührt. Nach beendeter Reaktion wurden die Komplexe aus Keton und AlCl₃ durch Eintrag des Reaktionsansatzes in Eis und konz. HCl gespalten.

Die Methoxygruppe des Anisolderivats übt einen para-/ortho-dirigierenden Effekt aus, wobei aufgrund der starken Raumbeanspruchung des angreifenden Elektrophils die para-Substitution bevorzugt stattfindet. Bei der Substitution von 3-Chloranisol und 3-Fluoranisol wurden die Stellungsisomere **3**, **4** und (**3a**), (**4a**) gebildet (Abbildung 4.3). Durch die Durchführung der

Reaktion bei 0°C entstanden bevorzugt die p-methoxysubstituierten Derivate **3** und **4**, allerdings ließ sich die Bildung der Stellungsisomere **3a** und **4a** nicht komplett zurückdrängen. Da es sich bei der Ketogruppe um einen elektronenziehenden Substituenten (Substituent 2. Ordnung) handelt, wurden die jeweiligen Aromaten für die elektrophile Substitution deaktiviert. Aus diesem Grund kam es nicht zu einer Zweitsubstitution. Die gebildeten Stellungsisomerengemische wurden im Fall von Chlorsubstitution säulenchromatographisch aufgetrennt. Bei Fluorsubstitution wurde das Stellungsisomerengemisch mit kaltem Ethylacetat gewaschen. Das gewünschte Isomer **4** kristallisierte aus, während das unerwünschte **3** ein Öl blieb und sich durch das Waschen mit Ethylacetat entfernen ließ.



(Nr)	R ₃	(Nr)	R ₃	Ausbeute
1	H Anisol	2	H	70%
	Cl 3-Chloranisol	3	Cl	25%
	Cl 3-Chloranisol	(3a)	Cl	nicht bestimmt
	F 3-Fluoranisol	4	F	44%
	F 3-Fluoranisol	(4a)	F	nicht bestimmt

Abbildung 4.3: Friedel-Crafts-Acylierung mit 4-Methoxyphenylacetylchlorid

Um diese beiden Isomere voneinander zu unterscheiden, wurden *nuclear Overhauser effect* (NOE)-Differenzspektren von ihnen aufgenommen. Mit dieser Methode können Kopplungen von Protonen über den Raum beobachtet werden. Hierzu wurde bei 1568 Hertz (Hz) (**3a** und **4**) oder 1532 Hz (**3**) jeweils auf die Protonen der Methoxygruppe eingestrahlt. Das para-chlorierte Derivat **3a** zeigte im NOE-Differenzspektrum nur eine Raumkopplung zu einem Aromatenproton. Beim ortho-chlorierten Derivat **3** hingegen waren zwei Raumkopplungen zu den Aromatenprotonen „1“ und „2“ zu sehen (Abbildungen 4.4 und 4.5). Bei dem fluorierten Derivat (**4** und **4a**) war es nicht möglich, ein sauberes Spektrum des unerwünschten Isomers **4a** zu bekommen. Das NOE des erwünschten Isomers **4** ist jedoch eindeutig (Abbildung 4.6).

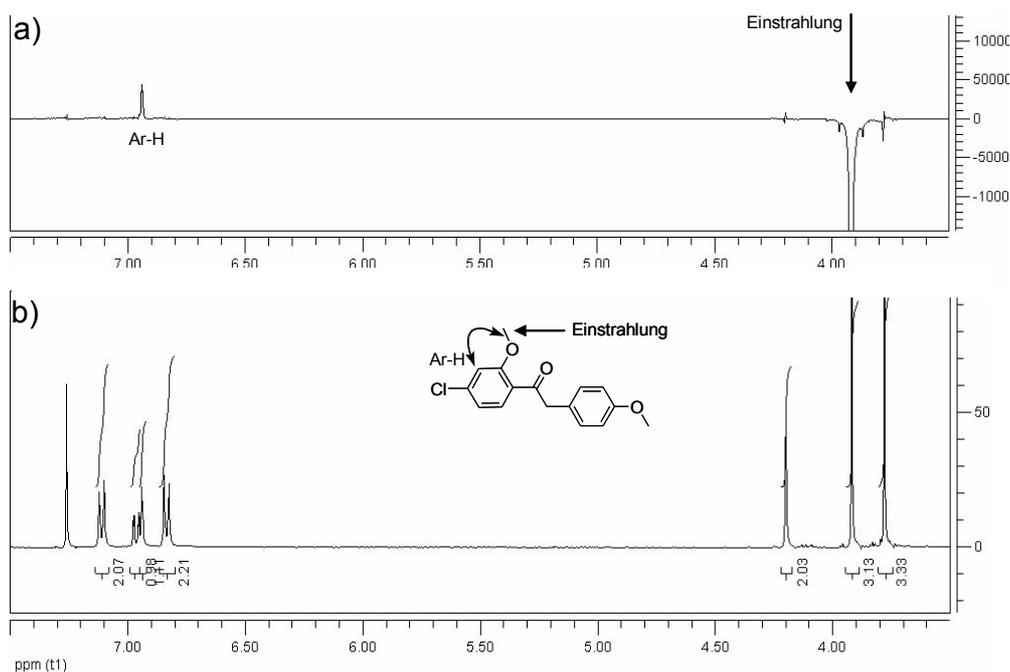


Abbildung 4.4: NOE-Differenzspektrum von **3a**. a) durch Einstrahlung auf 1568 Hz (OCH₃) findet eine Signalverstärkung des Aromatenproton statt. Nur dieses kann mit den Protonen der Methoxygruppe koppeln. b) ¹H-NMR von **3a** in CDCl₃

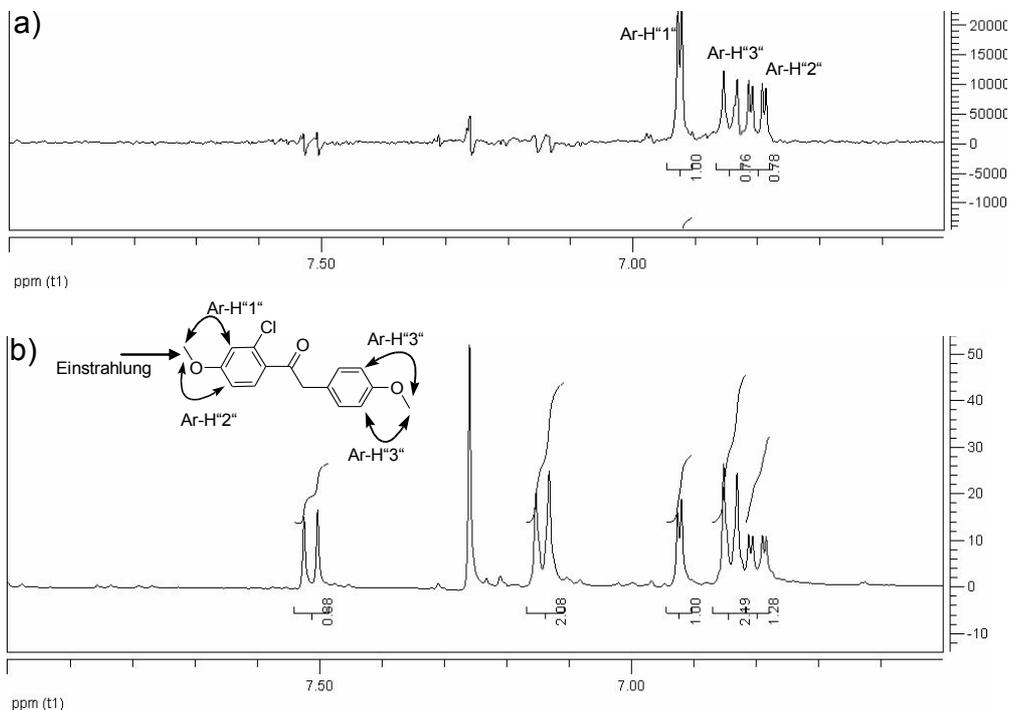


Abbildung 4.5: NOE-Differenzspektrum von **3**. a) durch Einstrahlung auf 1532 Hz (OCH₃) findet eine Signalverstärkung der Aromatenprotonen "1" und "2" statt. Nur diese können mit den Protonen der Methoxygruppe koppeln. Da allerdings die beiden Methoxygruppen sehr nah beieinander lagen (die zweite OCH₃ lag bei 1512 Hz), konnten die Aromatenprotonen nicht isoliert angeregt werden und Aromatenproton "3" koppeln hier mit. Zur besseren Übersicht ist der Teil des Spektrums mit der Einstrahlung nicht abgebildet. b) ¹H-NMR von **3** in CDCl₃

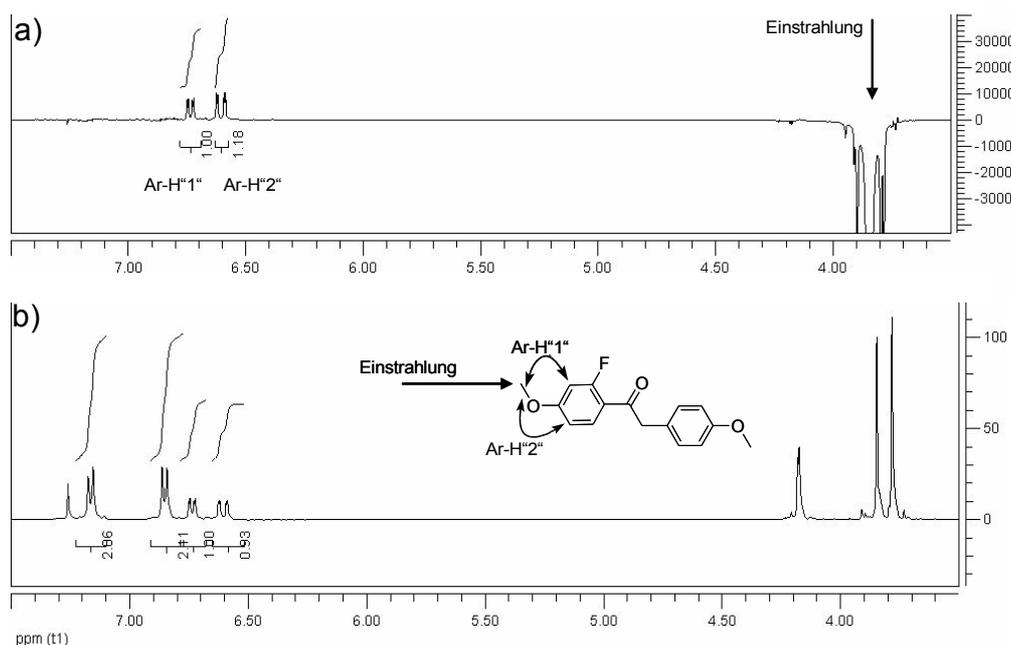


Abbildung 4.6: NOE-Differenzspektrum von **4**. a) durch Einstrahlung auf 1568 Hz (OCH₃) findet eine Signalverstärkung der Aromatenprotonen statt. Nur diese können mit den Protonen der Methoxygruppe koppeln. b) ¹H-NMR von **4** in CDCl₃

4.2.3 Friedel-Crafts-Acylierung mit Alkanoylchloriden

Die Anisolderivate wurden in Dichlormethan gelöst und mit AlCl₃ versetzt. Es wurde auf 0°C gekühlt. Das entsprechende Säurechlorid gelöst in Dichlormethan wurde langsam zutropft (Abbildung 4.7).

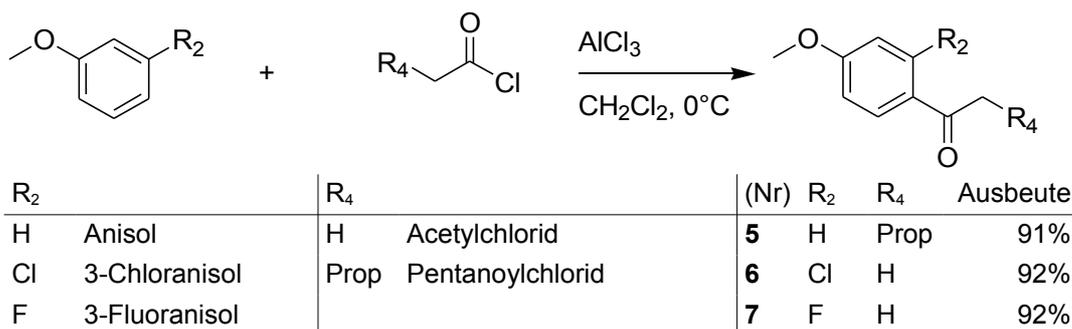


Abbildung 4.7: Friedel-Crafts-Acylierung mit Alkanoylchloriden

Die Reaktionen liefen wie bereits bei 4-Methoxyphenyllessigsäurechlorid (**1**) beschrieben ab; allerdings bildete sich bei 3-Chlor- und 3-Fluoranisol zu 92 % bzw. 90 % (laut NMR) das parasubstituierte Isomer, so dass keine Trennung erforderlich war, da in der folgenden Reaktion (α-Bromierung der Arylketone, siehe unten) das para-substituierte Derivat sauber auskristallisierte.

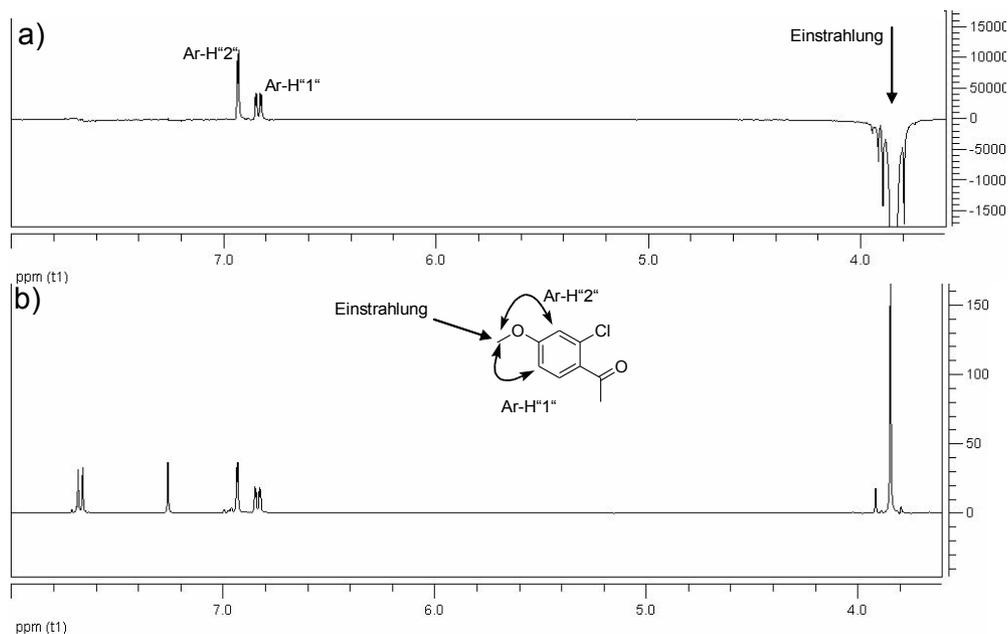


Abbildung 4.8: NOE-Differenzspektrum von **6**. a) durch Einstrahlung auf 1540 Hz (OCH₃) findet eine Signalverstärkung der Aromatenprotonen statt. Nur diese können mit den Protonen der Methoxygruppe koppeln. Wäre das para-chlorierte Isomer vorhanden, sähe man nur ein Signal eines Aromatenprotons. b) ¹H-NMR von **6** in CDCl₃. Neben dem Signal für die Methoxyprotonen ist ein weiteres sehr kleines Signal des unerwünschten Isomers zu sehen.

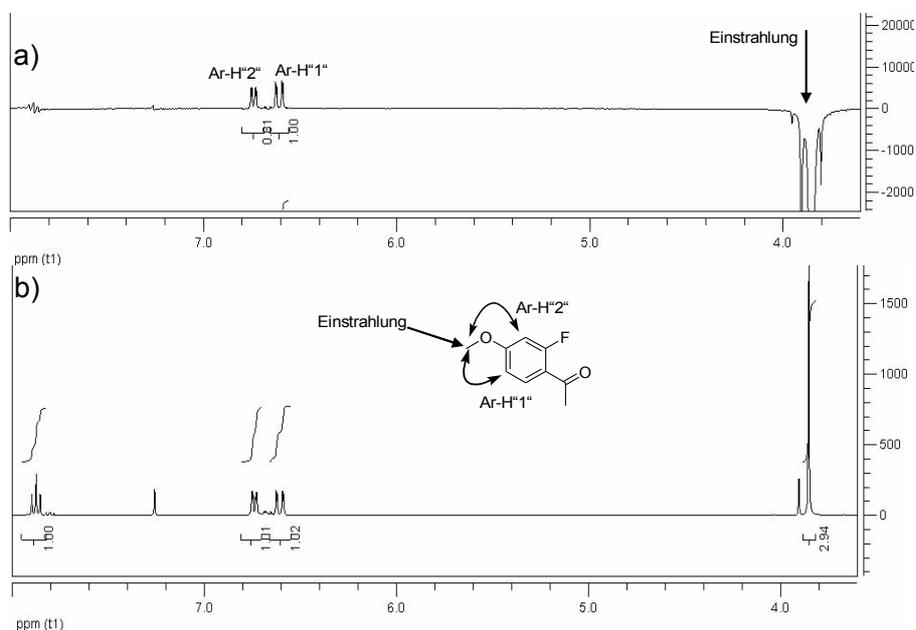


Abbildung 4.9: NOE-Differenzspektrum von **7**. a) durch Einstrahlung auf 1544 Hz (OCH₃) findet eine Signalverstärkung der Aromatenprotonen statt. Nur diese können mit den Protonen der Methoxygruppe koppeln. Wäre das para-fluorierte Isomer vorhanden, sähe man nur ein Signal eines Aromatenprotons. b) ¹H-NMR von **7** in CDCl₃. Neben dem Signal für die Methoxyprotonen ist ein weiteres sehr kleines Signal des unerwünschten Isomers zu sehen.

Im NOE-Differenzspektrum von Verbindung **6** (Abbildung 4.8) ist klar die Raumkopplung von zwei Aromatenprotonen mit den Protonen der Methoxygruppe zu erkennen (Einstrahlung bei 1540 Hz).

Dies ist im NOE-Differenzspektrum von Verbindung **7** (Abbildung 4.9) ebenfalls gut sichtbar (Einstrahlung bei 1544 Hz). Es wurden NOE-Differenzspektren aufgenommen, da beide Stellungsisomere von **7** einen Schmelzpunkt von 51-53°C aufweisen (Alfa Aesar MSDS). Bei Verbindung **6** handelte es sich um ein Öl.

4.2.4 α -Bromierung von Arylketonen

Aldehyde und Ketone sind aufgrund ihrer CH-aziden Eigenschaften in α -Position halogenierbar, wenn sich an dieser Position ein Proton befindet. Die elektrophile Substitution des Protons kann säure- oder basenkatalysiert stattfinden. Im Basischen kann die α -Position mehrfach halogeniert werden (Haloformreaktion). Die CH-azide Verbindung reagierte in diesem Fall aus der anionischen Form, welche durch den Elektronenzug des Broms stabilisiert würde. Im Gegensatz dazu bleibt bei der Säurekatalyse die Halogenierung auf der Stufe des Monohalogenens stehen.

Die Reaktion wurde mit Brom durchgeführt. Es findet ein Hydridshift (Keto-Enol-Tautomerie) und daraufhin der nucleophile Angriff der Doppelbindung am Brom statt (Abbildung 4.10). Durch den elektronenziehenden Effekt des Broms an der Doppelbindung ist eine Zweitsubstitution erschwert.

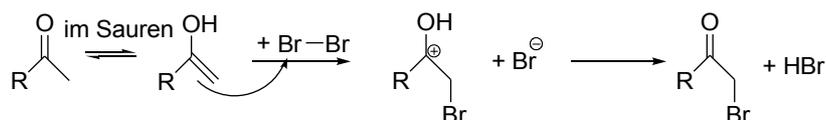
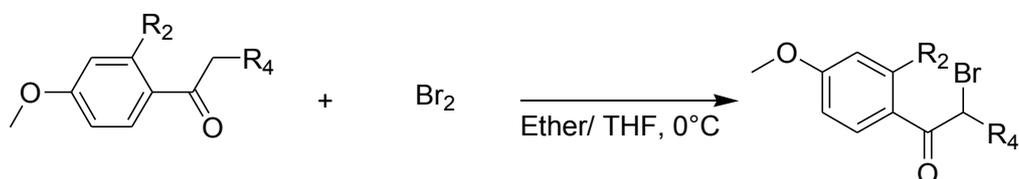


Abbildung 4.10: Mechanismus der α -Bromierung im Sauren

Die Ketone wurden ohne Säurezusatz in absolutem Ether oder THF gelöst, da sich in der Reaktion selbst HBr bildet und so die Säurekatalyse gewährleistet, nachdem die Reaktion begonnen hat. Mittels Eisbad wird auf 0°C gekühlt. Ein Äquivalent Br₂ wird zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde der Reaktionsansatz für eine halbe Stunde weitergerührt und danach auf Eis gegeben. Nach Extraktion mit CH₂Cl₂ und Abdampfen des Lösungsmittels werden die α -Bromketone als helle Öle erhalten, die nach einiger Zeit auskristallisieren (Abbildung 4.11).



(Nr)	R ₂	R ₄	(Nr)	R ₂	R ₄	Ausbeute
	H	H	8	H	H	51%
5	H	Prop	9	H	Prop	80%
6	Cl	H	10	Cl	H	33%
7	F	H	11	F	H	37%

Abbildung 4.11: α -Bromierung von arylierten Ketonen

4.2.5 Synthese von 1,4-Diketonen aus α -Bromketonen und 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethanonen

In Gegenwart geeigneter Basen können CH-azide Ketoverbindungen als Nucleophile reagieren. Bei diesen Reaktionen können zwei Konkurrenzreaktionen auftreten: Zum einen kann die bereits deprotonierte Ketoverbindung andere, noch nicht deprotonierte Ketoverbindungen nucleophil angreifen. Um dies zu verhindern, sollte die eingesetzte Base schnell und quantitativ das Keton deprotonieren. Zum anderen darf die Base nicht selbst als Nucleophil reagieren. Hierfür verwendet man nichtnucleophile Basen wie beispielsweise tertiär-Butanolat oder Kaliumhexamethyldisilazan (KHMDs). Für die Synthese der 1,4-Diketone wird hier KHMDs verwendet, welches einerseits eine sehr starke Base ist, da der Stickstoff als Anion vorliegt und die Trimethylsilylgruppen zusätzlich einen intensiven +I-Effekt auf ihn ausüben. Andererseits ist das Molekül durch diese sterisch gehindert, so dass keine nucleophilen Eigenschaften auftreten (Abbildung 4.12).

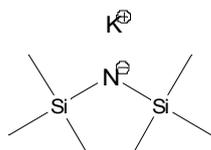
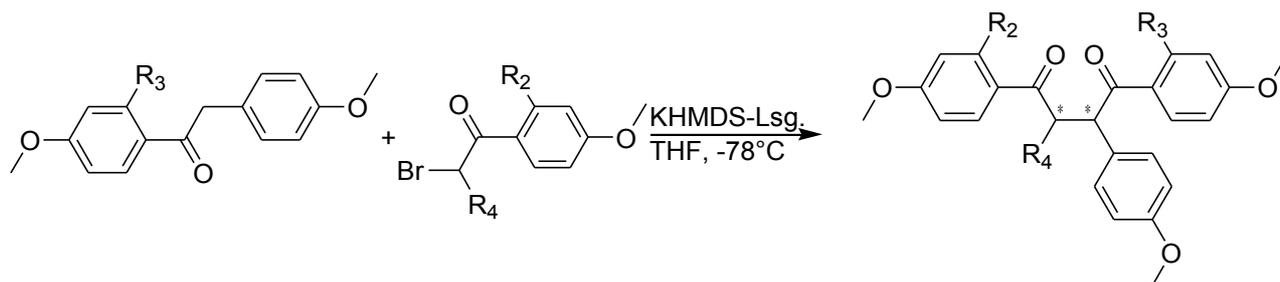


Abbildung 4.12: Kaliumhexamethyldisilazan (KHMDs)

Das entsprechende 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethanonderivat wird in absolutem THF gelöst und auf -78°C gebracht. Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,5 molar in Toluol) wird zugespritzt. Dabei wird das Keton in α -Position deprotoniert. Es wird eine Stunde bei -78°C gerührt, dann wird das entsprechende α -Bromketon in THF gelöst zugetropft. Danach wird eine weitere Stunde bei -78°C gerührt und der Ansatz über Nacht auf Raumtemperatur kommen gelassen. Das 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethanonderivat (**2**, **3** oder **4**) reagiert aus der Enolatform und greift das Bromketon (**8-11**) nucleophil an, wobei das Brom substituiert wird. Hierbei entstehen Diastereomergemische.

Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Abtrennung der Edukte wurden die Diastereomergemische von 1,2,4-Triarylbutan-1,4-dionen (Abbildung 4.13) in Ausbeuten von 41 - 82 % erhalten. Eine Isomerentrennung war nicht erforderlich, da in der folgenden Reaktion beide Isomere zum gleichen Produkt reagieren.



(Nr)	R ₃	(Nr)	R ₂	R ₄	(Nr)	R ₂	R ₃	R ₄	Ausbeute
2	H	8	H	H	12	H	H	H	82%
3	Cl	9	H	Prop	13	H	Cl	H	49%
4	F	10	Cl	H	14	H	F	H	41%
		11	F	H	15	Cl	H	H	80%
					16	F	H	H	55%
					17	F	F	H	73%
					18	H	H	Prop	55%

Abbildung 4.13: Synthese von 1,4-Diketonen aus α -Bromketonen und 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)-ethanonderivaten

4.2.6 Ringschluß zu substituierten 2,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen

Die 1,4-Diketone wurden mittels der Paal-Knorr-Pyrrolsynthese zu 2,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen umgesetzt. Hierbei wird das jeweilige 1,4-Diketon mit Ammoniak oder einem primären Amin zum Pyrrol cyclisiert^{100, 101}. Bei dieser Kondensationsreaktion werden pro Molekül Pyrrol zwei Moleküle Wasser frei. Der Mechanismus war bis in die 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts unbekannt, obschon man bereits im Jahr 1906 ein Enamin als Intermediat isolieren konnte¹⁰². Noch immer ist der Mechanismus nicht vollständig verstanden. Katritzky fand durch ¹H-, ¹³C und ¹⁵N-NMR-Untersuchungen des Reaktionsgemischs heraus, dass sich als Zwischenprodukt das Imin bildete, nicht aber das 2,5-Dihydroxypyrrolidin (Abbildung 4.14)¹⁰³. Daher schlug er einen Additions-Eliminierungsmechanismus über das Imin-Enamin vor. Gleichwohl konnte er das Enamin nicht beobachten, was er darauf zurückführte, dass sich das Gleichgewicht stark auf der Seite des Imins befindet und vorhandenes Enamin schnell unter Wasserabspaltung zum Pyrrol reagiert. Da das Imin isoliert werden kann, muss es einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt vor und einen nach der Iminstehung geben. Ist das Amin sterisch anspruchsvoll, verlangsamen sich sowohl Bildung als auch Weiterreaktion des Imins. Außerdem kann eine pH-Abhängigkeit der Reaktion beobachtet werden.

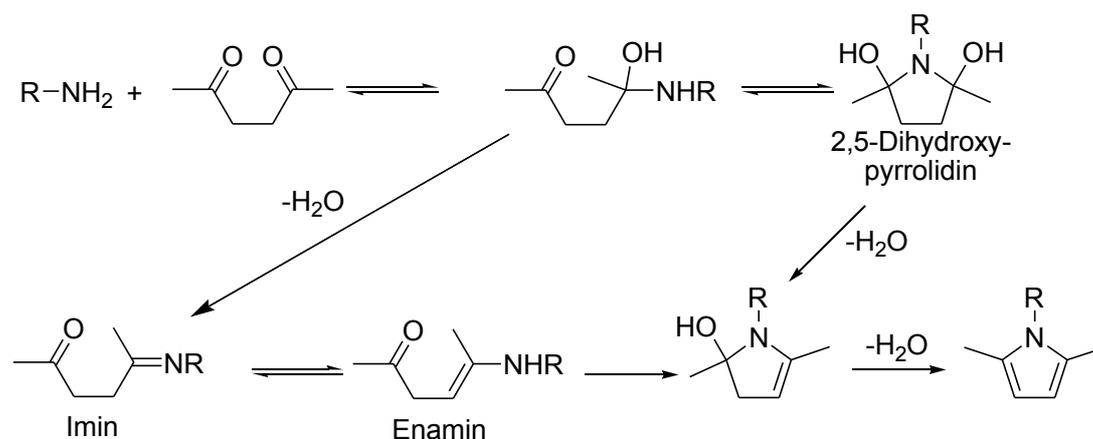
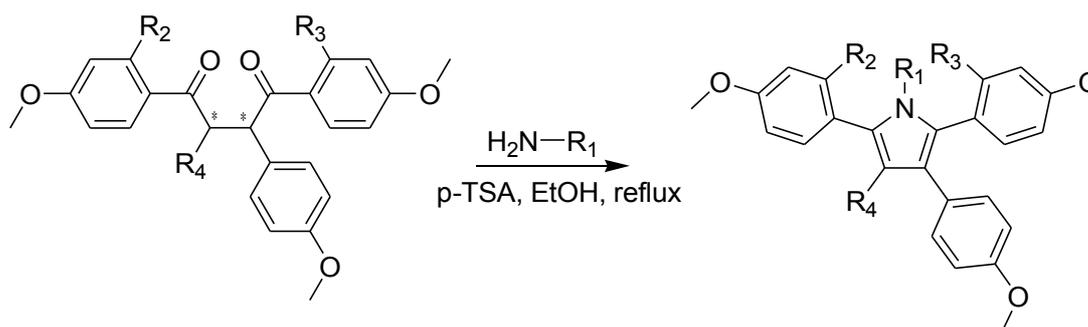


Abbildung 4.14: Mögliche Mechanismen der Paal-Knorr-Reaktion¹⁰³

Im Gegensatz dazu konnte Amarnath 1991 zeigen, dass verschiedene Stereoisomere des 1,4-Diketons mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten reagierten. Hieraus wiederum leitete er ab, dass der Ringschluß nicht aus dem Enamin stattfinden konnte, da dieses für meso- und d,l-Verbindungen identisch ist. Für ihn lag die Schlußfolgerung nahe, dass im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die Diastereomere noch vorhanden sein müssen, weswegen er den Mechanismus über das Pyrrolidin favorisierte¹⁰⁴.



(Nr)	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	(Nr)	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	Ausbeute
12	H	H	H	Met	19	H	H	H	Met	50%
13	H	Cl	H	Et	20	H	H	H	Et	36%
14	H	F	H	Prop	21	H	H	H	Prop	30%
15	Cl	H	H	i-Bu	22	H	H	H	i-Bu	17%
16	F	H	H	i-Pent	23	H	H	H	i-Pent	40%
17	F	F	H		24	H	Cl	H	Met	25%
18	H	H	Prop		25	H	F	H	Met	55%
					26	Cl	H	H	Met	61%
					27	F	H	H	Met	66%
					28	H	Cl	H	Prop	6%
					29	H	F	H	Prop	14%
					30	Cl	H	H	Prop	67%
					31	F	H	H	Prop	13%
					32	F	F	H	Met	15%
					33	F	F	H	Prop	8%
					34	H	H	Prop	Met	15%
					35	H	H	Prop	Et	7%
					36	H	H	Prop	Prop	5%

Abbildung 4.15: Ringschluß zu substituierten 2,3,5-Triaryl-1H-pyrrolen

In dieser Arbeit fand die Cyclisierung bei längeren Alkylketten so langsam (bis zu sieben Tage) statt, dass das Imin isoliert werden konnte. Dies würde Katritzky's Theorie unterstützen.

Das jeweilige Diastereomergemisch wurde in absolutem Ethanol gelöst. Es wurde das jeweilige Amin im 35fachen Überschuss und p-Toluolsulfonsäure (zum Wasserentzug) dazugegeben und je nach Kettenlänge des Amins 24 Stunden bis 7 Tage unter Rückfluss gekocht (Abbildung 4.15).

4.2.7 Etherspaltung von methoxylierten 2,3,5-Triaryl-1H-pyrrolen

Die Etherspaltung wurde nach einer Methode von Benton¹⁰⁵ mit Bortribromid durchgeführt. Frühere Methoden (1930er Jahre) verwendeten Säureanhydride oder Acylhalogenide mit Metallhalogeniden als Katalysatoren und hohe Reaktionstemperaturen¹⁰⁶. Es entstanden aus den

Ethern zunächst durch Reaktion mit den Säureanhydriden die entsprechenden Ester bzw. durch Reaktion mit den Acylhalogeniden die Alkylhalogenide, allerdings wurden empfindliche Naturstoffe oft zerstört. Man bemerkte aber schnell, dass die Umsetzung von Ethern zu Alkoholen auch nur mit den Metallhalogeniden (AlCl_3 , ZnCl_2) stattfand¹⁰⁷.

Bei der Entschützung mit der Lewissäure Bortribromid greift diese die Etherstruktur elektrophil an, bis alle Brombindungspartner durch den Ethersauerstoff ausgetauscht sind (Abbildung 4.16). Es können auch aufgrund von sterischer Hinderung weniger als drei Phenolderivate mit einem Bortribromidmolekül reagieren. Durch Zugabe von Methanol bei der Aufarbeitung wird der entstandene Borsäureester in das Phenol und Borsäuretrimethylester überführt, welcher flüchtig ist und abgedampft werden kann. Praktischerweise entsteht bei dieser Methode immer das Phenol und das Methylbromid.

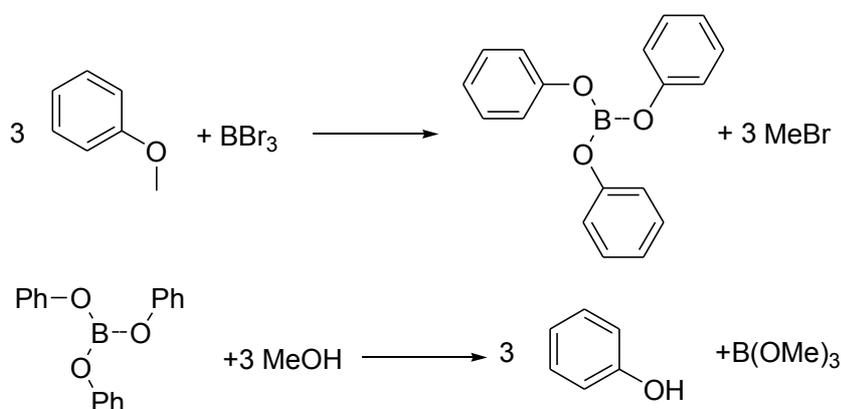
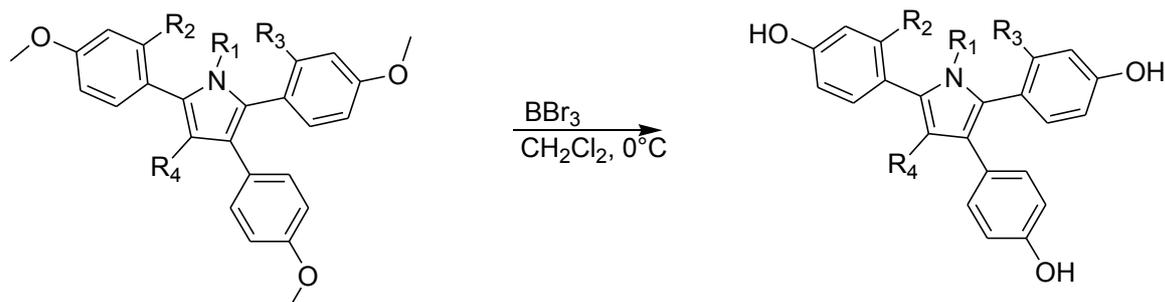


Abbildung 4.16: Etherspaltung mit Bortribromid nach Benton

Zur Etherspaltung wurden die methoxylierten Verbindungen jeweils in absolutem CH_2Cl_2 gelöst. Unter Stickstoffbegasung und Eiskühlung wurde eine Lösung aus BBr_3 (1.5 Äquivalente pro Methoxygruppe⁹⁸) in absolutem CH_2Cl_2 vorsichtig zugetropft, der Ansatz über Nacht ($0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$) gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und Methanol hinzugegeben. Dieses wurde wiederum abgedampft und der Vorgang je nach Ansatzgröße etwa fünf bis zehn Mal wiederholt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. Die entschützten Verbindungen konnten durch Abdampfen des Lösungsmittels als verschieden gefärbte, amorphe Feststoffe in Ausbeuten von 7 - 96% isoliert werden (Abbildung 4.17).



(Nr)	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	(Nr)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Ausbeute
19	H	H	H	Met	37	Met	H	H	H	68%
20	H	H	H	Et	38	Et	H	H	H	74%
21	H	H	H	Prop	39	Prop	H	H	H	58%
22	H	H	H	i-But	40	i-But	H	H	H	70%
23	H	H	H	i-Pent	41	i-Pent	H	H	H	53%
24	H	Cl	H	Met	42	Met	H	Cl	H	49%
25	H	F	H	Met	43	Met	H	F	H	34%
26	Cl	H	H	Met	44	Met	Cl	H	H	57%
27	F	H	H	Met	45	Met	F	H	H	82%
28	H	Cl	H	Prop	46	Prop	H	Cl	H	38%
29	H	F	H	Prop	47	Prop	H	F	H	71%
30	Cl	H	H	Prop	48	Prop	Cl	H	H	7%
31	F	H	H	Prop	49	Prop	F	H	H	50%
32	F	F	H	Met	50	Met	F	F	H	55%
33	F	F	H	Prop	51	Prop	F	F	H	96%
34	H	H	Prop	Met	52	Met	H	H	Prop	15%
35	H	H	Prop	Et	53	Et	H	H	Prop	30%
36	H	H	Prop	Prop	54	Prop	H	H	Prop	13%

Abbildung 4.17: Etherspaltung von methoxylierten 2,3,5-Triaryl-1H-pyrrolen

4.3 Synthese der 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)

4.3.1 Synthese von 1,3-Bis(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion

Natriumhydrid wurde in DMSO suspendiert und mit Eis gekühlt. Zu dieser Mischung wurde nacheinander 4-Methoxyacetophenon und 4-Methoxymethylbenzoat getropft. In dieser der Claisen-Esterkondensation¹⁰⁸ ähnlichen Reaktion reagiert 4-Methoxyacetophenon nach Deprotonierung durch die Base Natriumhydrid. Der nucleophile Angriff dieses Carbanions aus der Enolform erfolgt dann am Kohlenstoff der Estergruppe des 4-Methoxymethylbenzoats unter Eliminierung von Methanolat (Abbildung 4.18). Durch das polar aprotische Lösungsmittel DMSO resultiert eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit und es können milde Reaktionsbedingungen

37 4 Synthesen

gewählt werden¹⁰⁹. Zur Aufarbeitung wird das entstandene Natriumenolat auf verdünnte Phosphorsäure gegeben, wobei es in die β -Ketoform überführt wird.

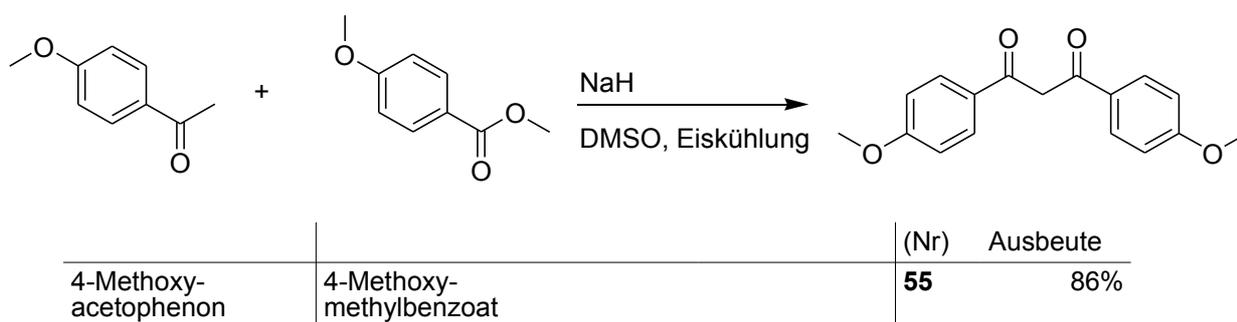


Abbildung 4.18: Synthese von 1,3-Bis(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion

4.3.2 C-Alkylierung von 1,3-Bis(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion

Das 1,3-Diketon **55** und Kalium-tertiär-butanolat wurden in THF erhitzt. Langsam wurde das ebenfalls in THF gelöste Alkylhalogenid zugetropft¹¹⁰. In Analogie zu den Malonestersynthesen findet hier eine S_N2 -Reaktion statt, bei der einer der Wasserstoffe zwischen den Ketogruppen durch einen Alkylrest substituiert wird (Abbildung 4.19). Um den S_N2 -Mechanismus zu unterstützen, benutzt man ein aprotisches Lösungsmittel, in diesem Falle THF. Man verwendet das sterisch anspruchsvolle Kalium-tertiär-butanolat, bei welchem es sich um eine starke Base aber ein sehr schwaches Nucleophil handelt. Dadurch wird verhindert, dass die Base selbst mit dem Elektrophil reagiert anstatt nur das Proton zu abstrahieren. Diese Reaktion funktioniert nur mit n-Alkylresten gut. Je länger die Alkylkette wird, desto schlechter sind die Ausbeuten, da es zu Nebenreaktionen wie Eliminierungen im Alkylhalogenid und O-Alkylierungen des 1,3-Diketons kommt.

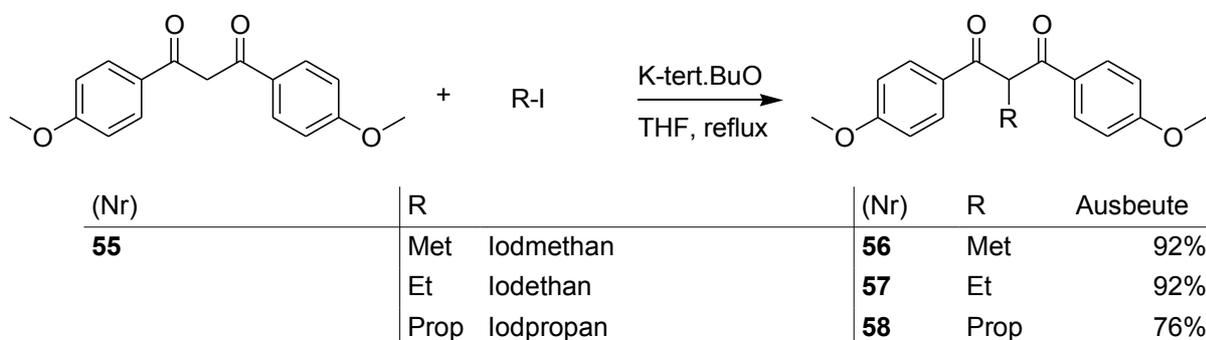


Abbildung 4.19: C-Alkylierung von 1,3-Bis(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion

4.3.3 Ringschluss von 1,3-Bis(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dionderivaten und Diethyl-2-aminomalonat zum jeweiligen Pyrrol-2-carbonsäureethylester

Der Ringschluss wurde mit einer Fischer-Fink-Pyrrolsynthese durchgeführt. Fischer und Fink¹¹¹ entdeckten diese Synthese, als sie eine Knorr'sche Pyrrolsynthese ausführten und sich unerwartet statt dem erwünschten 2,4-Dimethyl-5-carbethoxy-3-formylpyrrol das 2-Methyl-3-formyl-5-carbethoxypyrrrol bildete (Benennung nach der Veröffentlichung von Fischer und Fink, Abbildung 4.20).



Abbildung 4.20: links: das von Fischer und Fink erwünschte 2,4-Dimethyl-5-carbethoxy-3-formylpyrrol, rechts: das tatsächlich entstandene 2-Methyl-3-formyl-5-carbethoxypyrrrol¹¹¹

Bei der Pyrrolsynthese nach Knorr¹¹² benötigt man eine Carbonylverbindung mit aktivierter Methylengruppe in α -Stellung und ein α -Aminoketon. Wenn allerdings das α -Aminoketon durch eine weitere Ketogruppe aktiviert wird, konkurriert mit der Knorr-Synthese die Fischer-Fink Ringschlussreaktion.

Auf der folgenden Seite (Abbildung 4.21) sind beide Mechanismen dargestellt. Es war möglich, Zwischenprodukte zu isolieren, daher ist der Reaktionsmechanismus gut aufgeklärt^{113, 114}.

Kleinspehn¹¹⁵ fand, dass durch die Verwendung von Diethyl-2-aminomalonat als α -Aminoketonkomponente die Reaktion vollständig auf die Fischer-Fink-Seite gedrängt werden konnte.

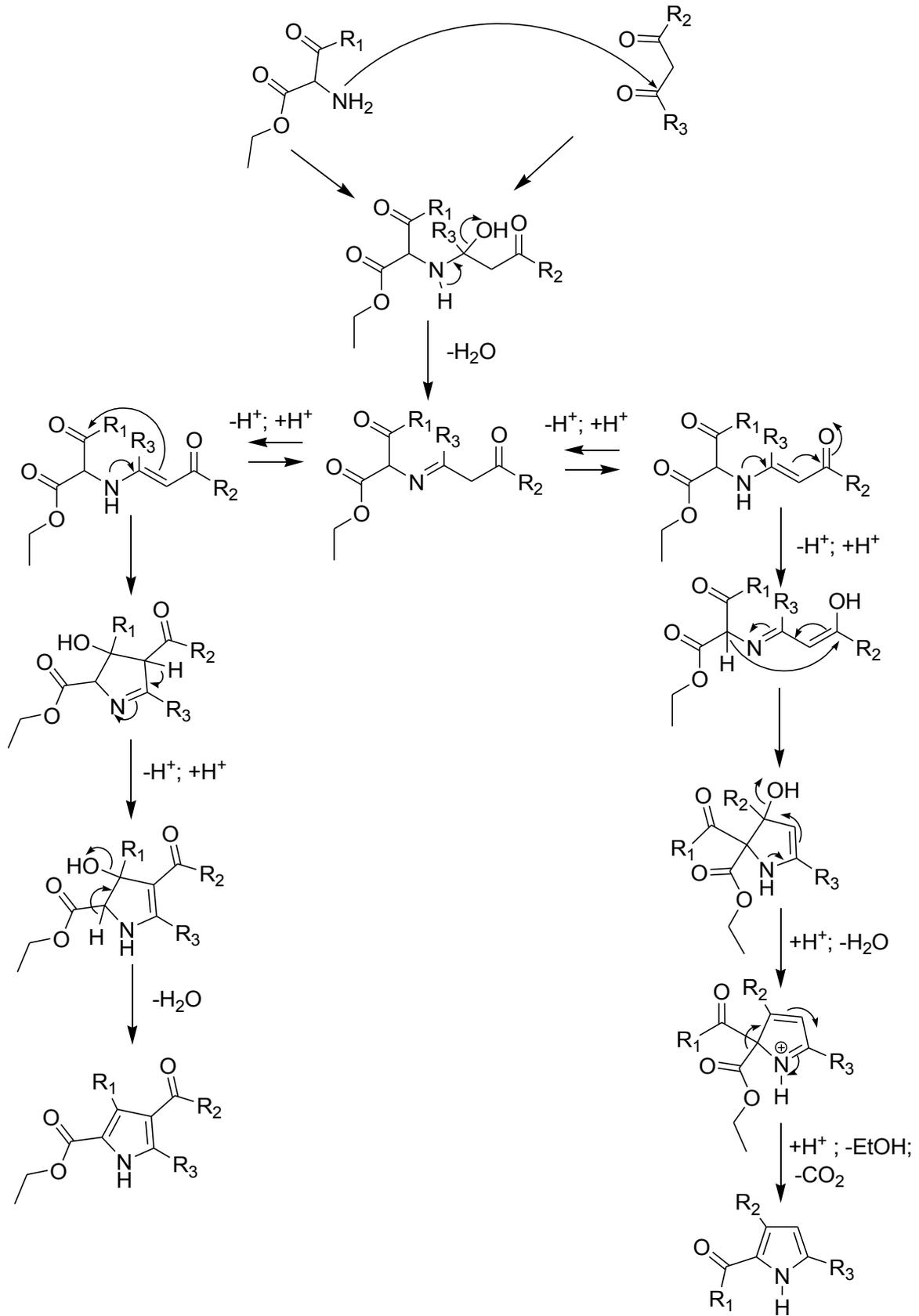
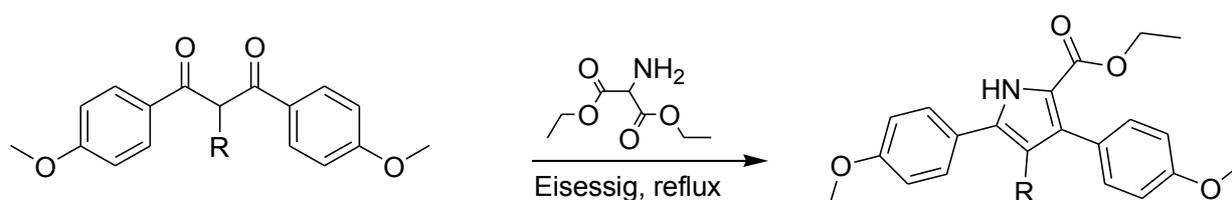


Abbildung 4.21: links: Reaktion nach Knorr, rechts: Reaktion nach Fischer-Fink, angepasst aus Gossauer¹¹⁶

Der Fischer-Fink Ringschluß wurde von Paine¹¹⁷ weiter erforscht und vereinfacht. Paine et al. verwendeten einfache Alkyldiketone und in einem Fall ein Diketon mit einem Phenylrest¹¹⁸. Dass sich trotz der in dieser Arbeit verwendeten 4-Methoxyphenylreste und des Alkylrestes zwischen den Ketogruppen der β -Carbonylverbindungen noch immer die gewünschten Pyrrole bildeten, zeugt von der Flexibilität der Reaktion. Allerdings scheiterten alle Versuche, den Ring zu schließen, wenn die Aromaten mit Chlor oder Fluor substituiert waren. Vermutlich liegt dies im Fall des Chlors an sterischer Hinderung. Paine beobachtete auch längere Reaktionszeiten und schlechtere Ausbeuten für voluminösere Reste. Für Fluor und Chlor gilt, dass sie einen -I-Effekt besitzen und dadurch die Bildung des Imins unterdrücken könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde statt des von Paine verwendeten Diethyl-2-aminomalonats dessen Hydrochlorid benutzt, womit die Reaktion ebenfalls zufriedenstellende Ergebnisse lieferte.

Das jeweilige 1,3-Diketon wurde in Eisessig gelöst und zum Rückfluß erhitzt. Diethyl-2-aminomalonathydrochlorid wurde in wenig Eisessig gelöst und langsam zugetropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde mit Wasser die Reaktion gestoppt und mit Dichlormethan ausgeschüttelt (Abbildung 4.22).



(Nr)	R		(Nr)	R	Ausbeute
55	H	Diethyl-2-aminomalonat x HCl	59	H	60%
56	Met		60	Met	31%
57	Et		61	Et	19%
58	Prop		62	Prop	10%

Abbildung 4.22: Ringschluss von 1,3-Bis(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dionderivaten und Diethyl-2-aminomalonat zum jeweiligen Pyrrol-2-carbonsäureethylester

4.3.4 Esterverseifung und Decarboxylierung von 3,5-Diaryl-1H-Pyrrol-2-carbonsäureethylestern

Ester sind relativ stabil und werden leichter im Basischen als im Sauren gespalten. Zur Esterverseifung und Decarboxylierung wurden die Pyrrol-2-carbonsäureethylester in Ethylenglycol mit Kaliumhydroxid unter Lichtausschluss und Schutzbegasung erhitzt¹¹⁹ (Abbildung 4.24). Es wurde zunächst der Ester verseift, wobei die freie Säure in α -Stellung des Pyrrols und Ethanol entstanden. Im Gegensatz zu vielen anderen aromatischen Säuren lassen sich Pyrrol- α -carbonsäuren relativ leicht decarboxylieren. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass es sich bei Pyrrol um einen Elektronenüberschußaromaten handelt. Untersuchungen zum Mechanismus der

41 4 Synthesen

Decarboxylierung zeigten, dass als Zwischenprodukt das am Ring protonierte Carboxylatanion vorliegt (Abbildung 4.23)¹²⁰. Diese Reaktion verläuft schneller bei saurem pH. Im Basischen ist die Protonierung des Pyrrolrings der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

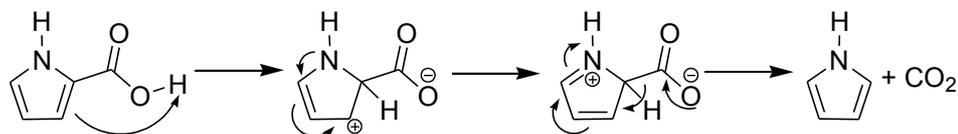
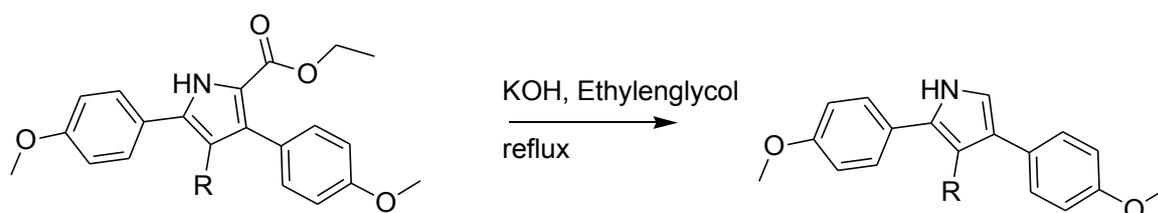


Abbildung 4.23: Mechanismus der Decarboxylierung nach Dunn¹²⁰



(Nr)	R	(Nr)	R	Ausbeute
59	H	63	H	60%
60	Met	64	Met	77%
61	Et	65	Et	74%
62	Prop	66	Prop	84%

Abbildung 4.24: Esterverseifung und Decarboxylierung von 3,5-Diaryl-1H-Pyrrol-2-carbonsäureethylestern

4.3.5 N-Arylierung von 3,5-Diaryl-1H-pyrrolen mit 4-Iodanisol

Zur N-Arylierung der Pyrrol-derivate wurde das jeweilige Pyrrol, Kupferiodid, L-Prolin, Iodanisol und Kaliumcarbonat unter Schutzgas in DMF für 72 h auf 140°C erhitzt¹²¹ (Abbildung 4.27). Danach wurde mit Säulenchromatographie aufgereinigt. Diese Reaktion von Ma und Cai ist der Ullmann-Reaktion ähnlich, bei welcher man Arylhalogenide unter Kupferkatalyse zu Biarylen koppelt. Traditionell benötigt man große Mengen Kupfer und Arylhalogenid und arbeitet bei hohen Temperaturen (>200°C). Diese drastischen Bedingungen konnte Ma mit seiner Methode durch mildere Bedingungen ersetzen, unter anderem durch Verwendung von DMSO¹²². Das Kupferiodid musste vor der Reaktion über Nacht mit THF in einem Soxhlett-Extraktor gewaschen werden, um eine befriedigende katalytische Aktivität sicherzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde statt mit DMSO mit DMF gearbeitet, um das Lösungsmittel besser entfernen zu können. Deng beschrieb eine Verbesserung der Ausbeuten durch Verwendung von 1,4-Dioxan als Lösungsmittel und Kaliumphosphat als Base¹²³. Diese Methode war jedoch mit den hier verwendeten Strukturen nicht erfolgreich. Verschiedene Mechanismen werden für Ullmann-Reaktionen diskutiert: Der oxidative Addition/reduktive Eliminierung-Mechanismus¹²⁴, ein π -Komplex-Mechanismus¹²⁵ und ein Mechanismus mit einem Radikalanion¹²⁶. Da in der Reaktion von Ma L-Prolin verwendet wird,

welches mit Kupferionen Chelate bildet, schlägt er zwei Möglichkeiten vor (Abbildungen 4.25 und 4.26). Das Cu(I)-Chelat (Abbildung 4.25) erhöht die Reaktivität des Kupfers für die oxidative Addition und stabilisiert die Zwischenstufe. Dieser Mechanismus stimmt mit der Tatsache überein, dass die Reaktion mit Aryliodiden viel besser funktioniert als mit Arylbromiden. Wie in Abbildung 4.26 gezeigt, zieht das Kupfer Elektronen aus dem Aromaten ab, weswegen dieser besser die Reaktion mit dem Nucleophil (in diesem Fall das jeweilige Pyrrol) eingehen kann.

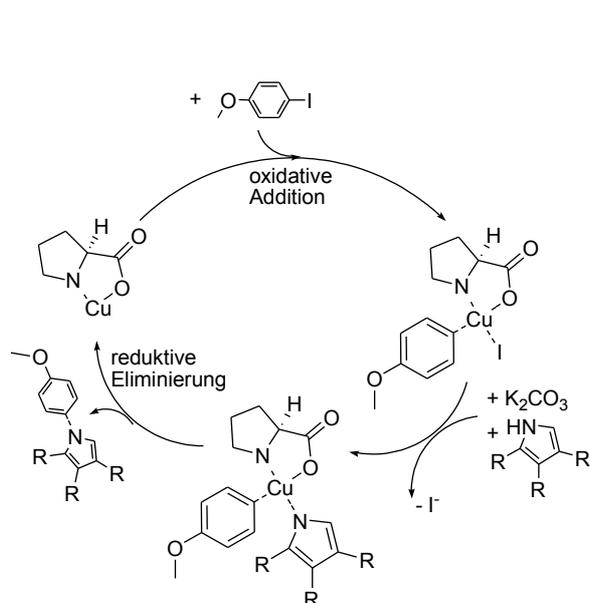


Abbildung 4.25: oxidative Addition/ reductive Eliminierung-Mechanismus

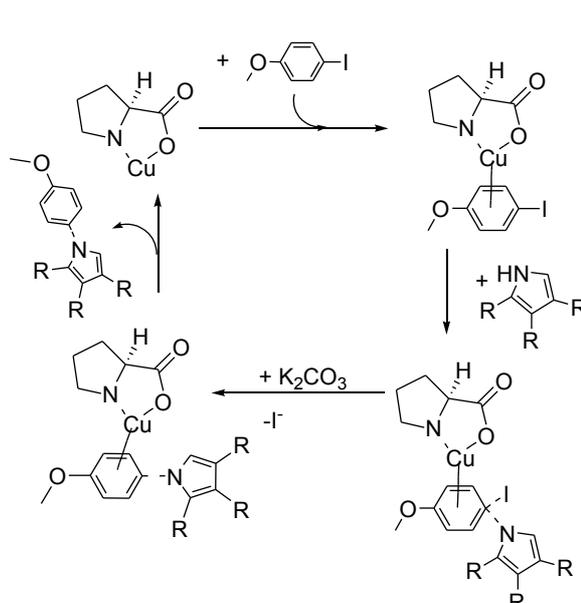
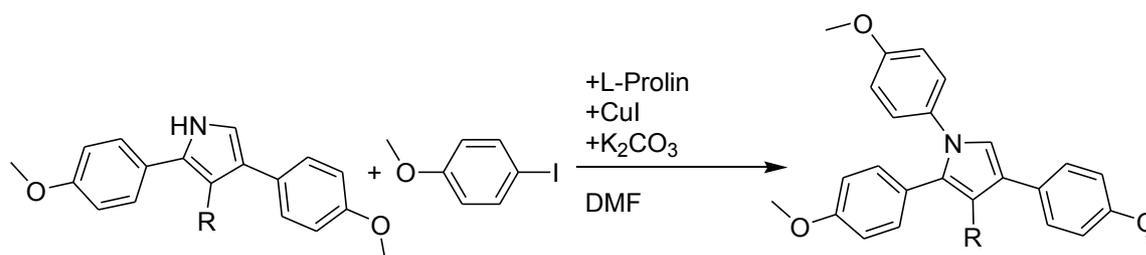


Abbildung 4.26: π -Komplex-Mechanismus

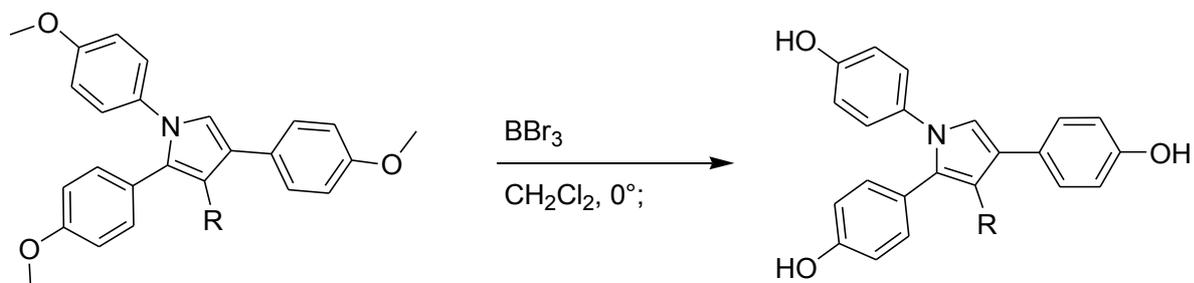


(Nr)	R		(Nr)	R	Ausbeute
63	H	4-Iodanisol	67	H	11%
64	Met		68	Met	18%
65	Et		69	Et	20%
66	Prop		70	Prop	20%

Abbildung 4.27: N-Arylierung von 3,5-Diaryl-1H-pyrrolen mit 4-Iodanisol

4.3.6 Etherspaltung von methoxylierten 1,2,4-Triaryl-1H-pyrrolen

Es wurde vorgegangen wie bei „Etherspaltung von methoxylierten 2,3,5-Triaryl-1H-pyrrolen“ unter Kapitel 4.2 („Synthese der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)“) beschrieben.



(Nr)	R	(Nr)	R	Ausbeute
67	H	71	H	91%
68	Met	72	Met	63%
69	Et	73	Et	73%
70	Prop	74	Prop	43%

Abbildung 4.28: Etherspaltung von methoxylierten 1,2,4-Triaryl-1H-pyrrolen

4.4 Synthese der 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)

4.4.1 Synthese von N-Methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-N-methylacetamid

Zu einer Suspension aus N-Methoxy-N-methylammoniumchlorid und 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid in CH_2Cl_2 (die Herstellung von Letzterem wurde unter „Herstellung von 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid“, Kapitel 4.2 „Synthese der N-alkylierten 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)“ erläutert) tropfte man die Base Pyridin. Sie setzte das N-Methoxy-N-methylamin aus dessen Hydrochlorid frei. Diese Base griff daraufhin die aktivierte Carbonsäure nucleophil an (Abbildung 4.29)¹²⁷. Durch Zugabe von Wasser wurde die Reaktion gestoppt.

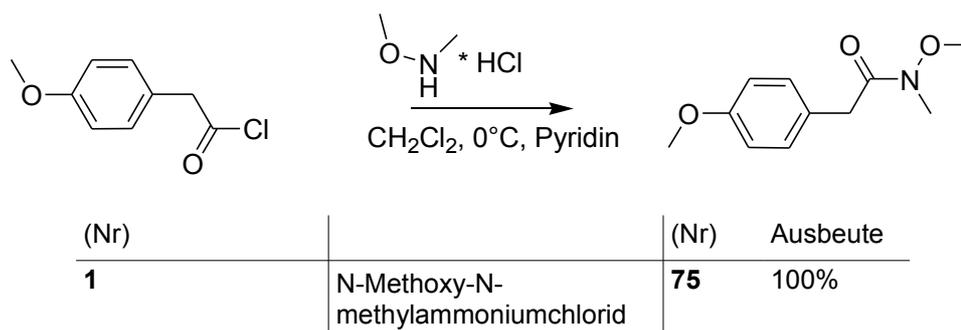


Abbildung 4.29: Synthese von N-Methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-N-methylacetamid

4.4.2 Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)pentan-2-on

Zuerst wurde durch Suspendieren von Magnesiumspänen in absolutem Ether und Zutropfen von n-Propylbromid das Grignardreagenz n-Propylmagnesiumbromid hergestellt. In dieser Organomagnesiumverbindung besitzt der Kohlenstoff eine negative Partialladung (Umpolung) und konnte somit den Kohlenstoff des Säureamids **75** nucleophil angreifen¹²⁷. Normalerweise wird die Grignardreaktion zur Darstellung von Alkoholen verwendet. Carbonsäuren reagieren über das Keton gewöhnlich zum tertiären Alkohol weiter, durch den Einsatz von N-Methoxy-N-methylammoniumchlorid in der vorhergehenden Kupplungsreaktion bleibt die Synthese jedoch auf der Stufe des Ketons stehen¹²⁸. Vermutet wird ein stabiles Metallchelate als Zwischenprodukt, welches keine weitere Reaktion mit dem Grignardreagenz erlaubt (Abbildung 4.31). So ist es möglich, aus Carbonsäuren Ketone zu synthetisieren (Abbildung 4.30). Nach dreistündigem Rühren bei 0°C wurde das Reaktionsgemisch auf gekühlte 6N HCl gegeben, um den Komplex des Ketons mit dem Magnesiumbromid zu zerstören.

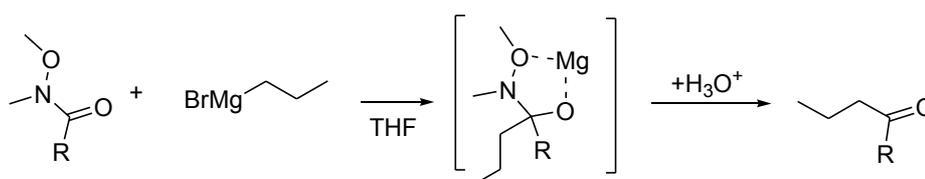


Abbildung 4.30: N-Methoxy-N-methylsäureamidderivat und n-Propylmagnesiumbromid bilden eine stabiles Metallchelate als Zwischenprodukt der Grignardreaktion (nach Nahn¹²⁸)

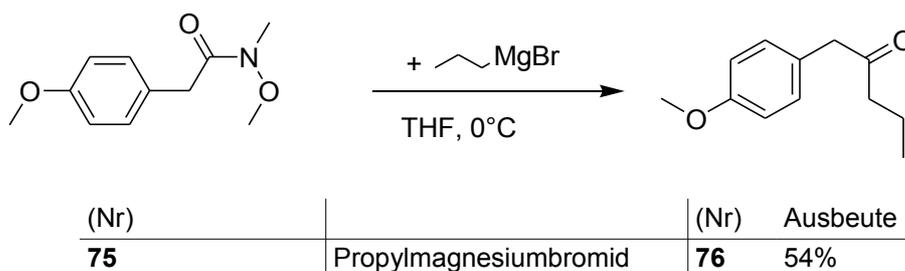


Abbildung 4.31: Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)pentan-2-on

4.4.3 Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)butan-1-on

Es wurde vorgegangen wie bei „Friedel-Crafts-Acylierung mit Alkanoylchloriden“ unter Kapitel 4.2 („Synthese der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)“) beschrieben.

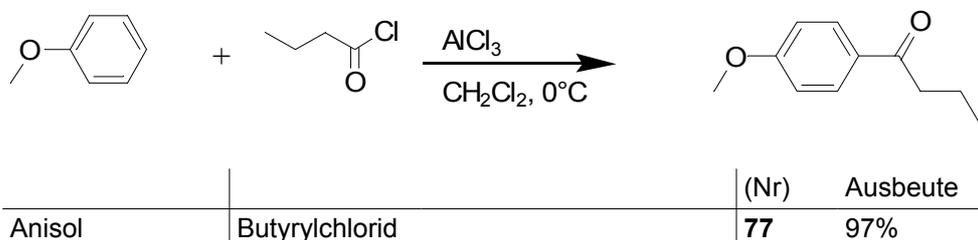


Abbildung 4.32: Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)butan-1-on

4.4.4 α -Bromierung von Arylketonen

Es wurde vorgegangen wie bei „ α -Bromierung von Arylketonen“ unter Kapitel 4.2 („Synthese der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)“) beschrieben.

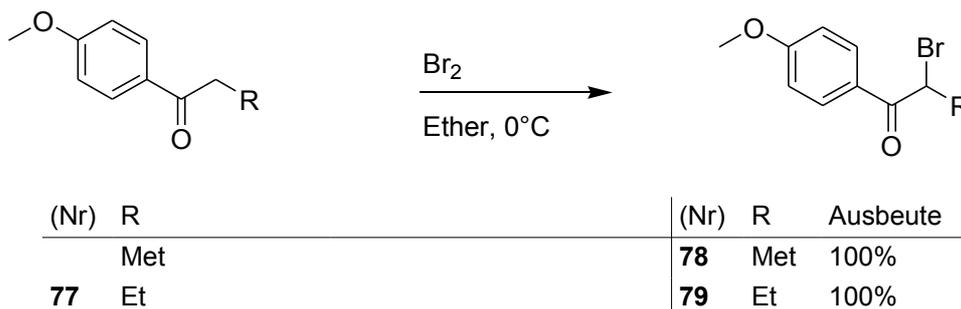
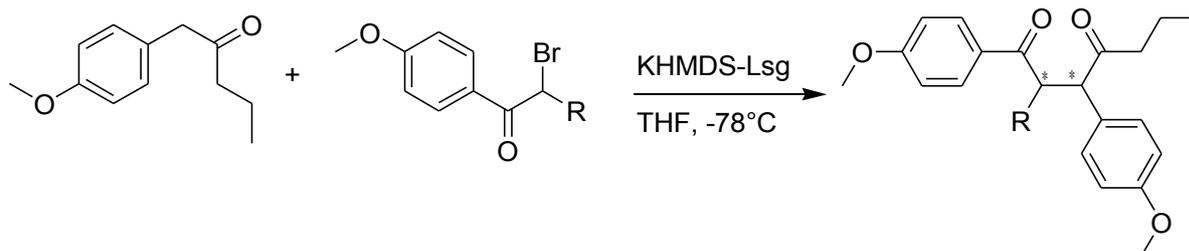


Abbildung 4.33: α -Bromierung von arylierten Ketonen. 1-(4-Methoxyphenyl)propan-1-on ist kommerziell erhältlich

4.4.5 Synthese von 1,4-Diketonen aus α -Bromketonen und 1-(4-Methoxyphenyl)pentan-2-on

Es wurde vorgegangen wie bei „Synthese von 1,4-Diketonen aus α -Bromketonen und 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethanonderivaten“ unter Kapitel 4.2 („Synthese der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)“) beschrieben.

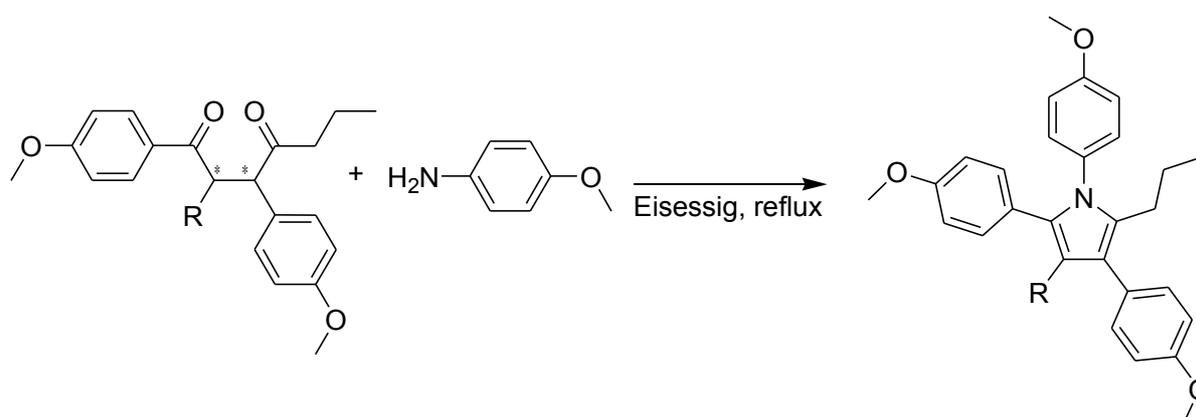


(Nr)	R	(Nr)	R	(Nr)	R	Ausbeute
76		78	Met	80	Met	69%
		79	Et	81	Et	71%
		9	Prop	82	Prop	59%

Abbildung 4.34: Synthese von 1,4-Diketonen aus α -Bromketonen und 1-(4-Methoxyphenyl)butan-2-on

4.4.6 Ringschluß von 1,4-Diketonen zu 3,5-Dialkyl-1,2,4-triaryl-1*H*-pyrrolen

Zur Herstellung der Pyrrole wurden die entsprechenden 1,3-Diaryl-1,4-dione in Eisessig gelöst, *p*-Anisidin zugesetzt und 3 h unter Rückfluss erhitzt (Abbildung 4.35). Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit CH_2Cl_2 ausgeschüttelt und das organische Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wurde in heißem Toluol aufgenommen, wobei nach Erkalten das Säureamid aus Anisidin und Eisessig ausfiel, welches als Nebenprodukt aus der Reaktion hervorging. Es wurde abgesaugt und verworfen. Nach Abdampfen des Toluols wurde der Rückstand chromatographiert.

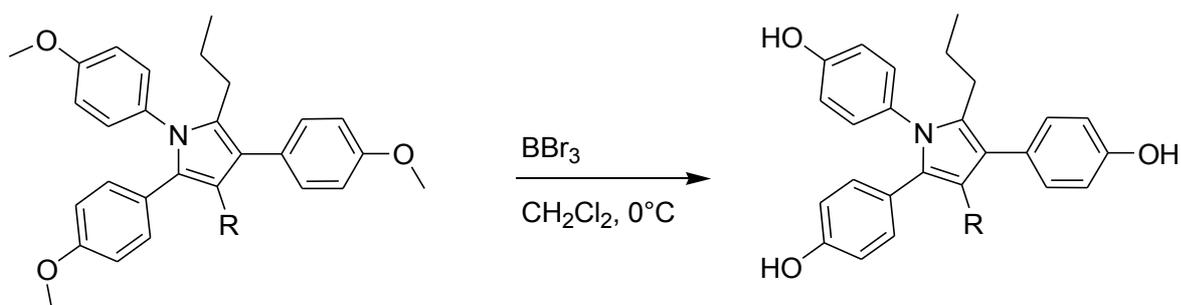


(Nr)	R	(Nr)	R	Ausbeute
80	Met	83	Met	14%
81	Et	84	Et	2%
82	Prop	85	Prop	6%

Abbildung 4.35: Ringschluß von 1,4-Diketonen zu 3,5-Dialkyl-1,2,4-triaryl-1*H*-pyrrolen

4.4.7 Etherspaltung von methoxylierten 3,5-Dialkyl-1,2,4-triaryl-1H-pyrrolen

Es wurde vorgegangen wie bei „Etherspaltung von methoxylierten 2,3,5-Triaryl-1H-pyrrolen“ unter Kapitel 4.2 („Synthese der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)“) beschrieben.



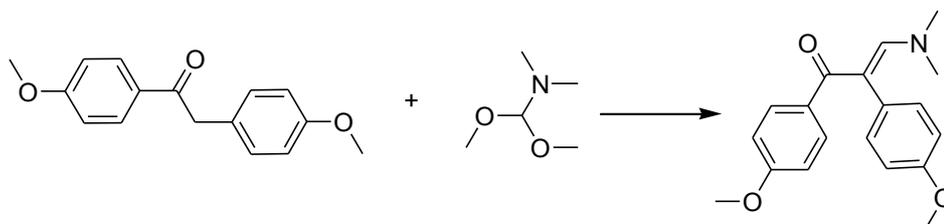
(Nr)	R	(Nr)	R	Ausbeute
83	Met	86	Met	25%
84	Et	87	Et	28%
85	Prop	88	Prop	7%

Abbildung 4.36: Etherspaltung von methoxylierten 3,5-Dialkyl-1,2,4-triaryl-1H-pyrrolen

4.5 Synthese der 1,3,4-Triarylpyrrole (Typ C)

4.5.1 Synthese von 3-(Dimethylamino)-1,2-bis(4-methoxyphenyl)-2-propen-1-on aus 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethanon

1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethanon **2** wird in absolutem Toluol gelöst und Dimethylformamid-dimethylacetal zugetropft. Es wird 16 Stunden unter Schutzbegasung gekocht, wobei das geschützte DMF mit 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethanon unter Austritt von zwei Methanolmolekülen zum 3-(Dimethylamino)-1,2-bis(4-methoxyphenyl)-2-propen-1-on **89** reagiert¹²⁹.

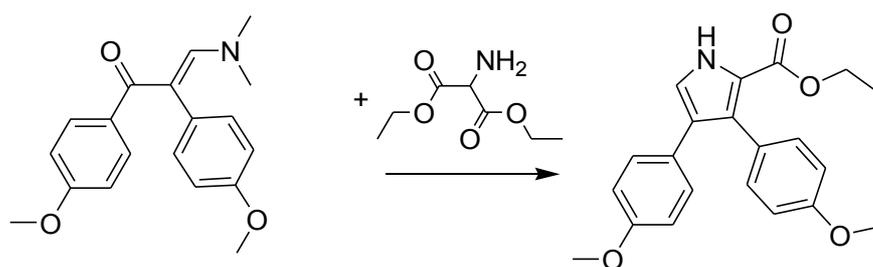


(Nr)		(Nr)	Ausbeute
2	Dimethylformamiddimethylacetal	89	43%

Abbildung 4.37: Synthese von 3-(Dimethylamino)-1,2-bis(4-methoxyphenyl)-2-propen-1-on aus 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethanon

4.5.2 Ringschluß von 3-(Dimethylamino)-1,2-bis(4-methoxyphenyl)-2-propen-1-on und Diethyl-2-aminomalonat zum Pyrrol-2-carbonsäureethylester

Es wurde vorgegangen wie bei „Ringschluss von 1,3-Bis(4-methoxyphenyl)-propan-1,3-dionderivaten und Diethyl-2-aminomalonat zum Pyrrol-2-carbonsäureethylester“ unter Kapitel 4.3 („Synthese der 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)“) beschrieben, wobei im Unterschied zu diesem die Reaktion mit wenig Eisessig zuerst bei RT eine Stunde gerührt und dann für zwölf Stunden gekocht wurde¹²⁹.

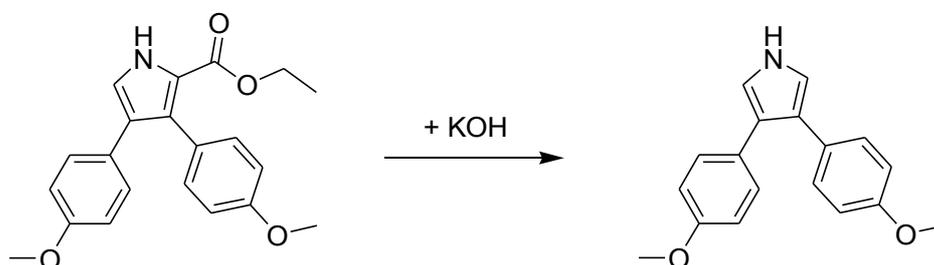


(Nr)		(Nr)	Ausbeute
89	Diethyl-2-aminomalonat x HCl	90	40%

Abbildung 4.38: Ringschluß von 3-(Dimethylamino)-1,2-bis-(4-methoxyphenyl)-2-propen-1-on und Diethyl-2-aminomalonat zum Pyrrol-2-carbonsäureethylester

4.5.3 Esterverseifung und Decarboxylierung von 3,4-Diaryl-1H-pyrrol-2-carbonsäureethylester

Es wurde vorgegangen wie bei „Esterverseifung und Decarboxylierung von 3,5-Diaryl-1H-Pyrrol-2-carbonsäureethylestern“ unter Kapitel 4.3 („Synthese der 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)“) beschrieben.



(Nr)		(Nr)	Ausbeute
90		91	55%

Abbildung 4.39: Esterverseifung und Decarboxylierung von 3,4-Diaryl-1H-pyrrol-2-carbonsäureethylester

4.5.4 N-Arylierung von 3,4-Diaryl-1*H*-pyrrol mit 4-Iodanisol

Es wurde vorgegangen wie bei „N-Arylierung von 3,5-Diaryl-1*H*-pyrrolen mit 4-Iodanisol“ unter Kapitel 4.3 („Synthese der 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)“) beschrieben.

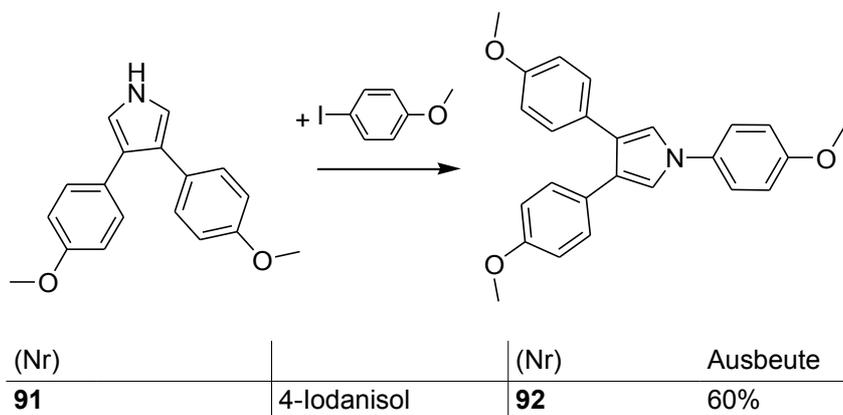


Abbildung 4.40: N-Arylierung von 3,4-Diaryl-1*H*-pyrrol mit 4-Iodanisol

4.5.5 Etherspaltung von methoxylierten 1,3,4-Triaryl-1*H*-pyrrolen

Es wurde vorgegangen wie bei „Etherspaltung von methoxylierten 2,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrolen“ unter Kapitel 4.2 („Synthese der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)“) beschrieben.

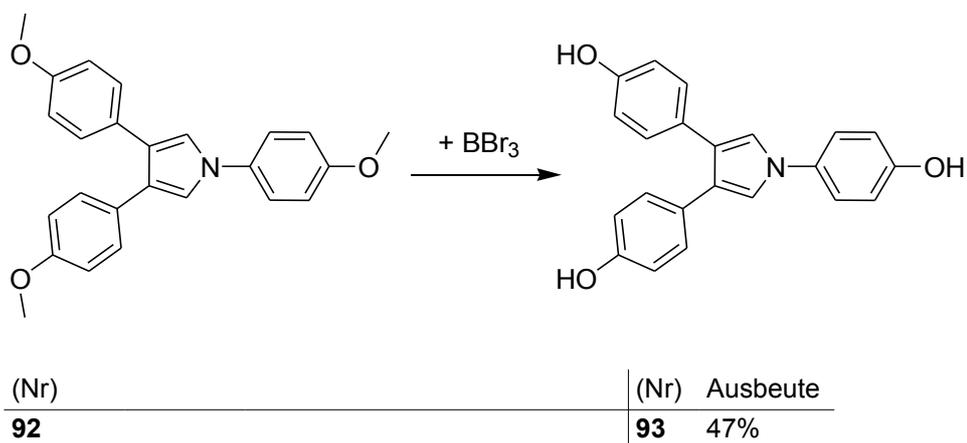


Abbildung 4.41: Etherspaltung von methoxylierten 1,3,4-Triaryl-1*H*-pyrrolen

5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

Zur näheren Charakterisierung der synthetisierten Triarylpyrrole wurden verschiedene analytische Methoden verwendet.

5.1 UV/Vis-spektrometrische Untersuchungen ausgesuchter Verbindungen

Für die in diesem Kapitel folgenden HPLC-Untersuchungen zu Stabilität und Reinheit sowie die Bestimmung der Sättigungslöslichkeit wurden UV/Vis-spektroskopische Daten der Verbindungen benötigt. Die Verbindungen wurden in Methanol gelöst und verdünnt, bis die Absorption im Lambert-Beerschen Bereich lag. Hier hängen die Konzentration und die Absorption linear zusammen. Beispielhaft wurden einige Substanzen ausgewählt, deren Spektren in Abbildung 5.1 zu sehen sind.

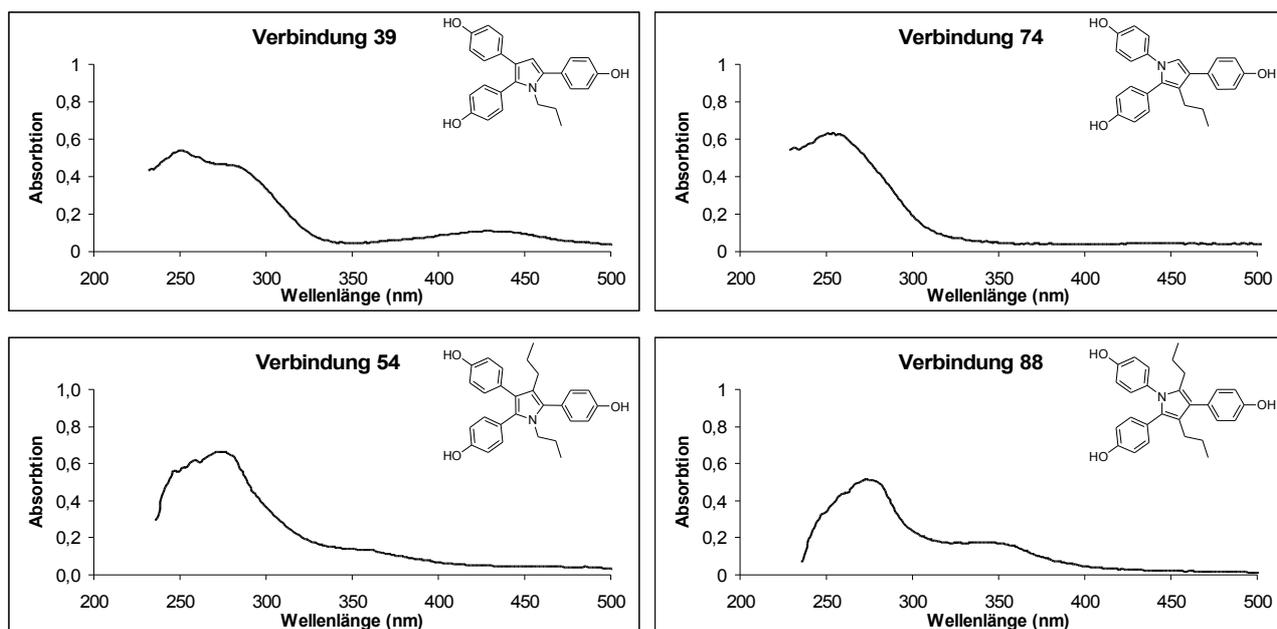


Abbildung 5.1: UV-Spektren ausgewählter Verbindungen (**39**, **74**, **54** und **88**) in Methanol. Da unterhalb von 230 nm die Eigenabsorption des hier verwendeten Methanols zunimmt, wird dieser Teil der Absorption in den Spektren nicht mehr dargestellt.

Das UV-Spektrum des 1-Propyl-2,3,5-triarylpyrrols **39** (Typ A) zeigt Maxima bei 254 nm und 275 nm. Zudem wies es ein weiteres Maximum bei 430 nm auf. Da die Substanzen in PBS (*phosphate buffered saline*, mit maximal 5% Methanol, siehe Kapitel 8.3 „Experimenteller Teil“ und Kapitel 5.2 „Untersuchungen zur Stabilität und Reinheit mittels HPLC und MS“) nicht hinreichend löslich waren um bei 430 nm eine Absorption über 0,2 zu erreichen, wurde bei den HPLC-Untersuchungen im

51 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

Maximum bei 275 nm detektiert. Die UV-Spektren der Pyrrole mit anderer Alkylkettenlänge sahen gleichartig aus.

Das Spektrum des 4-Propyl-1,2,4-triarylpyrrols **74** (Typ B) unterschied sich vom analogen Pyrrol **39** (Typ A). Ersteres wies ein Maximum bei 265 nm auf, jedoch keine Schulter und kein weiteres Maximum bei höherer Wellenlänge. Daher war die Detektionswellenlänge der weitergehenden Untersuchungen 265 nm. Die UV-Spektren der Pyrrole mit anderer Alkylkettenlänge waren ebenfalls analog.

Bei den zweifach propylierten Verbindungen **54** (Typ A) und **88** (Typ B) fand sich wiederum ein Maximum bei 275 nm und eine Schulter bei 350 nm, daher wurde auch hier bei 275 nm detektiert. In der Literatur ist zu lesen, dass mit Arylresten substituierte Pyrrole oft zwei Maxima zeigen¹³⁰, besonders, wenn die Arylreste nur an den Kohlenstoffen des Pyrrolrings substituiert sind. Am Stickstoff arylierte Pyrrole haben oft nur ein Maximum. Deswegen zeigt **74** im Gegensatz zu **39** kein weiteres Maximum.

5.2 Untersuchungen zur Stabilität und Reinheit mittels HPLC und MS

Um zu erfahren, ob die Substanzen unter den Bedingungen der Zelltests stabil sind, wurden Stabilitätsprüfungen durchgeführt. Der zeitabhängige Cytotoxizitätstest weist mit 216 h die längste Inkubationszeit auf. Daher wurde die Stabilität über diesen Zeitraum überprüft. Da sich das Zelltestmedium aufgrund des enthaltenden FCS (*fetal calf serum*) nicht für die direkte Injektion in die HPLC eignet, wurden die Verbindungen in Methanol gelöst und mit PBS verdünnt. PBS ist eine wässrige Lösung mit pH 7,4.

Wäre Zellmedium benutzt worden, hätten die Lösungen vor Vermessung mit der HPLC filtriert werden müssen. Dabei besteht die Gefahr, dass Komponenten des Abbauproduktgemisches verloren gehen könnten, zum Beispiel durch Adsorption an Filtermaterialien oder Bindung der Substanzen an Proteine. Da bereits die synthetisierten Verbindungen an die üblicherweise verwendeten Polyvinylidenfluoridfilter adsorbieren, wurde also PBS verwendet.

Für die Untersuchung mittels LC-MS dürfen viele Salze, unter anderem Phosphate, nicht in den Lösungen vorliegen. Aus diesem Grund wurden die Stabilitätsuntersuchungen mit nur in Methanol gelösten Substanzen wiederholt. Hierbei sahen die Chromatogramme jedoch qualitativ gleich aus.

Für die zuerst ausgeführten HPLC-Untersuchungen wurden die Substanzen in Methanol gelöst (Stammlösung 10^{-2} molar). Diese Lösung wurde mit PBS zu einer $2,5 \cdot 10^{-4}$ molaren Lösung verdünnt und sofort vermessen. Danach wurde täglich analysiert, letztmalig nach neun Tagen. In den Diagrammen sind jeweils die genauen Stunden dargestellt. Die Substanzen wurden während dieser Zeit bei 37°C und unter Lichtausschluß aufbewahrt, um den Bedingungen im Brutschrank während der Zelltests nahezukommen. Allerdings waren die Proben während der Vermessung mittels HPLC dem Tageslicht ausgesetzt. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Methanol und

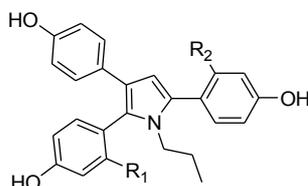
Wasser im Verhältnis 70+30 verwendet. Das HPLC-System ist in Kapitel 8, „HPLC-Methode“, beschrieben.

Um die Stabilität der entsprechenden Verbindung einschätzen zu können, wurde die Peakfläche bestimmt und daraus die Wiederfindungsrate berechnet (Tabellen 5.1 bis 5.5). In die Stabilitätsuntersuchungen einbezogen wurden jeweils die mit Methyl-, Ethyl- und Propylketten substituierten Verbindungen der zweifach alkylierten Typ A-(**52**, **53**, **54**) und Typ B-(**86**, **87**, **88**) Pyrrole. Von den einfach alkylierten Typ B-Pyrrolen wurden die Verbindungen **72**, **73** und **74** getestet. Von den analogen Typ A-Pyrrolen wurde die propylierte Verbindung **39** und zwei halogenierte Derivate dieser (**47** und **48**) vermessen.

Zum Vergleich wurden zwei analoge Pyrrole aus der Arbeit von Hoffmann ebenfalls getestet: **RH157** und **RH93** (Bezeichnung entsprechend der Substanznummern in Hoffmanns Arbeit⁹⁸). Die Strukturformeln der jeweiligen Pyrrole befinden sich bei den entsprechenden Ergebnistabellen (siehe unten).

Für die in den Diagrammen dargestellten Wiederfindungsraten der Peakflächen gilt, dass die Peakflächen der ausgewählten Abbauproduktpeaks zusammen nicht die Gesamtfläche des Ausgangspeaks ergeben. Gründe dafür könnten zum einen sein, dass auch bei anderen Wellenlängen absorbierende Produkte entstanden sein können, welche mit dieser Methode nicht messbar sind, da die Wellenlänge des Detektors auf 265 bzw. 275 nm eingestellt ist. Zum anderen sind in den Chromatogrammen einige sehr kleine Peaks zu sehen, welche nicht mit in die Schemata aufgenommen wurden. Außerdem können sich auch die Chromophore verändert haben, so dass ein Ausgangsmolekül in Bezug auf die Peakfläche nicht einem Zerfallsproduktmolekül entspricht, also einen anderen Responsefaktor besitzt.

5.2.1 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)



Verbindung	Retentionszeit		Wiederfindungsrate der Peakfläche (%) nach						
	R ₁	R ₂	(min)	21,3 h	46,5 h	73,2 h	91,0 h	164,5 h	185,8 h
39	H	H	7,6	95,2	91,9	93,3	91,6	78,3	72,6
47	F	H	7,6	93,1	91,4	90,0	84,0	86,8	89,8
48	H	Cl	10,2	99,1	101,3	99,6	101,5	97,5	92,4

Tabelle 5.1: Retentionszeiten und Wiederfindungsraten der auf Stabilität getesteten Verbindungen **39**, **47** und **48**

53 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

Während eine Substitution mit Fluor in einem der Aromaten offenbar die Lipophilie in diesem System nicht verändert (**39** und **47** haben beide eine Retentionszeit von 7,6 min), wird das chlorierte Derivat **48** mit einer Retentionszeit von 10,2 min deutlich lipophiler. Die 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A) zerfallen wenig im Vergleich zu den anderen Triarylpyrrolen (siehe weiter unten). Die elektronenziehenden Substituenten Fluor oder Chlor scheinen die Stabilität zu erhöhen (Tabelle 5.1).

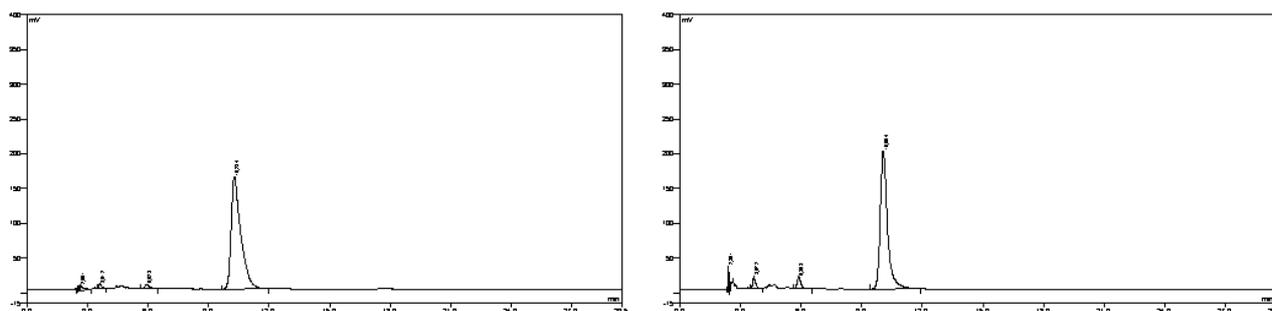
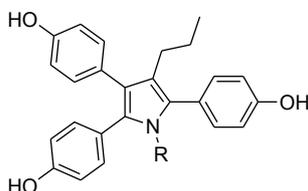


Abbildung 5.2: Chromatogramm von Verbindung **48**. Diese wird im Vergleich zu den anderen getesteten Triarylpyrrolen mit anderen Substitutionsmustern nur wenig abgebaut. Links: Tag 1, rechts: Tag 9.

In Abbildung 5.2 sind exemplarisch für die untersuchten 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A) zwei Chromatogramme von Verbindung **48** dargestellt.

5.2.2 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)



Verbindung	R	Retentionszeit (min)	Wiederfindungsrate der Peakfläche (%) nach					
			24,1 h	47,8 h	73,2 h	95,5 h	167,7 h	193,2 h
52	-Met	8,5	61,2	30,5	17,2	8,4	0,9	0
53	-Et	9,0	79,0	72,8	69,4	57,8	52,3	27,1
54	-Prop	11,5	81,0	68,1	57,9	47,7	34,8	30,0

Tabelle 5.2: Retentionszeiten und Wiederfindungsraten der auf Stabilität getesteten Verbindungen **52-54**

Obwohl sich die 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A) nur durch einen weiteren Alkylrest an C4 von den zuvor besprochenen Pyrrolen unterscheiden, ist ihre Stabilität deutlich herabgesetzt (Tabelle 5.2). Das methylsubstituierte Pyrrol **52** zerfällt am schnellsten, gefolgt vom propylsubstituierten **54**. Bei den Verbindungen **52** und **54** erscheinen bereits nach einem Tag zwei zusätzliche Peaks, welche von hydrophileren Abbauprodukten stammen. In Abbildung 5.3 sind Chromatogramme und ein Diagramm der Peakfläche in Abhängigkeit von der Zeit von Verbindung

54 dargestellt. Bei Verbindung 53 sind die entstehenden Peaks deutlich kleiner als bei 54 und 52 (Abbildung 5.4).

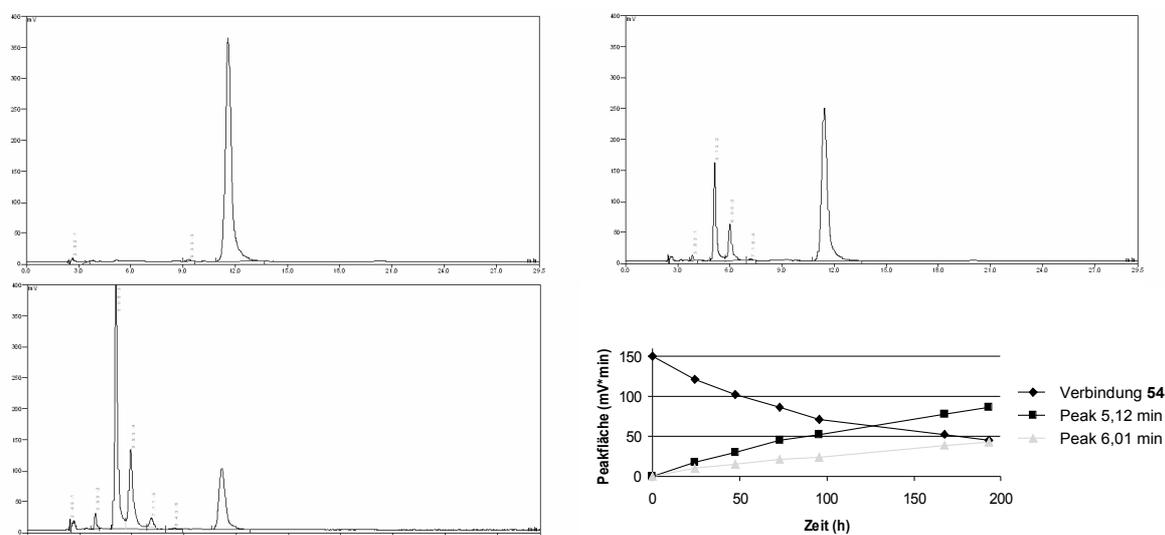


Abbildung 5.3: oben links: Chromatogramm von Verbindung 54 direkt nach Lösen in PBS, oben rechts: an Tag 3 und unten links: an Tag 9. Unten rechts: Peakflächen der Verbindung und der zwei größten Abbauproduktpeaks in Abhängigkeit von der Zeit.

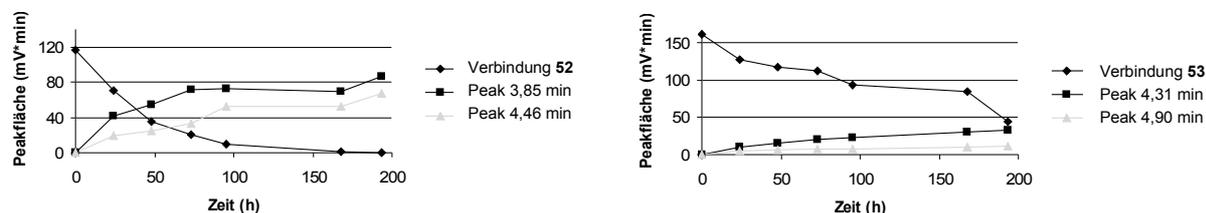
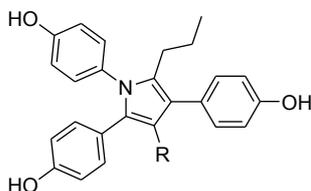


Abbildung 5.4: Peakflächen der Peaks von Verbindung 52 (links) und Verbindung 53 (rechts) und Peakflächen der jeweils größten Abbauproduktpeaks in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Reihenfolge des Zerfalls bei beiden dialkylsubstituierten Pyrrolen ist interessanterweise -methyl>-propyl>-ethyl, d.h. die -methyl- oder -propyl-substituierten Pyrrole zerfallen am schnellsten. Diese Reihenfolge wird auch bei den Typ B-monoalkylierten Pyrrolen eingehalten. Es kann nur gemutmaßt werden, dass die Methylgruppe zu klein ist, um den Angriff des Sauerstoffs zu behindern. Die Ethylgruppe könnte groß für diese Behinderung sein und daher durch ihre freie Drehbarkeit den Angriff erschweren. Die Propylgruppe wiederum könnte so sterisch anspruchsvoll sein, dass sie sich zwischen zwei Positionen entscheiden muss und nicht mehr frei drehbar ist. Wenn sie dann in einer für den Angriff des Sauerstoffs günstigen Position liegt, erleichtert sie diesen zusätzlich durch ihren +I-Effekt. Für die in den Aromaten halogenierten Typ A-Pyrrole konnte diese Eigenschaft der Propylkette mittels NMR nachgewiesen werden. Vielleicht ist bei den nicht halogenierten Verbindungen die Drehbarkeit ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß, eingeschränkt.

5.2.3 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)



Verbindung	R	Retentionszeit (min)	Wiederfindungsrate der Peakfläche (%) nach					
			24,3 h	43,3 h	122,4 h	144,4 h	170,5 h	192,4 h
86	-Met	8,8	58,4	36,3	7,2	6,3	4,1	2,7
87	-Et	9,5	80,6	59,9	47,2	38,4	19,1	17,3
88	-Prop	11,7	69,7	46,1	26,9	16,8	12,1	9,0

Tabelle 5.3: Retentionszeiten und Wiederfindungsraten der auf Stabilität getesteten Verbindungen **86-88**

Die zweite Gruppe von dialkylierten Pyrrolen (Typ B, Tabelle 5.3) wies eine deutliche Verminderung der Stabilität gegenüber den gleichartigen monoalkylierten Verbindungen (siehe unten, **72**, **73** und **74**) auf. Sie zeigten also das gleiche Verhalten wie die 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A, **39**) und ihre dialkylierten Analoga (**52**, **53**, **54**). Wie bei allen getesteten Triarylpyrrolen ist bei den 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrolen **86-88** (Typ B) ebenfalls die ethylsubstituierte Verbindung (**87**) die Stabilste, Die propylsubstituierte Verbindung **88** ist wiederum stabiler als die methylsubstituierte Verbindung **86**. Diese Pyrrole zerfielen von allen getesteten Verbindungen am schnellsten und auch zu mehreren unterschiedlichen Verbindungen. Dies lässt sich an Abbildung 5.5 sehen, in welcher exemplarisch Chromatogramme der Untersuchung von Verbindung **88** gezeigt sind.

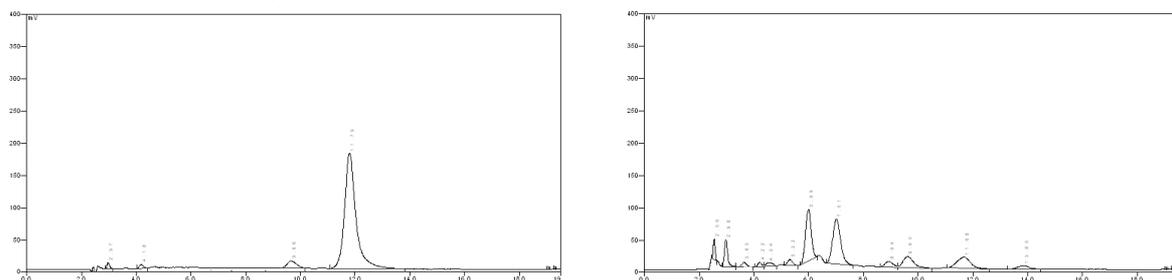
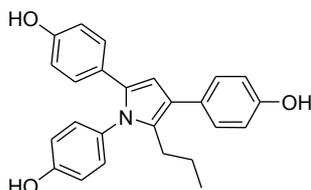
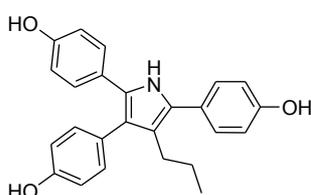


Abbildung 5.5: Chromatogramme von Verbindung **88**. Links: Tag 1 der HPLC-Untersuchung, rechts: Tag 9

5.2.4 5-Propyl-1,2,4-triarylpyrrol (RH „Typ 2“) und 4-Propyl-2,3,5-triarylpyrrol (RH „Typ 1“)



Verbindung	Retentionszeit (min)	Wiederfindungsrate der Peakfläche (%) nach					
		25,4 h	50,6	75,8 h	142,0 h	167,7 h	192,4 h
RH157 (Typ 2)	8,9	25,2	4,5	2,6	2,7	3,5	3,2



Verbindung	Retentionszeit (min)	Wiederfindungsrate der Peakfläche (%) nach					
		25,4 h	50,6	75,8 h	142,0 h	167,7 h	192,4 h
RH93 (Typ 1)	6,1	63,0	39,8	27,7	20,5	5,0	2,7

Tabelle 5.4: Retentionszeiten und Wiederfindungsraten der auf Stabilität getesteten Verbindungen **RH157** und **RH93**

Die Verbindungen von Hoffmann zersetzten sich ebenfalls zu hydrophileren Produkten, wobei das 5-Propyl-1,2,4-triarylpyrrol **RH157** (RH „Typ 2“) deutlich schneller zerfiel als das an N1 unsubstituierte 4-Propyl-2,3,5-triarylpyrrol **RH93** (RH „Typ 1“). Jedoch entstanden bei **RH93** sehr viele Abbauprodukte, wohingegen **RH157** hauptsächlich zu einer Verbindung mit der Retentionszeit 6,5 min zerfiel (Tabelle 5.4 und Abbildung 5.6).

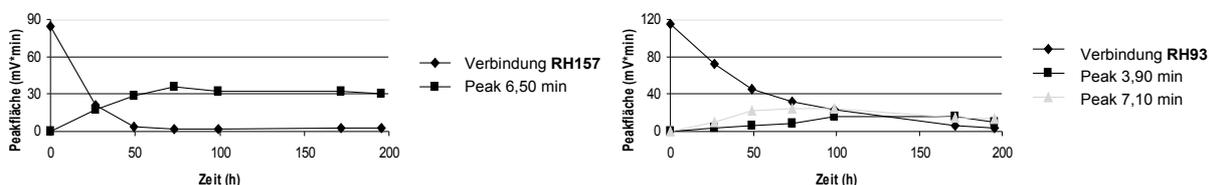


Abbildung 5.6: Peakflächen der Verbindungen **RH157** (links) und **RH93** (rechts) in Abhängigkeit von der Zeit. Zusätzlich sind die Peakflächen der jeweils größten Abbauproduktpeaks mit aufgetragen.

Daraufhin wurde mit der bei Hoffmann beschriebenen Synthese⁹⁸ ein weiteres Triarylpyrrol hergestellt. **RH157** wurde dahingehend modifiziert, dass sich in o-Position der beiden an den Pyrrolkohlenstoffen befindlichen Aromaten jeweils ein Fluor befand (Abbildung 5.7). Sollte die in Kapitel 5.2.8 angesprochene Theorie stimmen, dass elektronenziehende Substituenten die Anfälligkeit gegenüber Luftsauerstoff herabsetzen, dann müsste diese Verbindung stabiler sein als

57 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

RH157. Wie in Abbildung 5.7 zu sehen ist, wird die von **RH157** abgeleitete Verbindung mit Fluoratomen in den Aromaten weniger abgebaut als **RH157** selbst. Auch ließen sich im Chromatogramm keine zusätzlichen Peaks relevanter Größe beobachten.

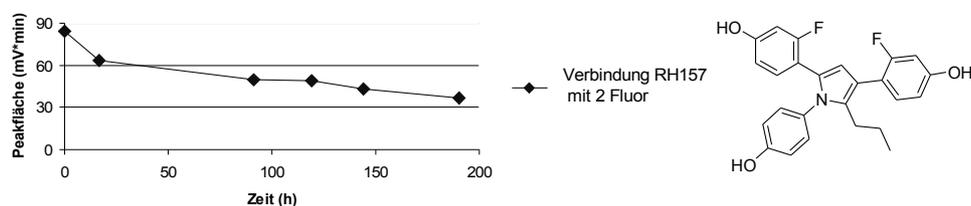
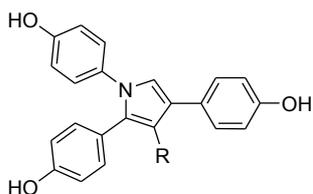


Abbildung 5.7: Peakfläche in Abhängigkeit von der Zeit der von **RH157** abgeleiteten Verbindung mit zwei Fluoratomen in o-Position der Aromaten

5.2.5 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)



Verbindung	R	Retentionszeit (min)	Wiederfindungsrate der Peakfläche (%) nach					
			21,7 h	46,9 h	72,2 h	97,3 h	163,5 h	189,1 h
72	-Met	6,8	84,0	75,2	69,9	59,2	42,6	36,5
73	-Et	7,3	88,9	84,4	83,1	76,5	64,5	50,3
74	-Prop	8,9	81,6	78,9	70,7	64,4	52,6	45,2

Tabelle 5.5: Retentionszeiten und Wiederfindungsraten der auf Stabilität getesteten Verbindungen **72-74**

Bei den 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrolen (Typ B) zeigte sich ebenfalls, dass die ethylsubstituierte Verbindung **73** die stabilste war, gefolgt von der propylsubstituierten **74** (Tabelle 5.5 und Abbildungen 5.8 und 5.9).

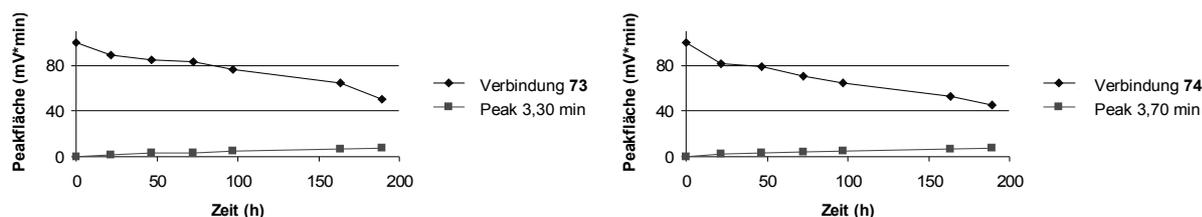


Abbildung 5.8: Peakflächen der Verbindungen **73** und **74** und deren jeweils größten Abbauproduktpeaks in Abhängigkeit von der Zeit.

Im Gegensatz zu den dialkylierten Triarylpyrrolen **86-88** (Typ B) und **52-54** (Typ A) zeigten sich in den Chromatogrammen nur wenige weitere Peaks mit geringer Peakfläche. Bei Verbindung **73** und **74** konnte sogar nur ein weiterer Peak bei der ausgewählten Wellenlänge beobachtet werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die entstehenden Produkte bei einer anderen Wellenlänge absorbieren als die in den Untersuchungen verwendete (265 bzw. 275 nm). Dies wird zum Teil auch durch die Ergebnisse der UV/Vis-Untersuchungen gestützt (siehe Kapitel 5.3). Es stand leider nur eine HPLC mit UV-Detektor zur Verfügung. Mit einem *diode array detector* hätte man auch bei anderen Wellenlängen nach Produkten suchen können.

Der Zerfall von Pyrrolen kann durch Luftsauerstoff (siehe weiter unten) bedingt sein. Um die Richtigkeit dieser Hypothese für die in dieser Arbeit untersuchten Pyrrole zu prüfen, wurden mit einer Substanz (**72**) die Stabilitätsuntersuchungen unter Ausschluß von Sauerstoff wiederholt. Hierzu wurden sechs Lösungen von Verbindung **72** in Methanol mit PBS verdünnt und diese für 15 min mit dem Ultraschallbad entgast. Danach wurden die Lösungen noch 5 min mit Argon durchspült und die Reaktionsgefäße verschlossen. Eine Lösung wurde wiederum sofort vermessen, die anderen an fünf weiteren Zeitpunkten. Zusätzlich wurden Lösungen unter den wirklichen Brutschrankbedingungen mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ aufbewahrt und ebenfalls vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.9 dargestellt.

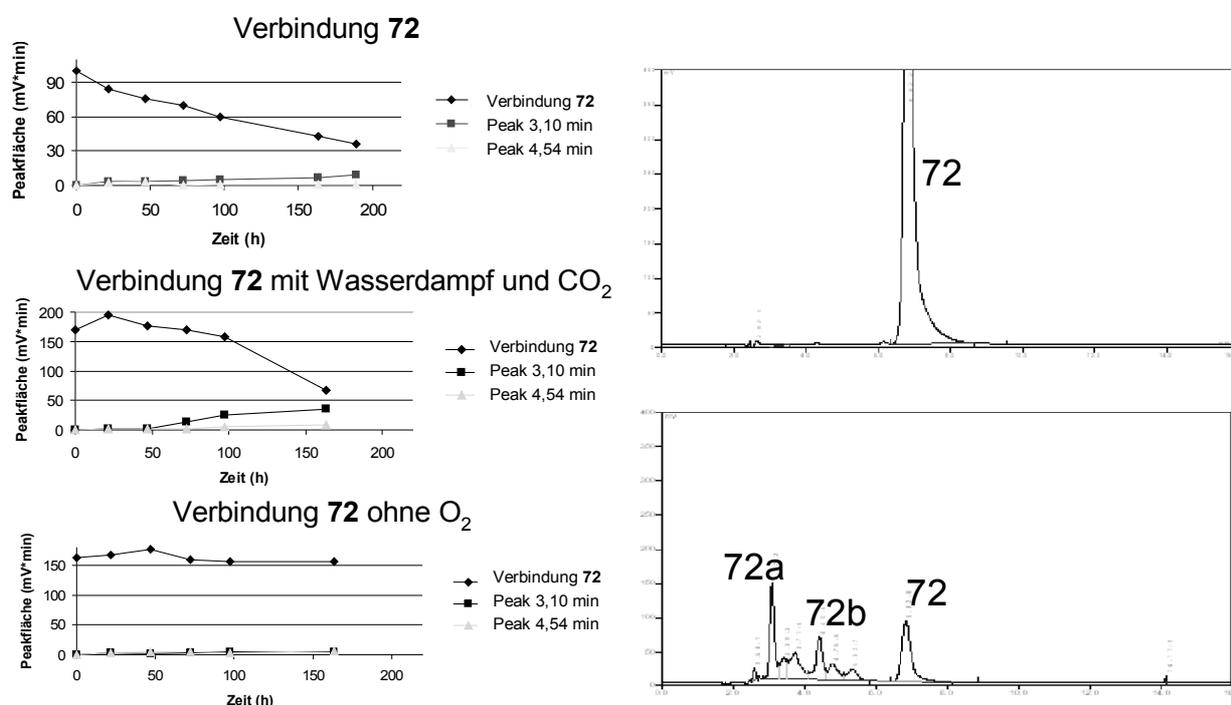


Abbildung 5.9: Links: Diagramme des Abbaus von Verbindung **72**: Oben: Unter den beschriebenen Bedingungen. Mitte: mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ (Brutschrank). Unten: unter Ausschluß von Sauerstoff. Rechts: Chromatogramme von Verbindung **72** am 1. und 9. Tag der HPLC-Untersuchung.

Wie aus dieser Abbildung, links unten, ersichtlich, bleibt die Verbindung durch Ausschluß von Sauerstoff stabil. Wie ebenfalls dargestellt (links mittig), verändert die Sättigung mit Wasserdampf

59 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

und der Zusatz von 5% Kohlendioxid den Abbau. Es scheint, als verlangsamt sich der Abbau unter den Bedingungen im Brutschrank etwas. Die beiden mit **72a** und **72b** bezeichneten Abbauprodukte von **72** konnten isoliert werden und werden in Kapitel 5.2.7.3 „Isolierte Zerfallsprodukte einer ausgewählten Verbindung“ besprochen.

Insgesamt ist die Retentionszeit am kürzesten bei den Verbindungen **72** (Typ B) (6,8 min), welche nur mit einer Methylgruppe substituiert ist, und **RH93** (6,1 min), welche am Stickstoff keinen Substituenten trägt. Das mit einer Propylgruppe substituierte Typ B-Pyrrol **74** (8,9 min) ist weniger hydrophil als das analoge Typ A-Pyrrol **39** (7,6 min).

Von den zweifach alkylsubstituierten Pyrrolen sind die Typ B-Pyrrole (**86**: 8,8 min, **87**: 9,5 min, **88**: 11,7 min) ebenfalls ein wenig lipophiler als die entsprechenden Typ A-Pyrrole (**52**: 8,5 min, **53**: 9,0 min, **54**: 11,5 min).

In den Tabellen 5.1 bis 5.5 und an den Chromatogrammen lässt sich gut sehen, dass die Pyrrole mit zwei Alkylresten (**86-88** (Typ B) und **52-54** (Typ A)), C-alkylierte Pyrrole (**RH157** und **RH93**) und jene mit freier Position neben dem Stickstoff (**72-74**, Typ B) zu hydrophileren Abbauprodukten zerfallen. Nur beim Triarylpyrrol mit freiem Stickstoff **RH93** entsteht ein Zerfallsprodukt, welches weniger hydrophil ist als die Ausgangsverbindung. Allerdings ist die Ausgangsverbindung durch das freie NH bereits relativ hydrophil. Typ A-Pyrrole (Alkylrest am Stickstoff), welche keinen weiteren Alkylrest an den Pyrrol-C-Atomen tragen, zerfallen kaum; noch stabiler werden sie durch das Einführen von Chlor- oder Fluoratomen in den Aromaten (Verbindungen **39**, **47** und **48**). Es stellt sich nun die Frage, warum und zu welchen Verbindungen die Substanzen zerfallen und wie dies verhindert werden kann.

5.2.6 Pyrrole - Reaktivität und Stabilität

Wie in Kapitel 3 „Problemstellung“ bereits angemerkt, können Pyrrole anfällig gegenüber einem Angriff durch Luftsauerstoff sein. Es sollen kurz die Gründe dafür beleuchtet werden.

Pyrrole sind elektronenreiche Heteroaromaten und reagieren bei elektrophilen Substitutionsreaktionen bevorzugt in α -Position¹¹⁶.

Seit langer Zeit ist bekannt, dass Pyrrole, besonders Alkylpyrrole, licht- und luftempfindlich sind. Bereits 1855 fand Anderson, dass sich frisch destilliertes Pyrrol nach Stehenlassen an der Luft oder durch Einwirkung von Säuren zu „Pyrrolroth“, einem Vielfachen von Pyrrol, zersetzt. Er konnte jedoch die Identität der sich bildenden Stoffe nicht aufklären¹³¹. Die Verfärbung von Pyrrol und seinen Derivaten durch Luft, Licht und Einwirkung von Säuren oder Basen blieb Gegenstand der Forschung¹³². Beispielsweise können Pyrrol und an den α -Positionen unsubstituierte

Alkylderivate unter dem Einfluß von Säuren oder Basen polymerisieren (Abbildung 5.10 am Beispiel einer Säure, vorgeschlagener Mechanismus von Potts und Smith¹³³).

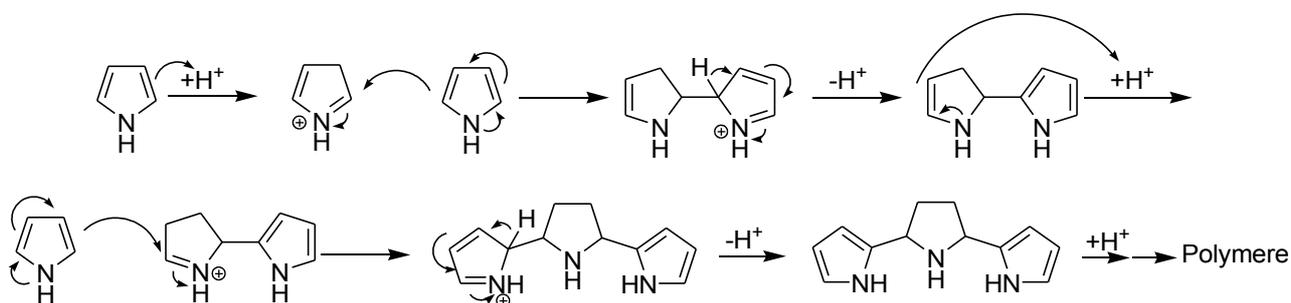


Abbildung 5.10: Polymerisierung von 2/5-unsubstituiertem Pyrrol unter Einfluß von Säuren nach Potts und Smith¹³³

Schon 1955 vermutete Linnell, dass Pyrrole unter Einwirkung von Luftsauerstoff oxidieren¹³⁴. Sie nehmen in Gegenwart eines Photosensitizers (siehe unten) ein Mol O_2 pro Mol Pyrrol auf. Solches Verhalten hatte man zuerst an bestimmten Steroiden (Ergosterol) und später auch an Furanen beobachtet (Abbildung 5.11). Eine Verallgemeinerung war aber zum damaligen Zeitpunkt nicht möglich, da man die Reaktionskonditionen nicht einzugrenzen wußte¹³⁵.

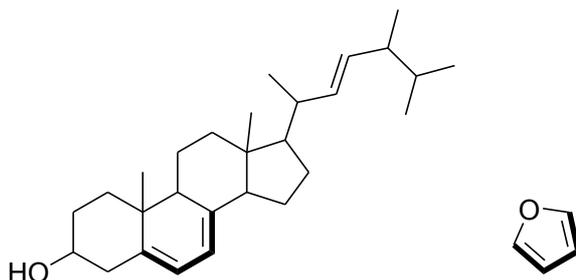


Abbildung 5.11: Ergosterol und Furan, fett: Beiden gemeinsam ist eine cisoid fixierte Dienstruktur

5.2.6.1 Die Diels-Alder-Reaktion mit Pyrrolen

Diels-Alder-Reaktionen sind [4+2]-Cycloadditionen und werden in der organischen Chemie verwendet, um cyclische Verbindungen aufzubauen¹³⁶. Das Dienophil ist eine elektrophile Komponente, welche mit dem Dien über einen pericyclischen Übergangszustand reagiert. Drei π -Bindungen werden gleichzeitig umgelagert und es entstehen zwei neue σ -Bindungen zwischen den Reaktionspartnern (Abbildung 5.12). Pyrrole (wie auch Furane und Ergosterol) können, da sie elektronenreich sind, als Dienkomponente in Diels-Alder-Reaktionen mit Singulett-Sauerstoff als Dienophil reagieren¹³⁵.

61 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

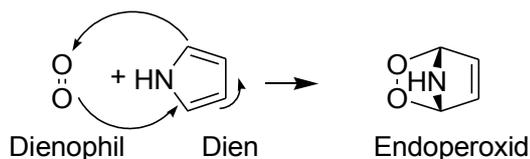


Abbildung 5.12: Bildung des Endoperoxids aus Sauerstoff und Pyrrol durch Diels-Alder-Reaktion

Dabei entsteht als Zwischenprodukt ein cyclisches Endoperoxid (Abbildung 5.12). Dieses wurde zuerst 1943 für das Furan vermutet¹³⁷ und später bestätigt¹³⁸. Die Endoperoxide sind jedoch instabil und explodieren beim Erwärmen auf Raumtemperatur¹³⁹. 1974 wiesen Lightner et al. am Beispiel des N-Phenylpyrrols das Endoperoxid mittels Tieftemperatur-NMR in Trichlorfluormethan und (D6)Aceton nach¹⁴⁰. Später konnten sie auch noch für weitere Pyrrole die Entstehung des Endoperoxids beweisen¹⁴¹.

Beaver et al. schlugen einen anderen Mechanismus für die Entstehung der Endoperoxide vor¹⁴². Allerdings gingen sie von Triplett-Sauerstoff als Reaktionspartner aus, da sie Autoxidation und nicht Photooxidation untersuchten. Jedoch zeigen Autoxidation und Photooxidation oft die gleichen Produkte, wie beispielsweise beim 2,4-Dimethylpyrrol: Sowohl Höft und Mitarbeiter in einem Autoxidationsexperiment, als auch Lightner et al. in Photooxidationsexperimenten¹⁴³ isolierten 5-Hydroxy-2,5-dihydro-3,5-dimethyl-pyrrol-2-on^{144, 145} (Abbildung 5.13).

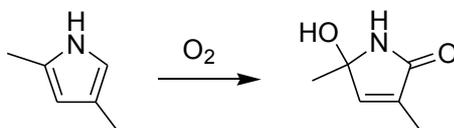


Abbildung 5.13: 2,4-Dimethylpyrrol und 5-Hydroxy-2,5-dihydro-3,5-dimethyl-pyrrol-2-on nach Lightner¹⁴³ und Katritzky¹⁴⁵

Foote und Mitarbeiter führten Versuche mit Singulett-Sauerstoff aus, welchen sie durch Photosensitizer oder NaClO/H₂O₂ generierten, wobei sie ebenfalls feststellten, dass die Oxidationsprodukte gleich waren (hier: Vergleich von Photooxidation und Chemooxidation)¹⁴⁶.

Cooney et al. begasten Lösungen von 2,5-Dimethylpyrrol in Hexan mit Sauerstoff und konnten in UV-Spektren dieser Lösungen die Ausbildung einer Schulter beobachten, welche sich durch Begasung mit Stickstoff wieder zurückbildete¹⁴⁷. Jedoch konnten sie mittels GC und NMR noch keine Oxidationsprodukte detektieren (siehe auch Kapitel 5.3). Nach Cooney bilden gelöster Sauerstoff und Pyrrol in einem ersten Schritt einen reversiblen Molekülsoziationskomplex aus, welcher dann im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in den Charge-Transfer-Komplex übergeht (Abbildung 5.14). Es findet ein Elektronentransfer statt vom *highest occupied molecular orbital* (HOMO) des Pyrrols in das *lowest unoccupied molecular orbital* (LUMO) des Sauerstoffs. Der Charge-Transfer-Komplex steht im Gleichgewicht mit dem Endoperoxid, welches wiederum in die Oxidationsprodukte zerfällt (Abbildung 5.14)¹⁴⁸.

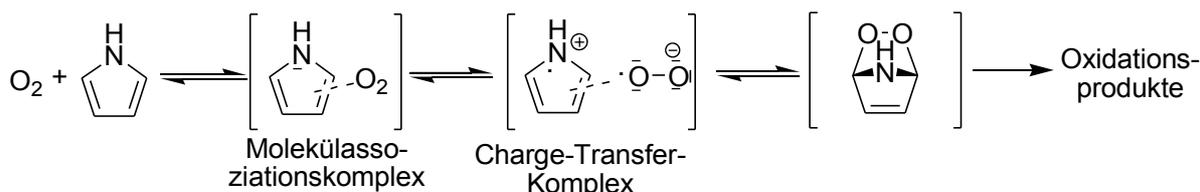


Abbildung 5.14: Bildung des Endoperoxides nach Beaver¹⁴²

Man geht davon aus, dass alle Oxidationsarten über das gemeinsame Zwischenprodukt Endoperoxid verlaufen¹⁴².

Bei den in dieser Arbeit synthetisierten instabilen Verbindungen fällt außerdem auf, dass sie auch bei der Entschützung mit Bortribromid (siehe Kapitel 4 „Synthesen“ und Kapitel 8 „Experimenteller Teil“) sehr geringe Ausbeuten haben. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass es sich bei Bortribromid um eine Lewisäure handelt und diese sehr gute Aktivierungsmittel für Diels-Alder-Reaktionen darstellen¹⁴⁹. Daher liegt es zumindest für die in dieser Arbeit getesteten Pyrrole nahe, dass eine Diels-Alder-Reaktion zwischen den Pyrrolen als Diene und Singulett-Sauerstoff als Dienophil stattfindet.

Es stellt sich die Frage, wie in den Lösungen der Singulett-Sauerstoff entsteht.

5.2.6.2 Singulett-Sauerstoff und Photosensitizer

Normalerweise können Moleküle von ihrem Grundzustand ($^0\Delta$) in den angeregten Singulettzustand ($^1\Sigma$) durch Lichtenergie überführt werden. Die aufgenommene Energie kann dann entweder durch strahlungslose Rückkehr auf einen Grundzustand (Wärmeabgabe an die Umgebung), Fluoreszenz, oder, nach einem verbotenen Übergang in den Triplettzustand ($^3\Sigma$) durch Phosphoreszenz, abgegeben werden.

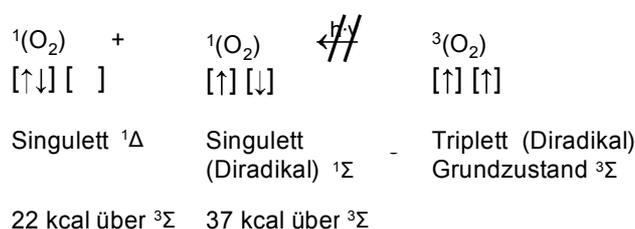


Abbildung 5.15: Zustände des Sauerstoffmoleküls und Belegung der *highest occupied molecular orbitals* (HOMOs). Der Übergang von Triplett- zu Singulett-Sauerstoff ist verboten¹⁴⁶.

Bei Sauerstoff ist aufgrund seiner Elektronenverteilung der Zustand der geringsten Energie der Triplettzustand $^3\Sigma$ (= Grundzustand). Aus diesem kann er nicht einfach durch Anregung mit Licht in einen der Singulettzustände überführt werden, denn dabei handelt es sich um einen verbotenen Übergang (Abbildung 5.15). Daher benötigt Sauerstoff als Hilfsmittel einen Photosensitizer,

63 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

welcher leicht durch Lichtenergie angeregt werden kann und auch einfach in den Triplettzustand übergeht. Dieser Sensitizer kann dann den Triplett-Sauerstoff $^3\Sigma$ in Singulett-Sauerstoff $^1\Delta$ überführen, während er selbst auf den Grundzustand zurückfällt. Singulett-Sauerstoff ist kurzlebig (5 μs in Methanol; in der Gasphase auch deutlich länger¹⁵⁰) und sehr reaktiv. Singulett-Sauerstoff $^1\Sigma$ ist ebenfalls ein Diradikal; Singulett-Sauerstoff $^1\Delta$ hat die Elektronenverteilung von Ethen. Entweder kann der Singulett-Sauerstoff ($^1\Sigma$ oder $^1\Delta$) dann wieder zu Triplett-Sauerstoff werden oder mit einem Molekül zum Oxidationsprodukt reagieren (Abbildung 5.16). Der Sensitizer oder Sauerstoff können natürlich auch jederzeit durch Quenching mit anderen Molekülen ihre Energie abgeben¹⁵¹.

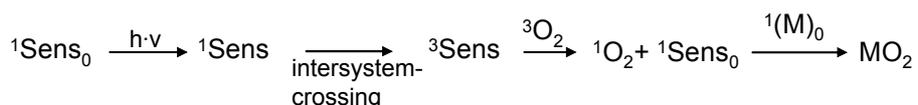


Abbildung 5.16: Abfolge bei der Entstehung von Singulett-Sauerstoff und Oxidationsprodukten nach Foote¹⁵¹
 $^1\text{Sens}_0$: Sensitizer im Singulettgrundzustand, $^1\text{Sens}$: Sensitizer im angeregten Singulettzustand, $^3\text{Sens}$: Sensitizer im Triplettzustand, $^3\text{O}_2$: Sauerstoff im Triplettgrundzustand, $^1\text{O}_2$: Sauerstoff im Singulettzustand, $^1(\text{M})_0$: Molekül im Singulettgrundzustand, MO_2 : Reaktionsprodukt aus Singulett-Sauerstoff und Molekül.

Übliche Photosensitizer sind beispielsweise Rose Bengal oder Methylenblau, aber auch Porphyrinkörper¹⁴⁶ (Abbildung 5.17). Diese Strukturen zeichnen sich durch durchkonjugierte π -Elektronensysteme aus, aufgrund welcher sie im UV/Vis-Bereich Licht absorbieren können, gute Löslichkeit im gewünschten Lösungsmittel und die Fähigkeit, Sauerstoff aufzunehmen und auch wieder abgeben zu können. Sie sollten nicht ohne Licht reagieren. Photosensitizer agieren hier wie Katalysatoren; sie kontrollieren chemische Reaktionen, ohne selbst eine permanente Veränderung zu erleben.

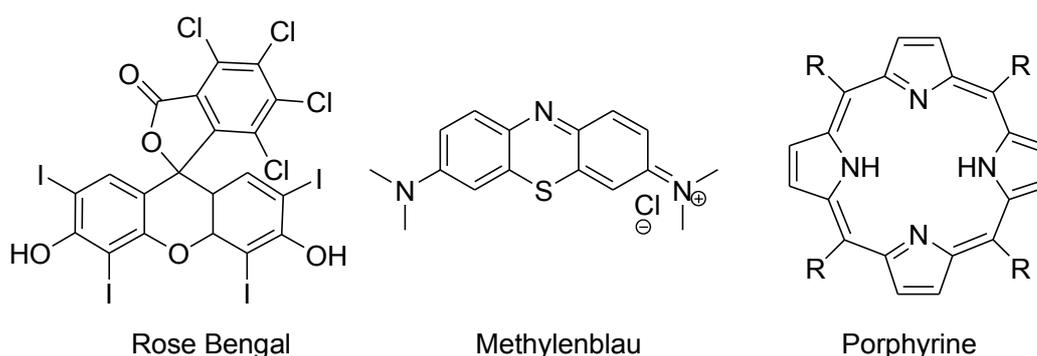


Abbildung 5.17: Übliche Photosensitizer

Foote¹⁵² und Gollnick¹³⁵ vermuten, dass bei der Umsetzung von Pyrrolen mit Sauerstoff dieser durch den Sensitizer zu Singulett-Sauerstoff angeregt wird, welcher dann mit dem Substrat zu Oxidationsprodukten reagiert.

Beeinflusst werden die Reaktionen davon, ob beispielsweise bestrahlt wurde (Art der Strahlenquelle, Dauer der Bestrahlung), vom verwendeten Sensitizer, der Verdünnung des Diens, des Lösungsmittels, der Temperatur und von der Elektronenverteilung und Menge des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs¹³⁵. Singulett-Sauerstoff kann auch ohne Licht entstehen: Etwa durch Wärmeeinwirkung auf elektronenreiche Moleküle, wie beispielsweise die Photosensitizer, können diese Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff anregen¹⁵³.

Es wurde schon für Furane vermutet, dass sie selbst der Sensitizer für ihren eigenen Abbau sein können¹³⁹. Außerdem existieren bestimmte Polyarylcyclopentadiene, welche ebenfalls selbst als Sensitizer wirken können¹³⁵. Die in dieser Arbeit untersuchten Triarylpyrrole erfüllen die Anforderungen für Photosensitizer. Daher erscheint es logisch, dass sie selbst ihren eigenen Abbau erleichtern können.

5.2.7 Strukturaufklärung der Zerfallsprodukte

Es werden zunächst die unterschiedlichen möglichen Zerfallsprodukte der Reaktion von Pyrrolen mit Sauerstoff aufgeführt, um dann durch Untersuchungen der Zerfallsprodukte der in dieser Arbeit synthetisierten Pyrrole herauszufinden, welche von diesen Verbindungen tatsächlich entstanden sind.

5.2.7.1 Mögliche Produkte der Reaktion zwischen Pyrrolen und Sauerstoff

In den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts beschäftigten sich Lightner und Mitarbeiter intensiv mit den Oxidationsprodukten verschiedener Alkylpyrrole. Sie verwendeten methanolische Lösungen der Alkylpyrrole, welche sie mit Rose Bengal versetzten, mit einer Quarzlampe beleuchteten und Sauerstoff einleiteten¹⁵⁴. Sie fanden dabei heraus, dass Alkylreste, die sich in 2/5-Position befinden, dealkyliert werden können¹⁵⁵. Außerdem kann in Methanol eine Methoxylierung der α -Position stattfinden¹⁵⁵, wofür sie den in Abbildung 5.18 gezeigten Mechanismus vorschlugen. Das häufigste Produkt bei ihren Untersuchungen war das jeweilige 5-Hydroxy-2,5-dihydro-pyrrol-2-on¹⁴³, dessen Entstehung mit dem ebenfalls in Abbildung 5.18 gezeigten Mechanismus erklärt werden kann.

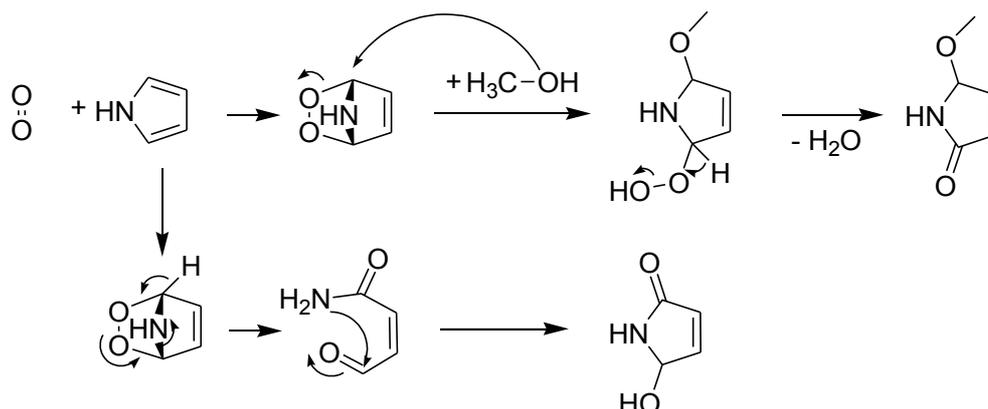


Abbildung 5.18: Mechanismus der Entstehung des Reaktionsproduktes von Pyrrolendoperoxid mit Methanol und der Entstehung von 5-Hydroxy-2,5-dihydro-pyrrol-2-on aus Pyrrol nach Quistad¹⁵⁵

Lightner et al. wiesen ebenfalls nach, dass die Hydroxygruppe des 5-Hydroxy-2,5-dihydro-pyrrol-2-ons nicht aus dem Wasser stammt, sondern durch eine intramolekulare Umlagerung zustandekommt, indem sie Lösungen der Pyrrole in Methanol unter Zusatz von H_2^{18}O einsetzten und die Photooxidationsprodukte massenspektrometrisch untersuchten¹⁵⁶. Sogar wenn ^{18}O -Wasser das alleinige Lösungsmittel ist, ist die intramolekulare Umlagerung noch der vorherrschende Prozess. Für den bei der Anlagerung von Wasser ablaufenden Vorgang formulierten sie die gleiche Reaktionsfolge wie bei der Anlagerung von Methanol (siehe Abbildung 5.18).

Sind beide α -Positionen mit Alkylresten belegt, entstehen keine Hydroxyverbindungen, jedoch kann sich Methanol anlagern, wobei einer der α -Alkylreste substituiert wird. Daher muss das Proton in α -Position im Mechanismus eine wichtige Rolle spielen. Die verschiedenen Produkte konnten mit oder ohne Lichtbestrahlung nicht ineinander umgewandelt werden. Auch dies erhärtet den Verdacht, dass sie alle über die gleiche Zwischenstufe entstehen. Für einige Alkylpyrrole fanden Lightner et al. auch Produkte, welche sich nur durch 1,2-Addition von Sauerstoff gebildet haben konnten¹⁵⁷ (Abbildung 5.19).

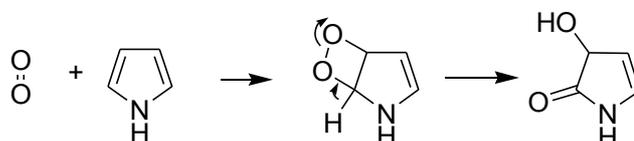


Abbildung 5.19: 1,2-Additionsreaktion mit Singulett-Sauerstoff nach Lightner¹⁵⁷

Die Oxidation von Arylpyrrolen wurde durch Dufraisse und Rio untersucht. Arylpyrrole werden auf andere Weise abgebaut als Alkylpyrrole. Sie begannen mit Arylfuranen, von denen sie nachwiesen, dass diese umso schneller Sauerstoff aufnehmen, je mehr Arylreste vorhanden und je verdünnter ihre Lösungen waren¹⁵⁸. Später betrachteten sie den Abbau von 2,3,4,5-Tetraphenylpyrrol¹⁵⁹ und 1,2,3,4,5-Pentaphenylpyrrol¹⁶⁰ genauer. Es handelte sich um Photooxidationsversuche unter Verwendung von Methyleneblau oder einem Anthrachinonderivat in

Methanol oder Chloroform (in Ether ließen sich diese Pyrrole nicht oxidieren). Dabei entstanden hauptsächlich die in Abbildung 5.20 (Pentaphenylpyrrol analog) dargestellten, aber auch weitere Produkte. Aufgrund der deutlich langsameren Reaktion als bei Alkylpyrrolen konnte in einigen Fällen das Pyrrolhydroperoxid isoliert und durch Erwärmung wieder in das Pyrrol zurücküberführt werden. Es soll darauf hingewiesen werden, dass sich ein Produkt bildete, bei dem ein Phenylrest von einer α - an eine β -Position wanderte (untere Reihe links), und eine Verbindung, bei welcher der Pyrrolring zwischen C2 und C3 geöffnet ist (untere Reihe rechts, Abbildung 5.20).

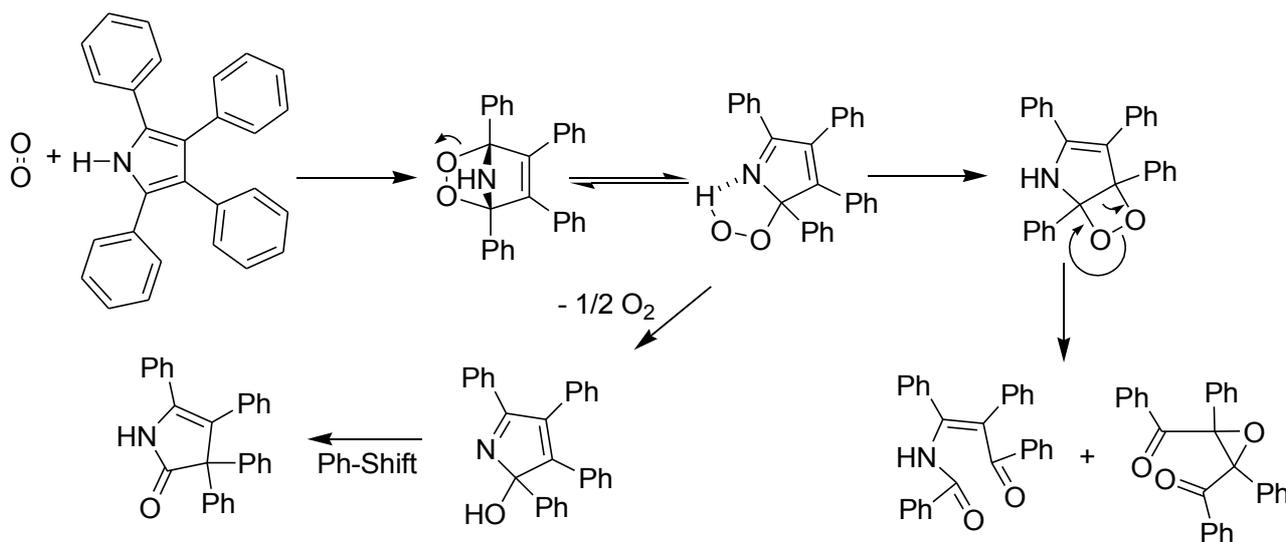


Abbildung 5.20: Produkte der Oxidation von 2,3,4,5-Tetraphenylpyrrol nach Rio¹⁵⁹. $1/2 O_2$ gibt es nicht. Die gesamte Reaktion läuft zweimal ab und es entsteht ein O_2 . Es wird nicht erklärt, wie das Zerfallsprodukt unten rechts aus dem Endoperoxid entstehen kann. Rio et al. fanden die Verbindung aber und geben sie in ihrem Schema an. Ein plausibler Mechanismus wird von Wasserman¹⁶¹ vorgeschlagen (siehe weiter unten).

Wasserman fand nach Oxidation von 2,3,4,5-Tetraphenylpyrrol in methanolischer Lösung als Hauptprodukt das 5-Methoxy-3,4-epoxid und ebenfalls die zwischen C2 und C3 geöffnete Verbindung¹⁶² (Abbildung 5.21).

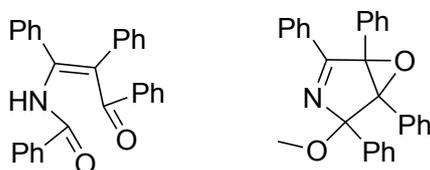


Abbildung 5.21: α -N-Benzoylamino- α' -benzoylstilben und 5-Methoxy-3,4-epoxy-2,3,4,5-tetraphenyl- Δ^1 -Pyrrolin als Produkte der Photooxidation von 2,3,4,5-Tetraphenylpyrrol in Methanol nach Wasserman¹⁶² (Benennung der Strukturen nach Wasserman).

Nach Kenntnis der Autorin dieser Arbeit gibt es nur eine einzige Veröffentlichung, welche sich mit dem Abbau eines Pyrrols, das Phenyl- und Alkylreste trägt, beschäftigt: Wasserman und Miller untersuchten bereits 1969 den Zerfall von 2,3,5-Triphenyl-1-methylpyrrol, welches eine große Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen besitzt¹⁶¹. Sie konnten nachweisen,

67 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

dass das N-Methylpyrrol unter Verlust des Stickstoffs zu *cis*-Dibenzoylstyrenoxid zerfällt. War der Stickstoff ebenfalls mit einem Phenylrest substituiert, entstand eine Mischung der beiden möglichen Schiffischen Basen. Sie vermuteten, dass der N-Methylrest während der Aufarbeitung hydrolysierte, während die N-Phenylgruppe stabil genug war, um unter den Bedingungen erhalten zu bleiben (Abbildung 5.22).

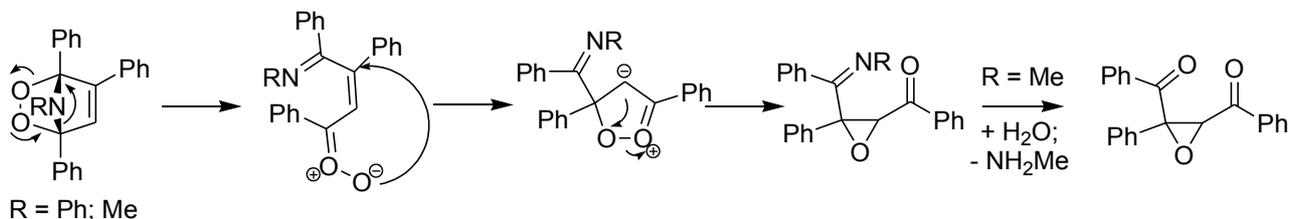


Abbildung 5.22: Von Wasserman¹⁶¹ vorgeschlagener Abbauweg für 2,3,5-Triphenyl-1-methylpyrrol und 1,2,3,5-Tetraphenylpyrrol zum offenkettigen Epoxid

Dass Epoxide entstehen, wurde durch IR-Untersuchungen bestätigt, in denen keine OH- oder C=O-Banden zu sehen waren, jedoch starke Banden um 900/cm, welche auf Epoxide hinweisen¹⁶³.

Wenn man die Untersuchungen von Rio, Lightner, Wasserman, Cooney und Foote zusammenfasst, kann man recht gut schlussfolgern, zu welchen Produkten die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen zerfallen.

5.2.7.2 LC-MS-Untersuchungen ausgewählter Verbindungen

Um Klarheit zu erhalten, zu welchen Produkten die Substanzen jeweils zerfallen, wurden Untersuchungen mit LC-MS durchgeführt (Agilent RP18 Säule, 12,5 cm; ESI-TOF MS). Bereits zum Teil zerfallene Substanzen wurden mit unterschiedlichen Gradienten chromatographisch aufgetrennt und danach mit dem Massenspektrometer detektiert (Methode siehe Kapitel 8.3).

Wie in Kapitel 5.2.6 bereits beschrieben, unterliegen Pyrrole einem Zerfall durch Oxidation mit Luftsauerstoff. An drei Beispielen soll der Zerfall näher beleuchtet werden: Am methylsubstituierten **72** (Typ B) für eine einfach alkylierte Verbindung, da es gut zerfällt und von dieser Verbindung zwei Zerfallsprodukte isoliert werden konnten, welche auch auf Estrogenität getestet wurden (**72a** und **72b**, siehe Kapitel 5.2.7.3 „Isolierte Zerfallsprodukte einer ausgewählten Verbindung“ und 6.3.8 „Estrogenitätstest“), an **54** (Typ A), da hier zwei Peaks im Chromatogramm besonders stark zunehmen und als Beispiel für den Zerfall dialkylierter Triarylpyrrole. Zuletzt Verbindung **88** (Typ B), da es sehr schnell zu sehr vielen Produkten zerfiel.

Die Massen bei der hochauflösenden Massenspektrometrie sollten auf 7 ppm genau sein. Die jeweiligen ppm-Werte werden mit der in Abbildung 5.23 gezeigten Formel berechnet.

$$\frac{\text{Masse}_{(\text{berechnet})} - \text{Masse}_{(\text{gefunden})}}{\text{Masse}_{(\text{gefunden})}} \cdot 10^6 = [\text{ppm}]$$

Abbildung 5.23: Formel zur Berechnung der ppm-Werte

5.2.7.2.1 LC-MS-Untersuchung von 54

Verbindung **54** wurde mittels LC-MS näher untersucht. Interessanterweise zerfällt diese Substanz im Massenspektrometer durch die angelegte Spannung und restliches O₂ wie in Abbildung 5.24 dargestellt.

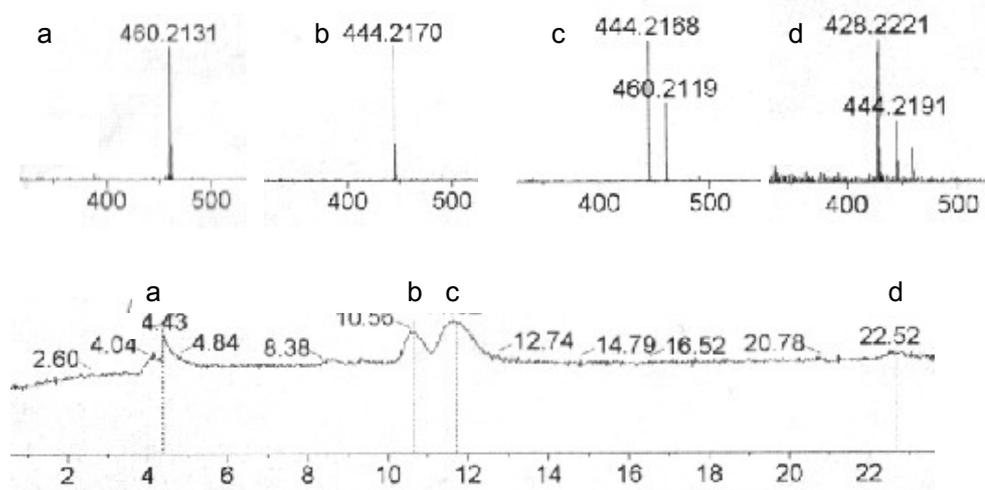


Abbildung 5.24: Oben: m/z der verschiedenen getrennten Verbindungen a-d, Peak d ist Verbindung **54**. Unten: Totalionenstrom während des ESI-TOF-Experiments

Der untere Teil von Abbildung 5.24 zeigt den Totalionenstrom während des MS-Experiments. Im oberen Teil sind die Massen der Verbindungen dargestellt. Bei Peak d handelt es sich um die Ursprungsverbindung. Die Peaks a, b und c werden durch hydrophilere Zerfallsprodukte verursacht.

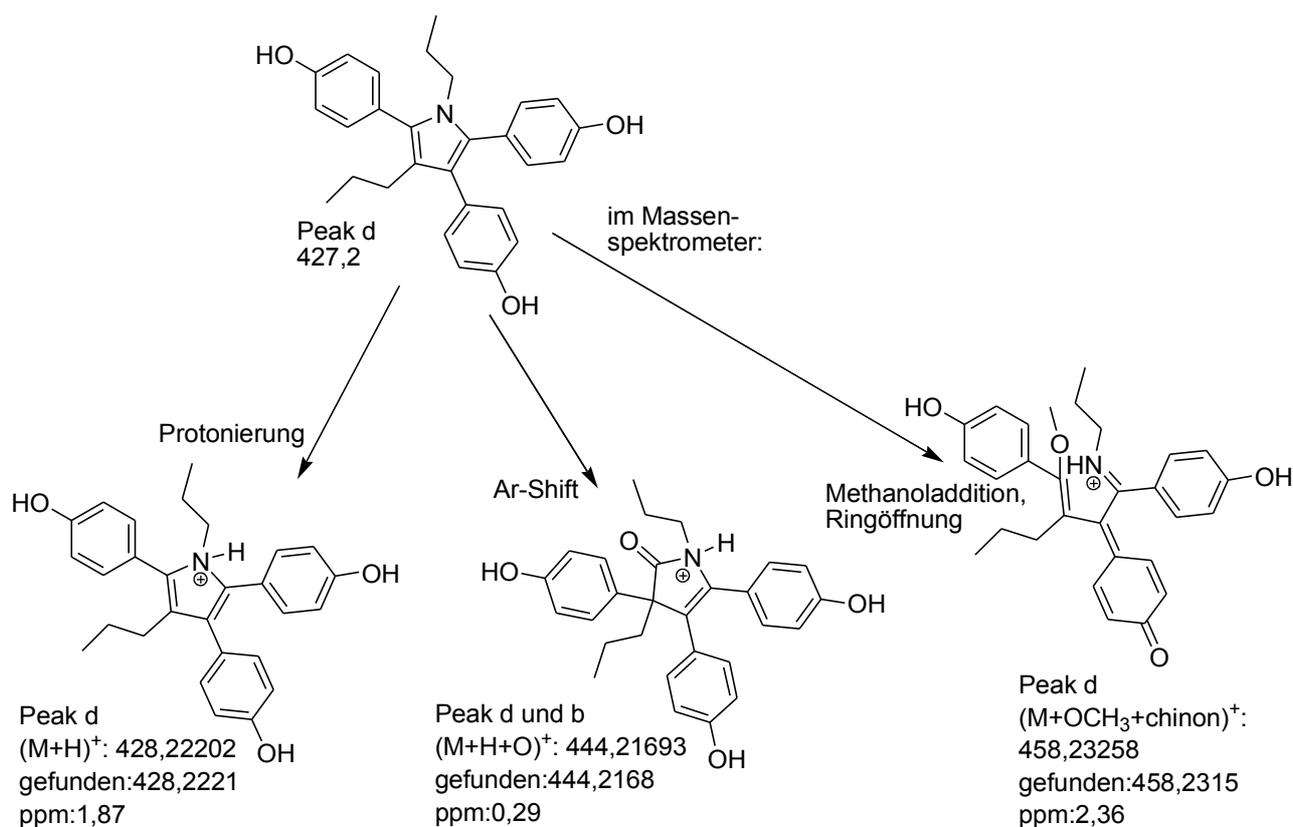


Abbildung 5.25: Zerfall von Verbindung **54** im Massenspektrometer. Die dargestellten Verbindungen sind nur stellvertretend für mehrere mögliche Isomere.

Die im Massenspektrometer stattfindenden Reaktionen der Ursprungsverbindung **54** sind in Abbildung 5.25 dargestellt. Der Peak mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) 428,2221 ist die Ausgangsverbindung mit einem Proton mehr, da bei ESI-TOF nur Kationen (oder, im negativen Modus, Anionen) detektiert werden. Bei 444,2191 m/z ist ein Sauerstoff hinzugekommen, wie bei den Substanzen von Rio¹⁵⁹ (siehe Kapitel 5.2.7.1, Abbildung 5.20). Hierbei muss ein Aromat umgelagert werden. Es ist nicht bekannt, welches der beiden möglichen Isomere vorliegt. In der Abbildung wurde die Form gewählt, von der die Autorin vermutet, dass sie aus sterischen Gründen bevorzugt sein könnte. Bei 458,2315 m/z wird eine Adduktbildung mit dem Lösungsmittel Methanol vermutet und eine Oxidation eines Aromaten zum Chinon. Die beiden großen Abbauproduktpeaks b und c (siehe Kapitel 5.2.2, Chromatogramme) haben zum einen ein m/z von 444,2170, was wiederum einem hinzugekommenen Sauerstoff entspricht, und zum anderen $m/z = 460,2119$. Letzterer Peak muss von einer Verbindung mit zwei zusätzlichen Sauerstoffen verursacht worden sein. Zur Struktur von Peak b wird der bereits in Abbildung 5.25, unten mittig, gezeigte Vorschlag gemacht, zu a und c die in Abbildung 5.26 gezeigten Vorschläge, analog zu den von Wasserman^{161, 162} gefundenen Produkten (Kapitel 5.2.7.1, Abbildungen 5.21 und 5.22). Ohne andere analytische Methoden, namentlich NMR-Spektrometrie, kann jedoch keine endgültige

Aussage über die Struktur getroffen werden. Peak a besitzt die gleiche m/z wie Peak c. Es liegen also vermutlich auch mehrere Isomere nebeneinander vor. Die ringoffenen Strukturen können jeweils auch an der anderen Seite geöffnet sein (z.B. könnte die Öffnung statt zwischen C4 und C5 zwischen C2 und C3 stattgefunden haben). Im Gegensatz zu den von Wasserman untersuchten Verbindungen¹⁶¹ hydrolysierten die Verbindungen jedoch nicht zum offenkettigen Epoxid (kein Verlust des Stickstoffs, siehe Kapitel 5.2.7.1, Abbildung 5.22)

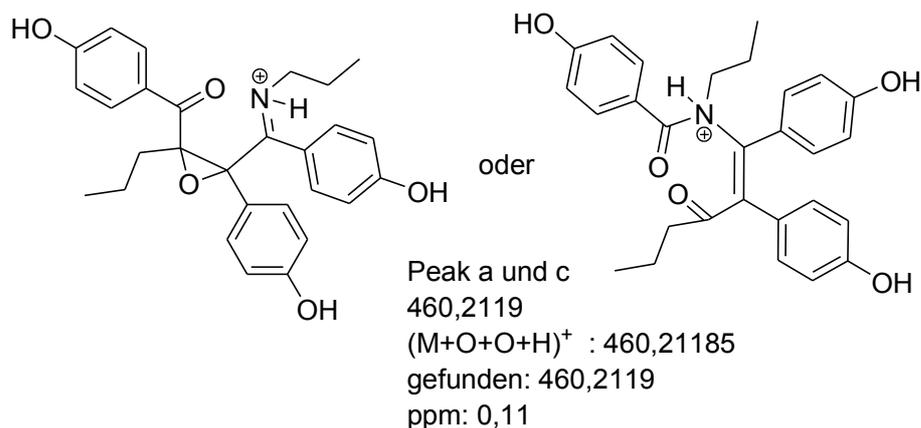


Abbildung 5.26: Mögliche Isomere für Peak a und c von Verbindung **54**. Die Ringöffnung kann auch auf der jeweils anderen Seite stattfinden

5.2.7.2.2 LC-MS-Untersuchung von **88**

Der Totalionenstrom während des MS-Experiments und die m/z-Werte der sehr stark zerfallenden Verbindung **88** sind in Abbildung 5.27 gezeigt.

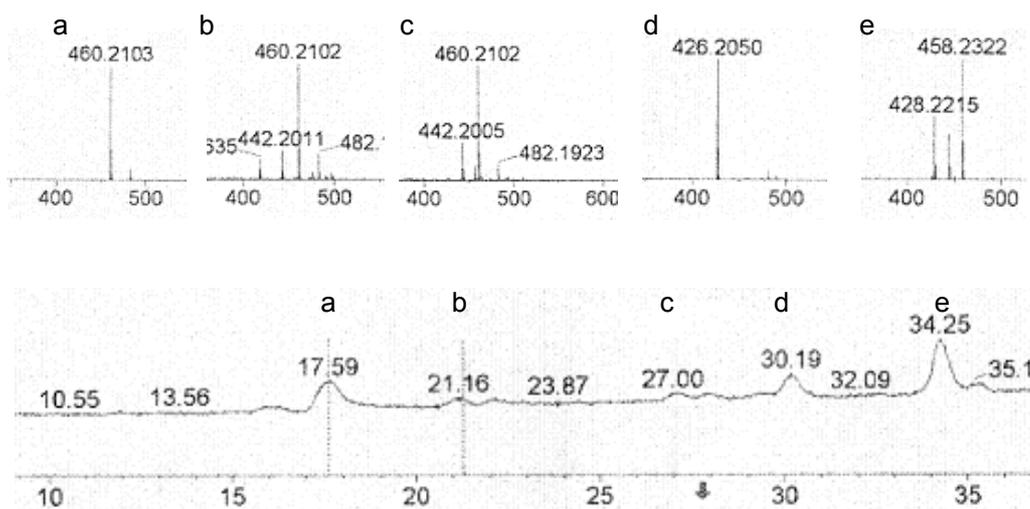


Abbildung 5.27: Oben: m/z der verschiedenen getrennten Verbindungen a-e. Peak e ist Verbindung **88**. Unten: Totalionenstrom während des ESI-TOF-Experiments

Man sieht, dass auch hier im Massenspektrometer selbst ein Zerfall der Ausgangsverbindung (Peak e) zu zwei weiteren Produkten stattfindet. Diese Produkte sind analog zu denen bei

71 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

Verbindung **54** und in Abbildung 5.28 dargestellt. Hierbei gilt ebenfalls, dass statt dem dargestellten zwischen N1 und C5 geöffneten Isomer auch das zwischen N1 und C2 geöffnete Isomer entstanden sein kann.

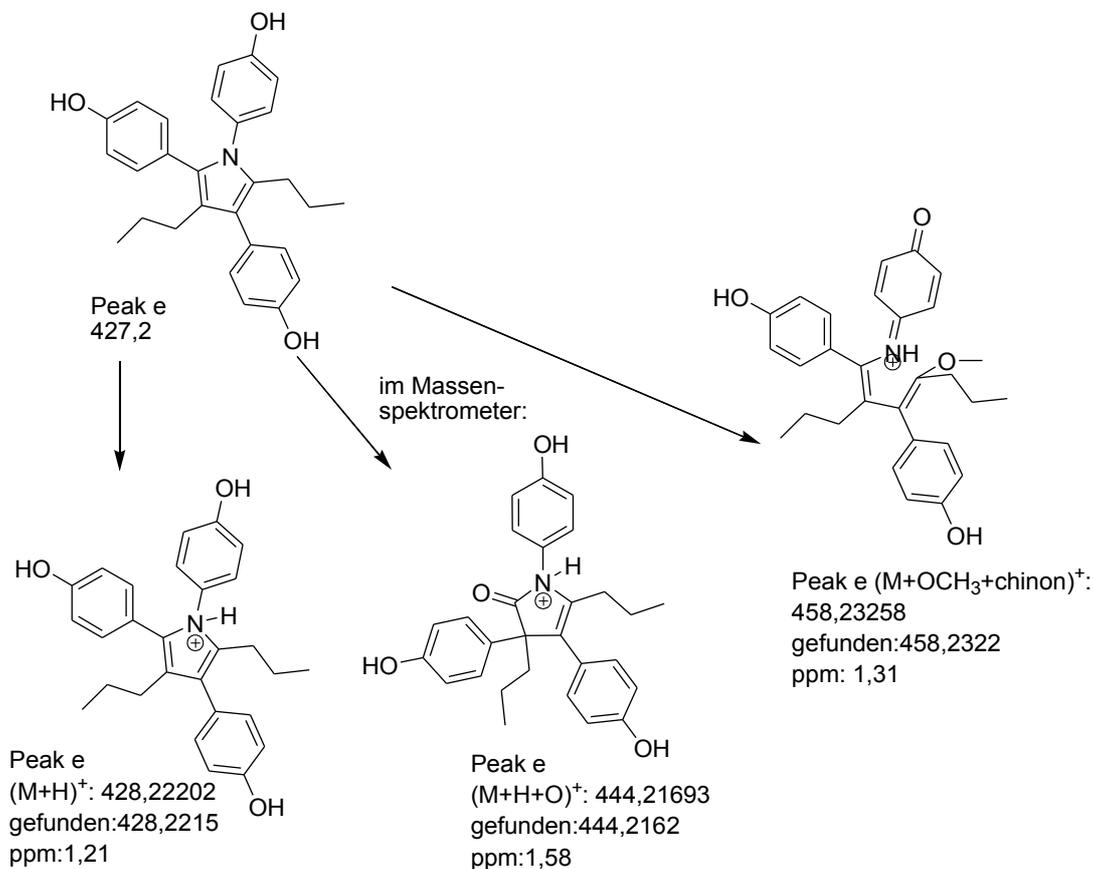


Abbildung 5.28: Zerfall von Verbindung **88** im Massenspektrometer. Es können jeweils auch die an der anderen Seite geöffneten Isomere entstehen.

Es gibt einen weiteren Peak mit m/z 426,2050, welcher durch die Bildung eines Chinonimins erklärt werden kann (Abbildung 5.29). Bei Verbindung **88** wurden drei Peaks mit m/z 460,2103 gefunden. Hier entstehen offensichtlich mehrere Isomere (Abbildung 5.29). Auch hier kann jeweils wieder das zwischen N1 und C2 oder N1 und C5 geöffnete bzw. das zwischen C2 und C3 oder C4 und C5 geöffnete Isomer entstanden sein.

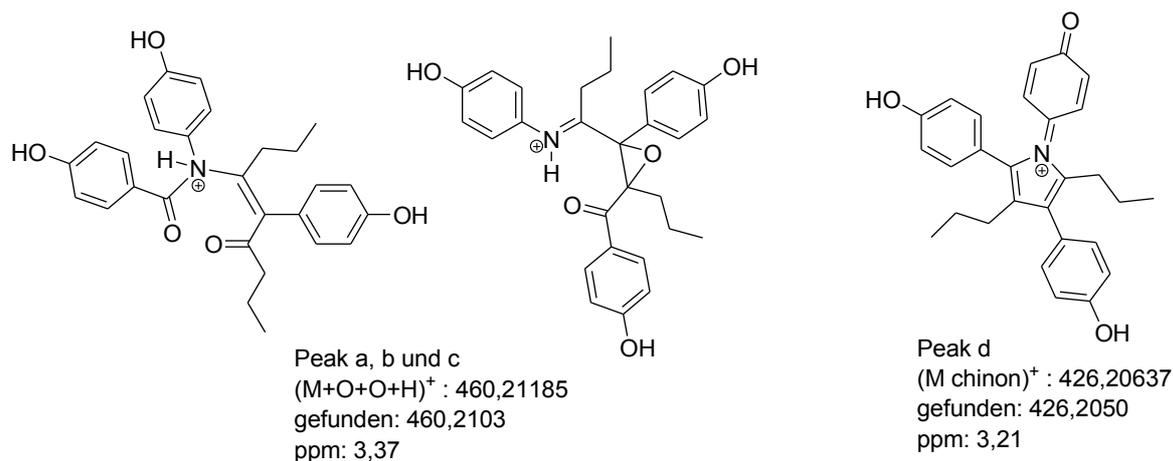


Abbildung 5.29: Für die drei Peaks a, b und c müssen mehrere Isomere verantwortlich sein: Die beiden linken Strukturen können auch an der jeweils anderen Seite geöffnet sein.

Zur weiteren Aufklärung wurde ein LC-MS/MS-Experiment durchgeführt¹⁶⁴, leider zerfielen alle Zerfallsprodukte mit der gleichen Masse auch in die gleichen Fragmente, so dass durch die Fragmentation keine Zuordnung zu verschiedenen Isomeren getroffen werden konnte.

5.2.7.2.3 LC-MS-Untersuchung von 72

Die letzte Verbindung, welche hier besprochen werden soll, ist **72**. In Abbildung 5.36 sind die Massen der einzelnen Peaks und der Totalionenstrom während des MS-Experiments dargestellt. Aufgrund von Störungen an der LC-MS-Anlage (große Mengen Weichmacher) konnten die Massen nicht so genau bestimmt werden wie bei den anderen Verbindungen. Alle Massen sind etwa 13 ppm höher als die berechneten. Daher ließ man eine Kalibrierlösung mit bekannten Massen mitlaufen und bezog die gefundene Masse von **72** auf diese. Ohne die Kalibrierlösung fand man für Verbindung **72** die in Abbildung 5.30 gezeigte Masse von m/z : 358,1483. Die berechnete Masse ist: m/z 358,14377. Die Abweichung ist damit 12,6 ppm. Mit Kalibrierlösung wurde die Masse m/z 358,1435 gefunden, was einer Abweichung von nur 0,8 ppm entspricht. Da die Struktur von **72** bewiesen ist, wird davon ausgegangen, dass alle Massen etwa 13 ppm zu hoch gemessen wurden. Für Verbindung **74**, das propylsubstituierte Analogon, wurden die korrekten Massen gefunden (Daten nicht gezeigt, da von den Zerfallsprodukten dieser Verbindung keine weitere Analytik und vor allem kein Test auf estrogenen Wirkung durchgeführt wurde (siehe Kapitel 6.3)).

73 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

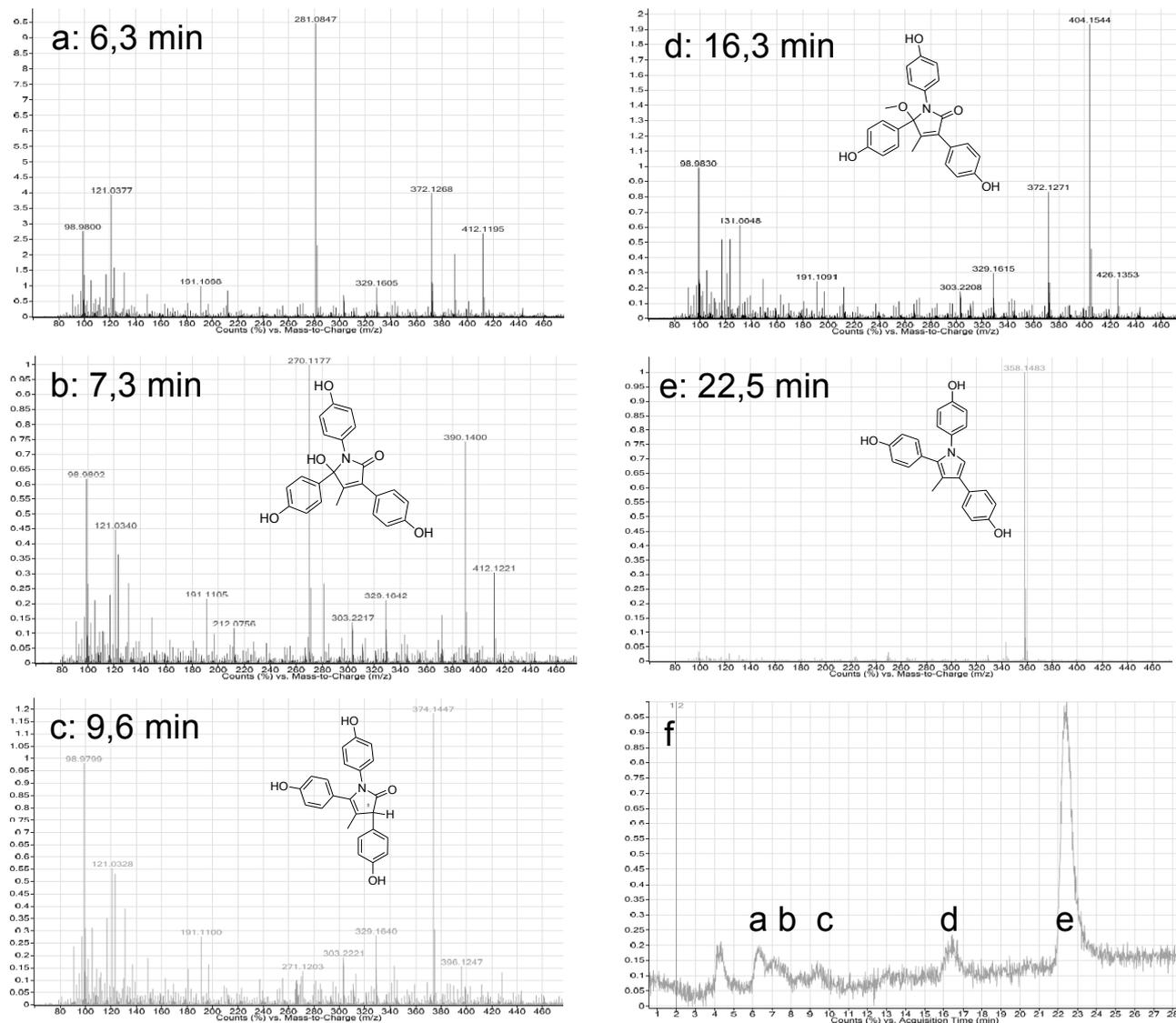


Abbildung 5.30: LC-MS von Verbindung **72**: a und b: das bei b dargestellte Isomer mit zwei hinzuaddierten Sauerstoffen oder sein offenkettiges Analogon (**72***). c: Substanz mit nur einem hinzuaddierten Sauerstoff, Besprechung der möglichen Isomere siehe Text. Diese Substanz konnte isoliert werden (**72a**). d: Methanoladdukt, es konnte ebenfalls isoliert werden (**72b**), Erläuterung im Text weiter unten. e: Ursprungsverbindung **72**. f: Totalionenstrom während des ESI-TOF-Experiments.

5.2.7.3 Isolierte Zerfallsprodukte einer ausgewählten Verbindung

Von zwei Zerfallsprodukten der Verbindung **72** konnte genug Material isoliert werden, um neben LC-MS-Untersuchungen noch NMR- und IR-Spektren aufzunehmen. Ausschnitte dieser Spektren sind in Abbildung 5.31 und Abbildung 5.32 dargestellt. Zerfallsprodukt **72a** zeigte eine Masse von m/z: 374,1447, Zerfallsprodukt **72b** von m/z 404,1544. Bei einem dritten Zerfallsprodukt (**72***) reichte die isolierte Menge (0,67 mg) nur für ein Massenspektrum (m/z: 390,1400), es wurde versucht, mit dieser Menge ein NMR- und IR-Spektrum aufzunehmen. Dies gelang nicht, jedoch

wurde die Lösung der Verbindung in DMSO(D6) für die Verdünnungsreihe des Estrogenitätstests verwendet, siehe Kapitel 6.3.8.

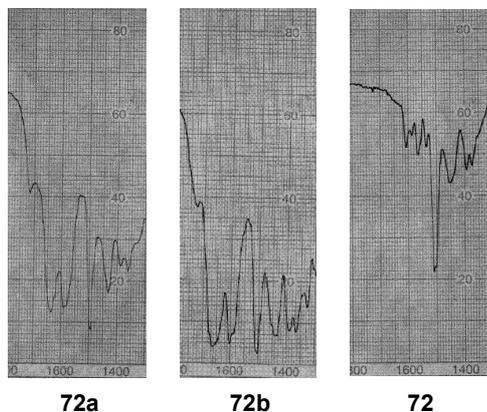


Abbildung 5.31: Ausschnitte der IR-Spektren von Verbindung **72** und Abbauprodukten. Bei **72a** und **72b** sind deutlich sichtbar zwei starke Banden bei 1600 und 1660 hinzugekommen. Diese sind „C=O“-Banden.

Es ist aus den IR-Spektren deutlich erkennbar, dass eine C=O-Doppelbindung im Molekül hinzugekommen ist (Abbildung 5.31). Aus den Untersuchungen unter Sauerstoffausschluß geht hervor, dass Sauerstoff das reaktive Agens sein muss (Kapitel 5.2.7.2). Aus den ESI-TOF-Untersuchungen ist klar, dass bei **72a** ein Sauerstoff und bei **72b** ein Sauerstoffatom und eine Methoxygruppe hinzugekommen sein müssen.

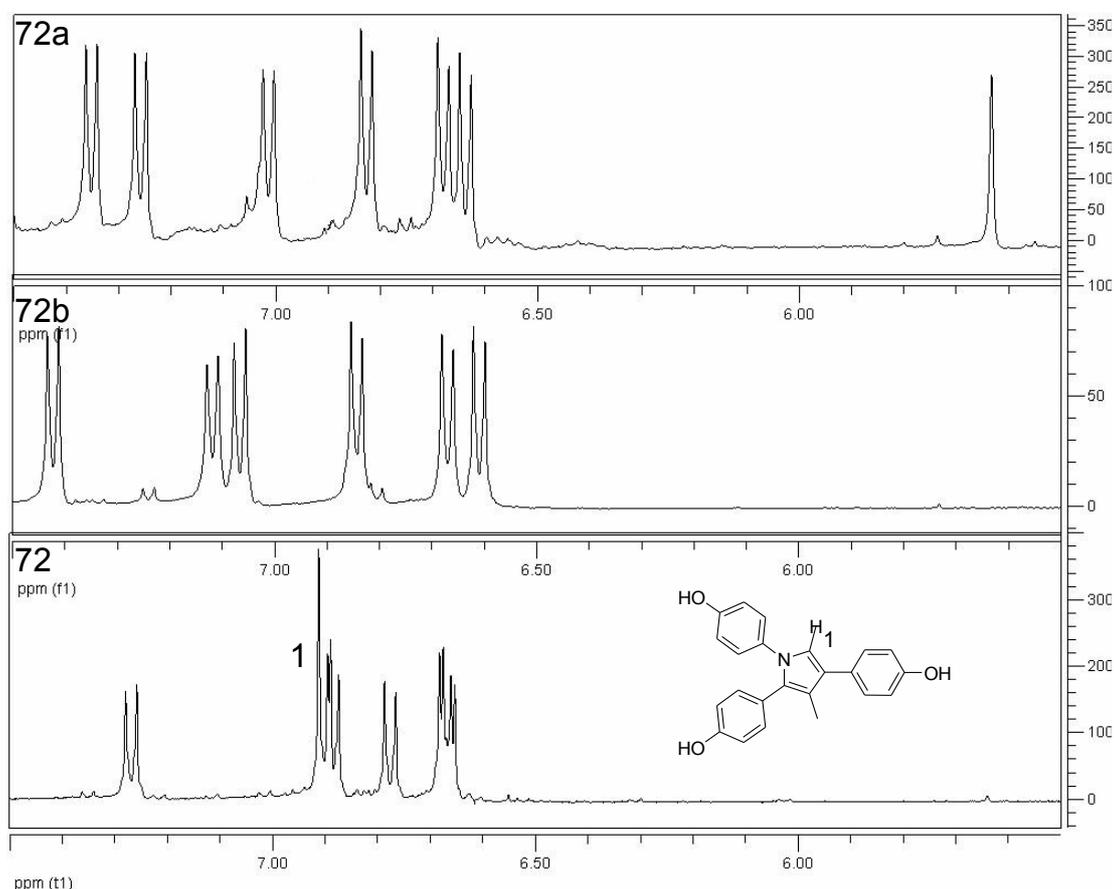


Abbildung 5.32: Ausschnitt des NMR-Spektrums von **72a**, Ausschnitt des NMR-Spektrums von **72b**, Ausschnitt des NMR-Spektrums von **72**. Alle NMR-Spektren aufgenommen in DMSO-D6. Erläuterung im Text

75 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

Das Original-NMR von Verbindung **72** weist im Aromatenbereich drei AA'BB'-Systeme und ein Singulett des Pyrrolprotons auf (Abbildung 5.32). Bei Abbauprodukt **72b** ist kein Pyrrolproton mehr im Spektrum zu sehen und auch die AA'BB'-Systeme sind recht stark verschoben. Außerdem ist bei 3,2 ppm ein Singulett mit 3 Protonen aufgetaucht (Teil des Spektrums nicht gezeigt). Zusammen mit dem Ergebnis der ESI-TOF Untersuchung von 404,1544 m/z ergibt sich die Struktur von **72b** wie in Abbildung 5.33 gezeigt. Es findet eine Adduktbildung mit Methanol statt.

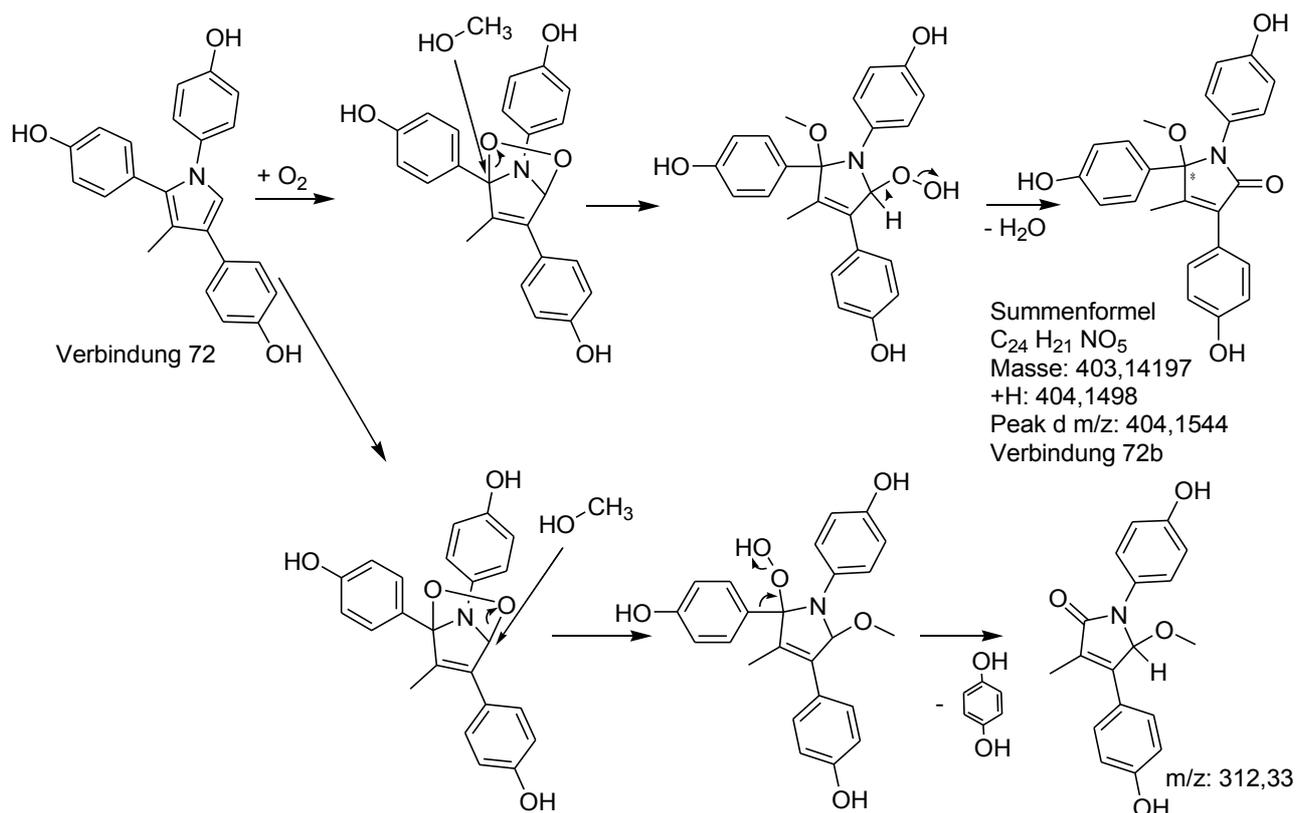


Abbildung 5.33: Oxidation durch Luftsauerstoff von Verbindung **72** und Reaktion mit Lösungsmittelmethanol zu **72b** (Mechanismus nach Quistad¹⁵⁵). Bei Angriff des Methanols auf der anderen Seite würde statt Wasser der Aromat eliminiert und es entstünde eine Verbindung mit m/z: 312,33. Diese Masse wurde in den Untersuchungen nicht gefunden.

Diese Reaktion kann natürlich statt mit Methanol auch mit Wasser oder als intramolekulare Umlagerung stattfinden (siehe Kapitel 5.2.7.1). Es wird vermutet, dass das entsprechende Produkt (OH anstelle von OCH₃) sich auch in der Mischung befindet, jedoch konnte es nicht isoliert werden. Die entsprechende Masse wurde bei der LC-MS-Untersuchung auch gefunden, siehe Abbildung 5.30, a und b. Es wäre möglich, dass es sich bei Produkt **72*** (5-Hydroxy-2,5-dihydro-pyrrol-2-on) um die in Abbildung 5.30 a und b dargestellte Verbindung handelt, diese könnte nach dem von Lightner vorgeschlagenen Mechanismus entstanden sein^{143, 145}. Das Methanoladdukt **72b** entsteht im Zelltest allerdings wahrscheinlich nicht, da dort kein Methanol verfügbar ist.

Bei Abbauprodukt **72a** ist das Pyrrolproton aus dem Aromatenbereich hochfeldverschoben. Hydroxy- und Methylgruppen sind kaum verändert (Teil des Spektrums nicht gezeigt). Die Masse

von **72a** ist 374,1447 m/z, was einem hinzugekommenen Sauerstoff zur Ausgangsmasse von **72** entspricht. Aus den Erläuterungen in Kapitel 5.2.7.1 geht hervor, dass die in Abbildung 5.34 dargestellten Isomere entstanden sein können:

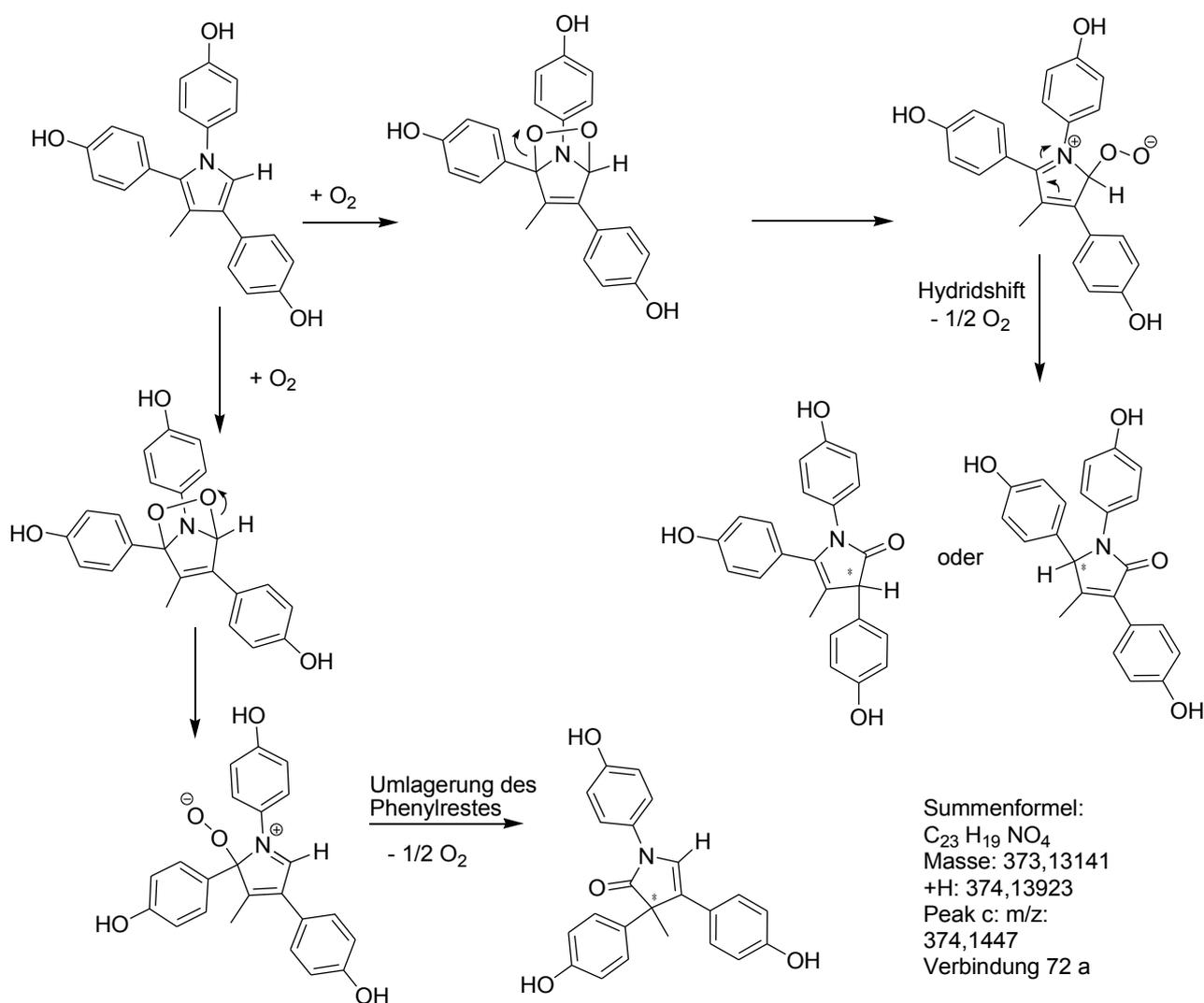


Abbildung 5.34: Mögliche Strukturen von Verbindung **72a**. Erläuterung im Text. $\frac{1}{2} O_2$ gibt es nicht. Die gesamte Reaktion läuft zweimal ab und es entsteht ein O_2 .

Aufgrund der 1H -NMR-, IR- und Massenspektren der Verbindung kann keine eindeutige Zuordnung gemacht werden. Zur genaueren Charakterisierung böte sich ein NOE- oder H,H-NOESY-(*nuclear Overhauser enhancement experiment*) Spektrum an, bei welchem man die Kopplungen des Pyrrolprotons über den Raum mit anderen Protonen sähe. So könnte zumindest das Produkt, bei welchem eine Umlagerung des Phenylrestes stattfindet, von den anderen unterschieden werden. Bei den beiden isolierten Abbauprodukten fielen jeweils etwa 2 mg an. Mit diesen wurde dann jeweils nacheinander ein IR aufgenommen und die Substanz wieder aus dem KBr-Pressling ausgeschüttelt, dann ein NMR aufgenommen und die resultierende (D6)DMSO-Lösung für die

77 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

Verdünnungen im Estrogenitätstest weiterverwendet. Aus diesem Grund war es leider nicht möglich, weiterführende NMR-Untersuchungen durchzuführen.

Im Übrigen soll darauf hingewiesen werden, dass bei diesem Abbau sowohl zu **72a** als auch **72b** von jeder möglichen Substanz vermutlich das Razemat entsteht, da durch die Oxidation das konjugierte planare System verlorenght und sich ein chirales Zentrum bildet (in den Abbildungen 5.33 und 5.34 mit Sternchen markiert).

Steht eine α -Position des Pyrrolrings zur Verfügung, wird diese für die Anlagerung genutzt. Bei den von Dufraisse und Rio^{158, 159} untersuchten Verbindungen musste eine Umlagerung des Phenylrestes stattfinden, da alle Positionen besetzt waren und sich sonst keine Carbonylfunktion hätte ausbilden können. Da dies im vorliegenden Fall nicht nötig ist, ist es wahrscheinlicher, dass eine der beiden verbleibenden Möglichkeiten entsteht. Bei Verbindung **72b** könnte theoretisch der Angriff des Methanols auch auf der anderen Seite stattfinden. Dann würde statt Wasser der Aromat eliminiert und es entstünde eine Verbindung mit m/z : 312,33. Diese Masse wurde in den Untersuchungen nicht gefunden (Abbildung 5.33). Letztlich sind in der komplexen Mischung wahrscheinlich sowieso alle möglichen Isomere vorhanden.

Nachdem die Strukturen der Abbauprodukte teilweise aufgeklärt werden konnten, stellt sich noch die Frage, wie man den Zerfall verhindern kann.

5.2.8 Beeinflussung der Stabilität durch Substituenten

Die Stabilität von substituierten Pyrrolen kann durch verschiedene Maßnahmen erhöht werden.

1) Alkylierung des Stickstoffs

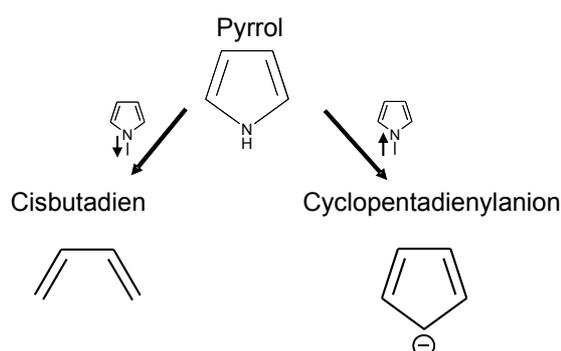


Abbildung 5.35: Pyrrol verhält sich bei elektronenziehenden Substituenten am Stickstoff eher wie Cisbutadien, bei elektronenschiebenden Substituenten eher wie Cyclopentadienylanion.

Bei der Substitution des Stickstoffs mit drei verschiedenen Alkylresten wurde gefunden, dass Pyrrole umso schneller abgebaut werden, je kürzer der Alkylrest am Stickstoff ist: Das 1-Methylpyrrol nahm Sauerstoff am schnellsten auf, das 1-Isopropylpyrrol langsamer und das 1-

Butylpyrrol am langsamsten¹⁶⁵. Eine längere Alkylkette scheint den Abbau zu verlangsamen, indem sie den Angriff des Sauerstoffs an den α -Positionen sterisch hindert^{165, 166}. Substitution des Protons am Stickstoffs durch einen elektronenziehenden Substituenten steigert den Diencharakter des Pyrrols und erhöht die Wahrscheinlichkeit von Diels-Alder-Reaktionen. Je stärker der Elektronenzieher am Stickstoff, desto mehr gehört das nichtbindende Elektronenpaar dem Heteroatom, wird also nicht in den Ring delokalisiert. Das Pyrrol ist daher weniger aromatisch und mehr cisbutadienartig. Bei einem Elektronenschieber ist es genau umgekehrt: Das π -Elektronensystem ist delokalierter, das Pyrrol verhält sich mehr als Hückelaromat, und damit eher wie ein Cyclopentadienylanion, d.h. weniger bereit, als Dien zu reagieren¹¹⁶ (Abbildung 5.35).

Aus diesen Gründen sind die Typ A-Pyrrole, welche nur einen Alkylrest am Stickstoff tragen, viel stabiler als die analogen Typ B-Pyrrole (Abbildung 5.36).

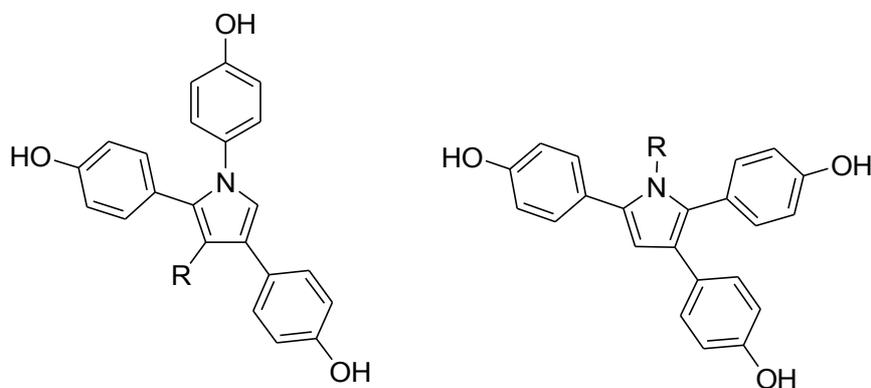


Abbildung 5.36: Links: Typ B-Pyrrol. Rechts: Typ A-Pyrrol. Typ A-Pyrrole sind stabiler, da der N-Alkylrest durch seinen +I-Effekt den aromatischen Charakter des Pyrrols verstärkt und es weniger cisbutadienartig reagiert (R = Alkylkette).

2) Elektronenziehende Substituenten an den Kohlenstoffen des Pyrrolrings

Elektronenschiebende Substituenten (zum Beispiel Alkylketten) an den C-Atomen erhöhen die Elektronendichte am Ring. Daraufhin ist der Angriff von Elektrophilen an den α -Positionen erleichtert¹⁴². Es wurde gefunden, dass C-Alkylpyrrole sehr viel schneller abgebaut werden als N-Alkylpyrrole¹⁶⁵. Elektronenziehende Substituenten an den Kohlenstoffen des Pyrrolrings, wie etwa Carboxy- oder Formylgruppen, erschweren den Abbau^{148, 167}.

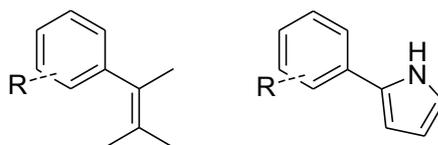


Abbildung 5.37: Das Olefin Trimethylstyren reagiert ebenfalls mit Sauerstoff in der „ene-Reaktion“ (diese entspricht der Diels-Alder-Reaktion bei Dienen)¹⁴⁶, Vergleich des Olefins mit 2-Arylpyrrol

79 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

Dabei verändern auch elektronenziehende Substituenten in den Aromaten die Reaktionskonstante mit Sauerstoff. Foote und Mitarbeiter machten Versuche mit verschiedenen Trimethylstyrenen, welche als Monoalkene mit Sauerstoff in der sogenannten „ene-Reaktion“ reagieren. Diese Reaktion entspricht der Diels-Alder-Reaktion bei Dienen. Die Trimethylstyrene reagierten unterschiedlich schnell mit Sauerstoff (Abbildung 5.37 und Vergleich mit 2-Arylpyrrol). Elektronenziehende Substituenten im Aromaten wirkten sich hierbei verringernd auf die Reaktionsrate aus¹⁴⁶.

Besonders stark vom Abbau betroffen sind Pyrrole, bei denen die β -Positionen alkyliert sind^{143, 155}. Nichtalkyliertes Pyrrol reagiert auch deutlich langsamer mit Sauerstoff als an den Kohlenstoffen Alkyliertes¹⁶⁷.

Deswegen zerfallen auch diejenigen Pyrrole, die zwei Alkylketten tragen. Dies ist dem +I-Effekt der Alkylgruppen an Ringkohlenstoffen geschuldet, welche den Pyrrolring leichter durch Luftsauerstoff angreifbar machen (Abbildung 5.38).

So lässt sich auch erklären, dass die in den Aromaten mit Chlor oder Fluor substituierten Typ A-Pyrrole noch stabiler sind, denn durch den -I-Effekt der Halogenide wird die Elektronendichte am Pyrrolring erniedrigt und dadurch die Reaktion mit O_2 erschwert.

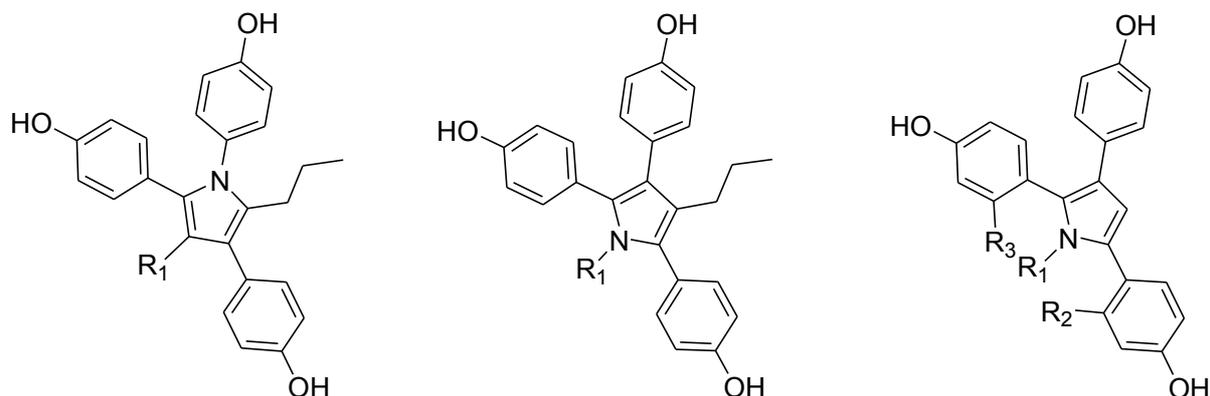


Abbildung 5.38: Links: Typ B-Pyrrol mit zwei Alkylresten, Mitte: Typ A-Pyrrol mit zwei Alkylresten, rechts: Typ A-Pyrrol mit einem Alkylrest und Chlor oder Fluor in R_2 oder R_3 . (R_1 = Alkylrest). Die beiden linken Pyrrole sind sehr instabil, da die Alkylketten durch ihren +I-Effekt die Elektronendichte am Ring erhöhen. Das rechte Typ A-Pyrrol trägt elektronenziehende Substituenten in seinen Aromaten. Es ist dadurch stabiler.

3) Sterisch anspruchsvolle Substituenten in den α (= 2 und 5)-Positionen: Sind die 2- und 5-Positionen des Pyrrols unbesetzt, werden die Pyrrole schneller abgebaut¹⁶⁸. Einfache Alkylpyrrole können nur durch das Durchleiten von Sauerstoff durch ihre Lösungen schnell und leicht oxidiert werden¹⁶⁵. Bei α -Arylpyrrolen hingegen reicht dies nicht aus, es muss mit einem Sensitizer und Licht¹⁶² oder in stark basischer Lösung¹⁵⁹ gearbeitet werden. Anscheinend behindern sterisch anspruchsvolle Substituenten in α -Position den Angriff des Sauerstoffs, wobei unklar ist, weswegen, denn das Pyrrol ist ja planar. In Methanol wurde bei verschiedenen *tert*-Butylpyrrolen gefunden, dass sie am schnellsten abgebaut werden, wenn der Alkylrest sich in der β -Position

befindet¹⁴¹. In α -Position substituierte *tert*-Butylpyrrole wurden langsamer, am langsamsten aber am Stickstoff substituierte Pyrrole abgebaut. Für Aceton als Lösungsmittel ließ sich allerdings diese Korrelation nicht feststellen.

Bei den Typ A-Pyrrolen befinden sich an den α -Positionen große aromatische Reste, welche den Angriff von Luftsauerstoff erschweren. Alkylsubstituenten am Stickstoff stabilisieren das Pyrrol, Chlor oder Fluor in den Aromaten ebenfalls (Abbildung 5.39).

Somit besitzen Typ A-Pyrrole mit nur einem Alkylrest und mit Chlor oder Fluor in den Aromaten das ideale Substitutionsmuster hinsichtlich der Stabilität. Aus diesem Grund sollte dieses Muster weiter verfolgt werden.

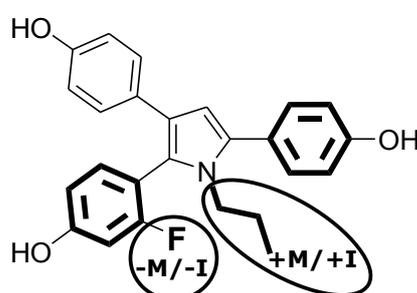


Abbildung 5.39: Zusammenfassung der Eigenschaften, welche die Stabilität von Triarylpyrrolen erhöhen. Erklärung siehe Text.

5.3 Verhalten einer ausgewählten Verbindung gegenüber Singulett-Sauerstoff

Es sollte untersucht werden, ob tatsächlich Singulett-Sauerstoff das angreifende Agens ist.

Da die Untersuchung der Zerfallsprodukte ebenfalls mit Verbindung **72** durchgeführt worden war, wurde sie für diese Untersuchung ebenfalls ausgewählt.

Eine Lösung von Verbindung **72** wurde durch eine Methode von Higgins et al. mit chemisch generiertem Singulett-Sauerstoff begast¹⁶⁹. Zu einer auf etwa 10°C gekühlten 35%igen H₂O₂-Lösung wurde Natriumhypochloritlösung getropft und das entstehende Gas in eine Lösung von **72** in Methanol eingeleitet. Dabei entsteht aus NaOCl und H₂O₂ Singulett-Sauerstoff (Abbildung 5.40)

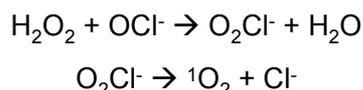


Abbildung 5.40: Entstehung von Singulett-Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit. Nach Ohloff¹⁷⁰

In einer Untersuchung von Cooney mit unsubstituiertem Pyrrol wurde bei einem ähnlichen Versuch beobachtet, dass sich die Absorption des Pyrrols im Bereich von 200 bis 260 nm verstärkte und sich eine Schulter bei 280 nm ausbildete, welche sich durch Begasung mit Stickstoff wieder

81 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

zurückbildete¹⁴⁷. Pyrrol ohne Substituenten absorbiert in diesem Bereich und hat sein Maximum bei 220 nm, während die hier untersuchten Triarylpyrrole ihr Maximum bei 265 oder 275 nm haben. Die Abschwächung der Absorption durch Stickstoffbegasung konnte in den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht beobachtet werden. Durch die Begasung mit Singulett-Sauerstoff wurde die Absorption bis zu einem gewissen Zeitpunkt stärker (siehe Abbildung 5.41, Beispiel zweier Untersuchungen), um dann wieder abzunehmen. So könnte man auch das Verhalten der N-arylierten, monoalkylierten Pyrrole bei der Bestimmung der Sättigungslöslichkeit erklären (siehe Kapitel 5.4, „Bestimmung der Sättigungslöslichkeit“). Diese Untersuchung wurde vier Mal durchgeführt, wobei jedes Mal unterschiedliche Spektren entstanden und die Veränderung auch nach unterschiedlicher Zeit (1 bis 24 h) einsetzte. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Singulett-Sauerstoffentstehung schwer zu steuern war: Die Gasentwicklung war immer unterschiedlich. Allerdings fanden auch Cooney und Hazlett in ihren Untersuchungen, dass sie die Absorptionsspektren nicht exakt replizieren konnten¹⁴⁷. In den hier durchgeführten Untersuchungen war eine Gemeinsamkeit, dass die Lösungen am Ende immer schwach gelblich gefärbt waren. Zudem ließen sich die Veränderungen, im Gegensatz zur zitierten Untersuchung, nicht durch das Einleiten von Stickstoff rückgängig machen (die Autoren merken dazu an, dass die Reinheit des verwendeten Stickstoffes eine Rolle spielte). Die Lösungen der UV-Untersuchung wurden auch mittels HPLC vermessen (Bedingungen siehe Kapitel 5.3 und 8.3). Jedoch erschienen in den Chromatogrammen noch keine zusätzlichen Peaks, lediglich die Peakhöhe nahm zuerst zu und dann ab (Daten nicht gezeigt). Durch Stehenlassen einer Kontrolllösung unter gleichen Bedingungen ohne Durchleiten des Singulett-Sauerstoffs veränderte sich das UV/Vis-Spektrum nicht. Durchleiten von Singulett-Sauerstoff durch eine reine Methanollösung führte nur zu einer sehr geringen Veränderung des Methanolspektrums im Bereich von 230nm. Es ist also vermutlich Singulett-Sauerstoff am Abbau der Pyrrole beteiligt.

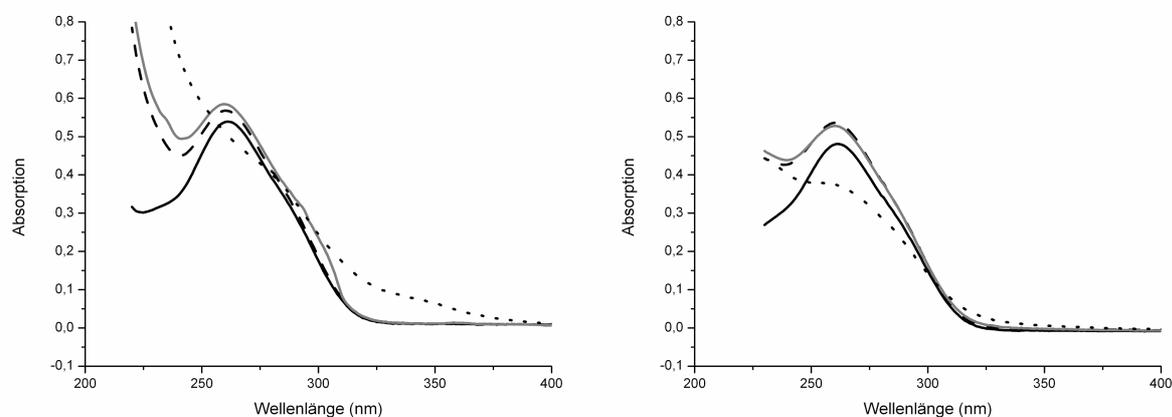


Abbildung 5.41: Beispiel zweier UV-Untersuchungen von Verbindung 72, zuerst Zunahme, dann Abnahme der Absorption. Bei dem links abgebildeten Versuch bildete sich eine Schulter aus, beim rechten nicht. Links: — t₀, - - t₁ (5h), — t₂ (9 h),t₃ (14 h). Rechts: — t₀, - - t₁ (1 h), — t₂ (2 h),t₃ (3 h)

5.4 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Da sich im Test auf estrogenen Aktivität ein Unterschied zwischen den Typ A- und Typ B-Triarylpyrrolen (siehe Kapitel 6.3) gezeigt hatte, sollte der Frage nachgegangen werden, ob der Grund für diesen Unterschied verschiedene Sättigungslöslichkeiten sein konnten. Im Test erreichten die Typ B-Pyrrole 100% Aktivierung, die Typ A-Pyrrole jedoch nur etwa 65%. Falls die Typ A-Triarylpyrrole nämlich im Testmedium ausfallen sollten, könnte es sein, dass sie eine geringere Wirkung erzielen als die Typ B-Triarylpyrrole. Es wurden Pyrrole ausgesucht, von denen vermutet wurde, dass sie eine eher geringe Sättigungslöslichkeit haben (längere Alkylkette, zwei Alkylketten, Fluor- oder Chlorsubstitution, Abbildung 5.42).

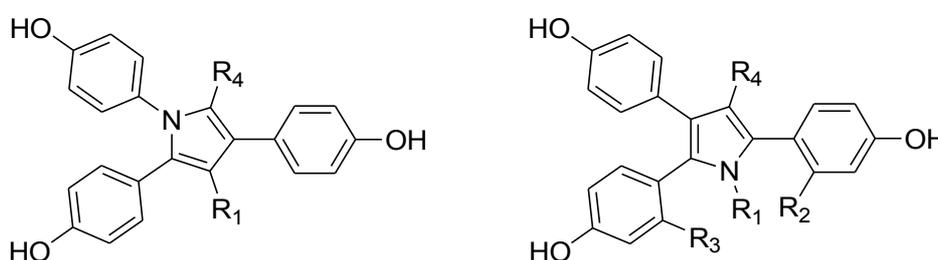


Abbildung 5.42: Typ B-(links) und Typ A-Pyrrole (rechts), von welchen die Sättigungslöslichkeit bestimmt wurde. Reste siehe Tabelle.

Die Verbindungen wurden in DMEM sine mit 0,1 % DMSO (Konzentration des DMSO wie im Zelltest) soweit gelöst, dass noch ein Bodensatz verblieb. Es wurde zentrifugiert, die überstehende Lösung vorsichtig abpipettiert und mit PBS verdünnt, bis die verdünnte Lösung eine Absorption im Lambert-Beerschen Bereich zeigte. Für die Kalibriergeraden der Verbindungen wurden diese in Methanol gelöst und mit PBS verdünnt (Methode siehe Kapitel 8). Die Absorption wurde jeweils im Absorptionsmaximum bestimmt (siehe Kapitel 5.1 „UV/Vis-spektrometrische Untersuchungen“).

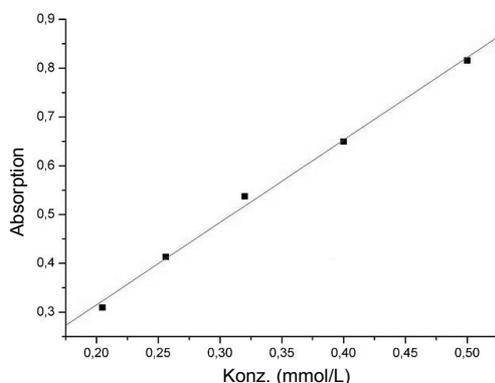


Abbildung 5.43: Kalibriergerade der UV-Untersuchung für Verbindung 74

83 5 Untersuchung physikochemischer Eigenschaften ausgewählter Pyrrole

Verbindung	Sättigungslöslichkeit (mmol/L)	Reste
74	1,00	Typ B, R ₁ : Propyl R ₄ : H
88	0,27	Typ B, R ₁ = R ₄ : Propyl
39	0,51	Typ A, R ₁ : Propyl, R ₄ : H
54	0,21	Typ A, R ₁ = R ₄ : Propyl
46	0,35	Typ A, R ₃ : Chlor, R ₁ : Propyl
47	0,23	Typ A, R ₃ : Fluor, R ₁ : Propyl
48	0,26	Typ A, R ₂ : Chlor, R ₁ : Propyl
49	0,43	Typ A, R ₂ : Fluor, R ₁ : Propyl

Tabelle 5.6: Sättigungslöslichkeiten der verschiedenen Verbindungen

Die oben geäußerte Vermutung konnte allerdings durch die Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die Substanzen zeigten alle eine Sättigungslöslichkeit, welche deutlich über der höchsten im Estrogenitätstest eingesetzten Konzentration (10 µmol/L) und immer noch ausreichend über der im IC₅₀-Cytotoxizitätstest eingesetzten höchsten Konzentration (50 µmol/L) lag.

Allerdings zeigte sich bei der Bestimmung der Sättigungslöslichkeiten, dass durch das Einführen einer weiteren Alkylkette (**54** und **88**) die Sättigungslöslichkeit gegenüber den einfach alkylierten Verbindungen **74** und **39** deutlich abnahm. Ebenfalls nahm die Sättigungslöslichkeit der fluorierten oder chlorierten Verbindungen **49**, **47**, **48** und **46** gegenüber dem nichtsubstituierten Analogon **39** ab, wenn auch nicht so stark wie bei der Alkylierung (Verbindung **54**). Insgesamt sind Typ B-Pyrrole besser löslich als Typ A-Pyrrole (Tabelle 5.6). In den HPLC-Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass die Typ B-Pyrrole später eluieren, also folglich lipophiler sind als ihre Typ A-Pyrrol-Analoga (Kapitel 5.2). Daher sollte das Typ A-Pyrrol **39** eigentlich eine höhere Sättigungslöslichkeit aufweisen. Unter Umständen kommt es beim Typ B-Pyrrol **74** bereits in der Untersuchungslösung zu Abbauvorgängen. Die daraus entstehenden Produkte könnten eine höhere Absorption zeigen (siehe Kapitel 5.2).

Die Sättigungslöslichkeit der methoxylierten Typ A- und Typ B-Pyrrole wurde ebenfalls überprüft. Diese Verbindungen lösten sich jedoch in so geringem Maße, dass keine UV-Absorption über 0,2 beobachtet werden konnte. So kann nur mithilfe der Kalibriergeraden berechnet werden, dass die Sättigungslöslichkeiten der methoxylierten Triarylpyrrole sich unter 0,02 mmol/L befindet (Daten nicht gezeigt).

5.5 Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften

Da die Verbindungen auf der DC-Platte unter dem UV-Betrachter bei 365 nm Eigenfluoreszenz aufwiesen, wurde der Versuch unternommen, Zellaufnahmeuntersuchungen mithilfe der Messung

dieser Fluoreszenz durchzuführen. Es wurden Fluoreszenzspektren von Verbindung **39** aufgenommen (Abbildung 5.44, Anregungswellenlänge 286 nm, Emissionsspektrum, Maximum bei 400 nm). Es stellte sich allerdings heraus, dass MCF-7-Zellen bei 370 nm ihr Emissionsmaximum aufweisen und somit kein Unterschied zwischen dem Spektrum der Zellen allein und den Zellen mit Verbindung **39** feststellbar war (Daten nicht gezeigt).

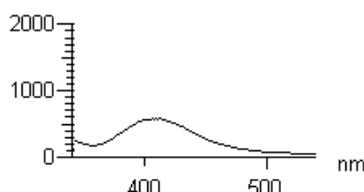


Abbildung 5.44: Fluoreszenzemissionsspektrum von Verbindung **39**. Anregungswellenlänge 286 nm.

5.6 ^1H -NMR-Untersuchungen zur Drehbarkeit der Aromaten

Da sich bei den NMR-Spektren einiger Verbindungen unerwartete Aufspaltungen ergaben, wurde dies näher untersucht. Diese Verbindungen trugen in den Aromaten Chlor- oder Fluorsubstituenten. Die NMR-Untersuchungen wurden in (D₆)DMSO durchgeführt.

Die Verbindung **47** trägt ein Fluoratom im Aromaten in 2-Position des Pyrrols (Abbildung 5.45).

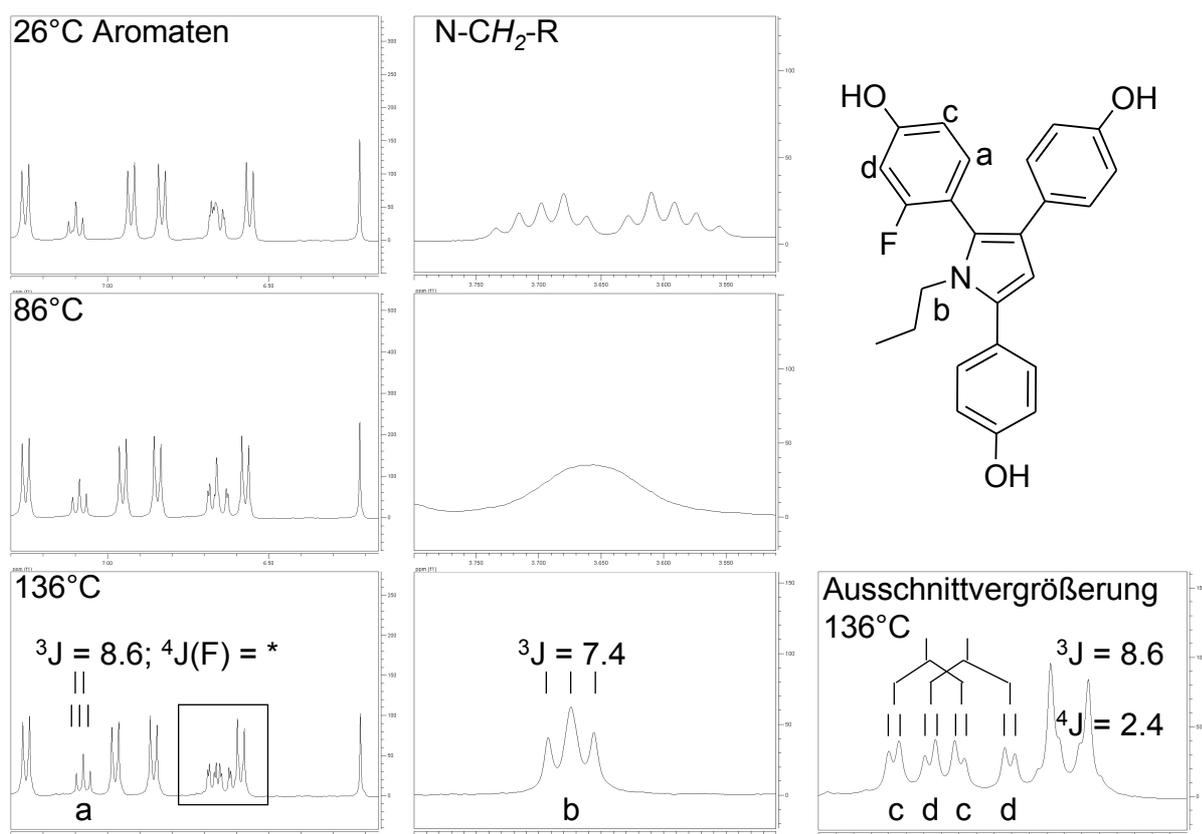


Abbildung 5.45: Hochtemperatur-NMR-Messung von **47** in (D₆)DMSO. Bei Raumtemperatur zeigen sowohl die CH₂-Gruppe der Alkylkette als auch der fluorierte Aromat Multipletts. Bei 86°C verändern sich die Signale bereits. Bei 136°C sind sie interpretierbar. a: Das Proton koppelt über eine normale ³J-Kopplung mit seinem Nachbarproton c. Die Kopplungskonstante ist 8,6 Hz. Zusätzlich koppelt das Proton noch über eine ⁴J-Kopplung mit dem Fluor in o-Position des Aromaten. Diese Kopplungskonstante ist zufällig gleichgroß (*), weswegen das mittlere Signal die doppelte Intensität der beiden weiteren Signale hat. b: normale ³J-Kopplung von zwei Protonen mit zwei weiteren Protonen. c: das Proton interagiert mit dem Proton d über eine ⁴J Kopplung: J = 2,4; und mit a über eine ³J Kopplung: J = 8,6. Ebenso verhält sich Proton d, welches die ³J-Kopplung mit dem Fluor macht und mit dem Proton c die ⁴J-Kopplung. Sehr schön zu sehen ist der Dacheffekt bei c und d.

Bei Raumtemperatur lassen sich im NMR keine Kopplungskonstanten und Protonenzuordnungen vornehmen. Wird jedoch die Probe sukzessive erwärmt, sind Veränderungen zu erkennen, welche bei 136°C in klar zuzuordnende Signale münden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass bei Raumtemperatur die Drehbarkeit des Aromaten in 2-Position des Pyrrolrings und der Alkylkette eingeschränkt ist. So gibt es zwei unterschiedliche Rotationsisomere der Verbindung. Diese Rotationsisomere sind bei Raumtemperatur nicht ineinander überführbar.

Wenn Verbindungen kein Chiralitätszentrum haben, aber beispielsweise eine C-C-Achse durch das Einführen großräumiger Substituenten nicht mehr frei drehbar ist, entsteht, wenn unterschiedliche Substituenten vorhanden sind, eine Chiralitätsachse (bzw. Pseudoasymmetrieachse). Diese Isomerie nennt man Atropisomerie¹⁷¹. Sie konnte zuerst an Biphenylderivaten mit großen Substituenten in den ortho-Positionen beobachtet werden¹⁷². Bei den fluor- und chlorsubstituierten Triarylpyrrolen handelt es sich ebenfalls um Atropisomere, welche

sich erst durch Erhitzen ineinander überführen lassen. In Abbildung 5.46 werden die Pyrrole mit dem Biphenylderivat verglichen. Es existieren also zwei mögliche Isomere dieser Verbindung.

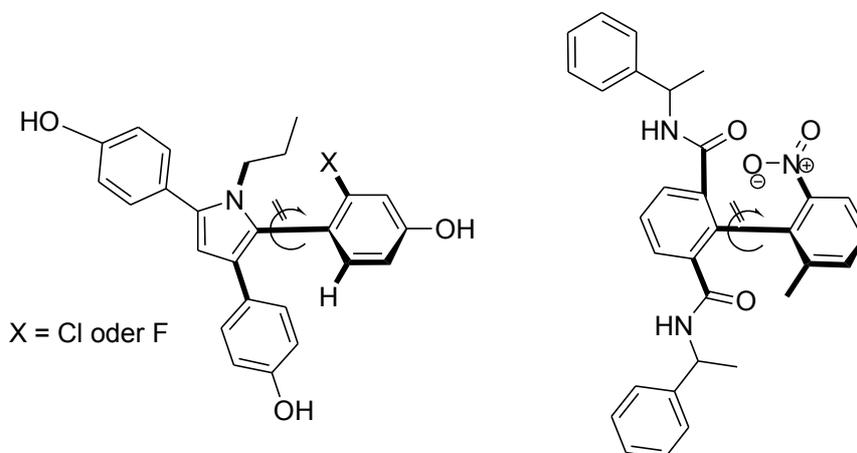


Abbildung 5.46: Links: Triarylpyrrol mit Halogensubstitution in ortho-Position im Aromaten in 2-Position des Pyrrolrings. Rechts: Vergleich mit dem Biphenylderivat von Helmchen¹⁷². Die keilförmigen Bindungen stehen nach vorn aus der Papierebene heraus (jeweils rechter Aromat). Der jeweils linke Aromat liegt in der Papierebene. Beim anderen Isomer lägen die keilförmigen Bindungen hinter der Papierebene. Die fettgedruckten Bindungen markieren die analogen Substituenten.

Dies passt auch zu den Ergebnissen des Kapitels 5.2, in welchem gezeigt wird, dass Substanzen mit Chlor- oder Fluoratomen in den Aromaten stabiler gegenüber Sauerstoff sind als die analogen unsubstituierten Verbindungen. Der substituierte Aromat könnte den Angriff des Sauerstoffs auf die 2- und 5-Positionen des Pyrrolrings erschweren.

Bei der analogen Verbindung mit Chlor (**46**, Abbildung 5.47) hingegen ergibt sich ein anderes Bild als bei Verbindung **47**: Die CH₂-Gruppe der Propylkette verändert sich bis 140°C nicht, eine stärkere Erwärmung der Probe ist mit dem verwendeten NMR-Gerät nicht möglich. Zudem sind bei Raumtemperatur bereits die Signale des chlortragenden Aromaten gut aufgelöst. Es könnte sein, dass das Chloratom so groß ist, dass es sich nur in eine Richtung orientieren kann, also nur ein Rotationsisomer existiert. Allerdings kann vermutet werden, dass aufgrund der Größe des Chloratoms die Alkylkette sich noch immer für eine Seite entscheiden muss. Zudem sind die Signale höherer Ordnung, welche für die CH₂-Gruppe beobachtet werden, nicht gleichgroß. Es könnte eine der beiden Positionen der Propylkette aus sterischen Gründen bevorzugt sein, vielleicht aufgrund geringerer Störung mit dem chlorierten Aromaten.

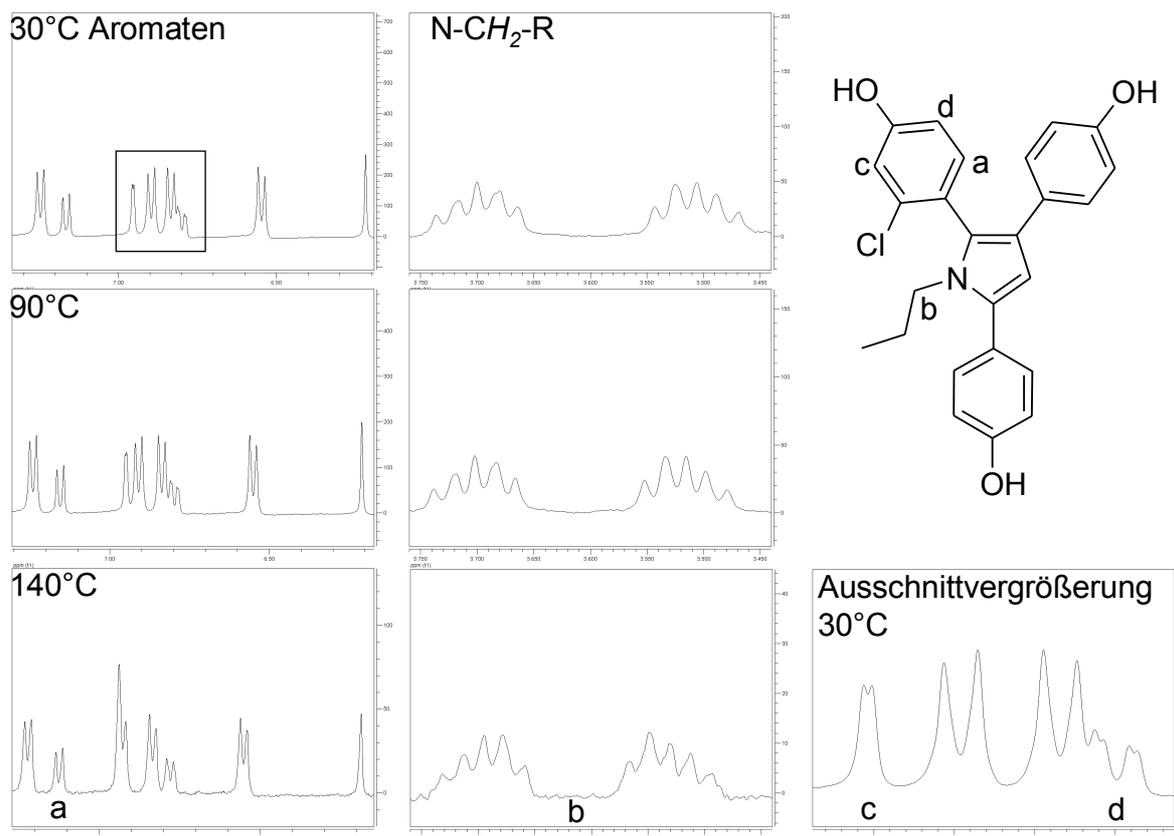


Abbildung 5.47: Hochtemperatur-NMR-Messung von **46** in (D₆)DMSO. Hier sind schon bei Raumtemperatur die Protonen des chlortragenden Aromaten schön aufgelöst. a koppelt 3J mit d (8.4Hz); d koppelt ebenfalls 3J mit a und 4J mit c ($^4J = 2.2\text{Hz}$; $^3J = 8.4\text{Hz}$) c koppelt nur 4J mit d (2Hz). Bei der Alkylkette kann bis 140°C nicht das erwartete Triplett beobachtet werden, jedoch ist der Abstand zwischen den beiden aufgespaltenen Signalen geringer geworden, so dass bei höheren Temperaturen ein Triplett vermutet wird.

Als letzte Substanz soll hier Verbindung **51** besprochen werden (Abbildung 5.48). Hier gibt es zwei fluorierte Aromaten. Bei der Hochtemperaturmessung sieht man, dass die Aufspaltung höherer Ordnung der CH₂-Gruppe bei 140°C zu einem Triplett geworden ist. Im Gegensatz dazu lässt sich im Aromatenbereich keine Auflösung der Signale beobachten. Es ist also genau umgekehrt wie bei Verbindung **46**. Es wäre möglich, dass die Propylkette bereits frei drehbar ist, während der Aromat in 2-Position des Pyrrolrings noch immer von seinem Nachbararomaten behindert wird. Dann müsste bei Verbindung **47** ebenfalls zuerst die CH₂-Gruppe der Propylkette ein Triplett ergeben und im Aromatenbereich sollten sich erst bei höheren Temperaturen die Signale eindeutig zuordnen lassen. Dies ist aber nicht der Fall. Es wäre ebenfalls möglich, dass die Aromaten bereits alle frei drehbar sind; es überlagern sich nur die Signale der Protonen an den fluortragenden Aromaten. Dies ist die wahrscheinlichere Möglichkeit, da ja die CH₂-Gruppe der Propylkette bereits ein Triplett ergibt und sich im Aromatenbereich immerhin vier Doppeldoublets überlagern.

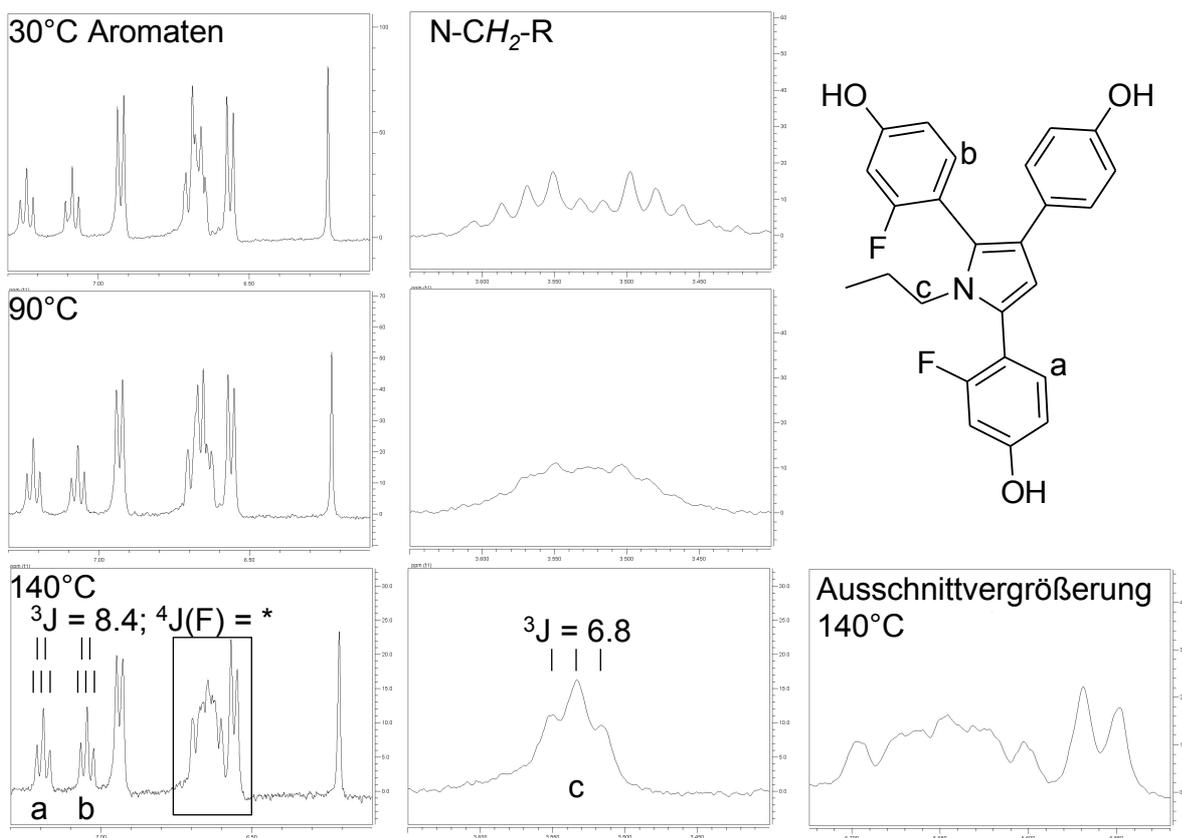


Abbildung 5.48: Hochtemperatur-NMR-Messung von **51** in (D₆)DMSO. Bei Raumtemperatur zeigen sowohl die CH₂-Gruppe der Alkylkette als auch die fluorierten Aromaten Multipletts. Bei 90°C zeigen sich bereits Veränderungen. Bei 140°C kann man für die CH₂-Gruppe das zu erwartende Triplet beobachten, der Aromatenbereich allerdings zeigt noch immer ein Multiplett.

6 Pharmakologie

Die Cytotoxizität der Verbindungen wird an zwei verschiedenen Zelllinien bestimmt: Zum einen an der hormonabhängigen Brustkrebszelllinie MCF-7 und zum anderen an der hormonunabhängigen Zelllinie MDA-MB-231. Das Testsystem wird in Kapitel 8.2 („Experimenteller Teil“) beschrieben. Weiterhin werden die Substanzen auf estrogene Eigenschaften an MCF-7/2a-Zellen getestet (ebenfalls in Kapitel 8.2 beschrieben).

6.1 Verwendete Zelllinien

MDA-MB-231

Diese Zelllinie wurde am 17. Oktober 1973 aus einem Pleuraerguß einer 51jährigen weißen Frau gewonnen, bei welcher fünf Jahre zuvor eine rechtsseitige Mastektomie aufgrund von Brustkrebs durchgeführt worden war. Der Frau wurden die Ovarien entfernt, als sie ein Rezidiv und Metastasen bekam. Sie erhielt eine Chemotherapie mit 5-FU und Cyclophosphamid, was aber nicht die gewünschten Effekte hatte, so dass sie im Januar 1974 starb¹⁷³. Diese Zelllinie enthält kein ER α -Protein und wird daher auch als hormonunabhängig bezeichnet¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. MDA-MB-231-Zellen sind hochinvasiv und bilden Tumoren und Metastasen, auch wenn sie Nacktmäusen injiziert werden¹⁷⁷. Zudem exprimieren sie Cyclooxygenase 1 (COX1) und recht viel COX2^{178, 179}.

MCF-7

Diese Zelllinie wurde 1970 aus einem Pleuraerguß einer 69jährigen Kaukasierin gewonnen. Die Frau war vorher über mehrere Jahre mit Radio- und Hormontherapie behandelt worden¹⁸⁰. Außerdem waren ihr nacheinander beide Brüste entfernt worden. Die Zellen enthalten den Estrogenrezeptor und sind in ihrem Wachstum estrogenabhängig, wobei ER α in großer Menge exprimiert wird, während ER β in geringen Mengen vorhanden ist^{20, 176, 181}. Sie unterscheiden sich aber noch in diversen anderen Eigenschaften von den MDA-MB-231-Zellen, beispielsweise enthalten sie den Progesteronrezeptor¹⁸², aber im Gegensatz zu MDA-Zellen nur COX1. COX2 Expression ist aber induzierbar¹⁷⁹. MCF-7-Zellen verhalten sich nicht so invasiv wie MDA-MB-231-Zellen.

Bei Tumorzelllinien ist über viele Passagen mit Veränderungen zu rechnen. Beispielsweise erhöht sich der ER-Gehalt über viele Passagen¹⁸². Zusätzlich verglichen Osborne et al. in einer Untersuchung verschiedene, als MCF-7 bezeichnete Zelllinien, von denen eine sogar sehr wenig ER enthielt, nicht auf endokrine Therapie reagierte, und die nicht aus der gleichen Patientin stammen konnte¹⁸³. Natürlich verändern auch unterschiedliche Kulturbedingungen die Zellen. Aus diesen Gründen sollte der Wissenschaftler sich über den Ursprung seiner Zellen im Klaren sein.

MCF-7/2a

Diese Zelllinie wurde Mitte der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts von Meyer¹⁸⁴ und Hafner¹⁸⁵ aus MCF-7-Zellen entwickelt. Es handelt sich um MCF-7-Zellen, welche mit dem Plasmid ERE_{wtc}luc stabil transfiziert sind. Weitere Informationen zu diesem Testsystem unter Kapitel 6.3 „Bestimmung der estrogenen und antiestrogenen Wirkung“ und Kapitel 8.2 „Experimenteller Teil“.

6.2 Testung auf Hemmung der Zellproliferation

Es wurden der Einfluß der Kettenlänge des Alkylsubstituenten, der Substitution der Aromaten mit den Halogenen Chlor oder Fluor und der Position des Stickstoffes im Pyrrolring auf die Hemmung der Zellproliferation untersucht. Außerdem wurde die Cytotoxizität der methoxylierten Triarylpyrrole und ihrer hydroxylierten Analoga miteinander verglichen.

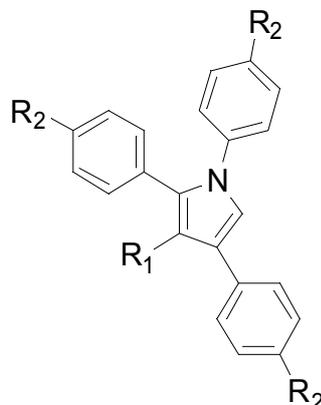
Zuerst wurde für alle Verbindungen der IC₅₀-Wert im Kristallviolettassay (siehe Kapitel 8.2, Experimenteller Teil) an MCF-7-Zellen bestimmt. Zeigte sich in diesem Test eine cytotoxische Wirkung (IC₅₀-Wert $\leq 10 \mu\text{mol/L}$), so wurden die Substanzen zusätzlich in Abhängigkeit der Zeit auf ihre Cytotoxizität getestet. Waren die Triarylpyrrole an MCF-7-Zellen hinreichend wirksam, so wurden sie auch an der den Estrogenrezeptor nicht exprimierenden MDA-MB-231-Zelllinie (ab hier: MDA-Zellen) getestet. Alle methoxylierten Triarylpyrrole wurden an MDA-Zellen getestet, da sie später auf Hemmung der COX getestet werden sollten (siehe Kapitel 6.4), und diese COX exprimieren.

Als Vergleichssubstanz dient in den Untersuchungen Cisplatin, ein häufig verwendetes Cytostatikum. Unter den Bedingungen dieses Testsystems hat es an MCF-7-Zellen eine IC₅₀ von $0,9 \pm 0,2 \mu\text{mol/L}$ und an MDA-Zellen von $1,8 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$. Die Diagramme aller zeitabhängigen Tests, inklusive der Kurven von Cisplatin an MCF-7-Zellen, befinden sich im Anhang, Kapitel 9.1.

Für die IC₅₀-Wert-Bestimmung wachsen die Zellen drei Tage an, danach erfolgt die Substanzzugabe. Der Test wird nach vier Tagen (MCF-7-Zellen) oder drei Tagen (MDA-Zellen, schnelleres Wachstum) abgestoppt.

Alle Angaben in den Tabellen sind in $\mu\text{mol/L}$.

6.2.1 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)

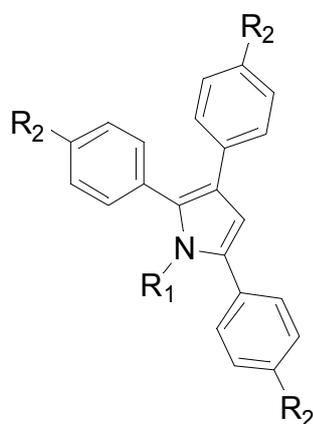


(Nr)	R ₁	R ₂	MCF-7	MDA
71	H	OH	33,1 ±2,0	--
72	Met	OH	28,3 ±1,9	--
73	Et	OH	29,4 ±2,6	--
74	Prop	OH	28,0 ±0,7	--
67	H	OCH ₃	20,5 ±1,4	46,4 ±1,5
68	Met	OCH ₃	11,7 ±1,1	>50
69	Et	OCH ₃	11,4 ±1,2	31,3 ±2,1
70	Prop	OCH ₃	8,9 ±0,7	>50

Tabelle 6.1: 1,2,4-Triaryl-3-alkylpyrrole (Typ B), IC₅₀ in µmol/L

Die hydroxylierten 1,2,4-Triaryl-3-alkylpyrrole (Typ B) zeigen an den MCF-7-Zellen schwache Cytotoxizität (Verbindungen **71-74**: IC₅₀ zwischen 28,0 und 33,1 µmol/L; Tabelle 6.1). Demgegenüber ist das Zellwachstum durch die methoxylierten Substanzen etwas stärker gehemmt (beispielsweise IC₅₀ von **69**: 11,4 µmol/L). Die Hemmung ist umso stärker, je länger die Alkylkette ist. Bis auf wenige Ausnahmen (siehe unten) ist dies bei allen weiteren getesteten Verbindungen ebenfalls der Fall. An den MDA-Zellen haben die getesteten Substanzen keine oder sehr geringe Effekte.

6.2.2 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)

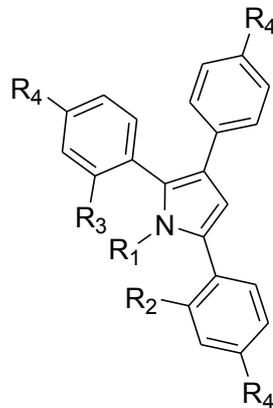


(Nr)	R ₁	R ₂	MCF-7	MDA
37	Met	OH	22,1 ±2,4	--
38	Et	OH	22,5 ±3,1	--
39	Prop	OH	30,9 ±1,0	--
40	i-Bu	OH	18,7 ±2,8	--
41	i-Pent	OH	21,9 ±0,7	--
19	Met	OCH ₃	10,4 ±1,1	>50
20	Et	OCH ₃	>50	>50
21	Prop	OCH ₃	21,4 ±2,3	>50
22	i-Bu	OCH ₃	15,7 ±0,1	>50
23	i-Pent	OCH ₃	15,1 ±2,7	42,8 ±0,4

Tabelle 6.2: 2,3,5-Triaryl-1-alkylpyrrole (Typ A), IC₅₀ in µmol/L

Auch die hydroxylierten 2,3,5-Triaryl-1-alkylpyrrole (Typ A) zeigen nur eine schwache Hemmung der Zellproliferation (Verbindungen **37-41**: IC₅₀ zwischen 18,7 und 30,9 µmol/L; Tabelle 6.2). Bei ihren methoxylierten Analoga ist die Hemmung stärker, wenn auch weniger ausgeprägt als bei den 1,2,4-Triaryl-3-alkylpyrrolen (Typ B). Das methylierte Derivat **19** zeigt hier die stärkste Hemmung (IC₅₀ = 10,4 µmol/L). Im Gegensatz dazu ist die ethylierte Substanz **20** am wenigsten toxisch (IC₅₀ >50 µmol/L). Für dieses Verhalten konnte keine Erklärung gefunden werden. Auf das Wachstum der MDA-Zellen haben die Substanzen wiederum keinen Einfluß.

6.2.3 In den Aromaten fluorierte/ chlorierte 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)



(Nr)	R ₁	R ₄	R ₃	R ₂	MCF-7	MDA
42	Met	OH	Cl	H	19,1 ±0,9	--
43	Met	OH	F	H	24,7 ±0,5	--
44	Met	OH	H	Cl	23,8 ±2,0	--
45	Met	OH	H	F	25,5 ±0,2	--
46	Prop	OH	Cl	H	13,8 ±1,9	41,6 ±1,9
47	Prop	OH	F	H	16,7 ±0,4	16,5 ±0,5
48	Prop	OH	H	Cl	14,9 ±1,3	8,1 ±1,2
49	Prop	OH	H	F	26,9 ±0,9	--
50	Met	OH	F	F	8,5 ±1,5	11,0 ±0,1
51	Prop	OH	F	F	8,0 ±0,8	9,1 ±0,6
24	Met	OCH ₃	Cl	H	20,9 ±0,04	>50
25	Met	OCH ₃	F	H	13,7 ±1,1	>50
26	Met	OCH ₃	H	Cl	42,1 ±3,3	>50
27	Met	OCH ₃	H	F	7,8 ±1,5	>50
28	Prop	OCH ₃	Cl	H	20,2 ±2,5	>50
29	Prop	OCH ₃	F	H	18,9 ±1,6	>50
30	Prop	OCH ₃	H	Cl	32,5 ±2,3	41,8 ±0,6
31	Prop	OCH ₃	H	F	12,7 ±1,0	>50
32	Met	OCH ₃	F	F	5,5 ±0,7	>50
33	Prop	OCH ₃	F	F	3,9 ±0,9	>50

Tabelle 6.3: fluorierte/ chlorierte 2,3,5-Triaryl-1-alkylpyrrole (Typ A), IC₅₀ in µmol/L

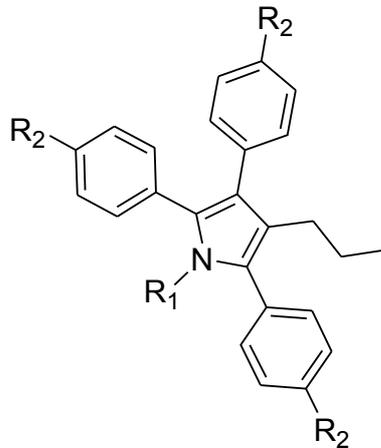
Im folgenden Absatz werden nur die IC₅₀-Werte an MCF-7-Zellen beschrieben, da die an beiden Zelllinien getesteten hydroxylierten fluorierten/ chlorierten 2,3,5-Triaryl-1-alkylpyrrole (Typ A) an

MCF-7-Zellen etwa im gleichen Maße cytotoxisch sind wie an MDA-Zellen. Die Werte an MDA-Zellen finden sich in Tabelle 6.3.

Die Verbindungen **42**, **43**, **44** und **45** ($R_1 = \text{Met}$, R_2 oder $R_3 = \text{Fluor}$ oder Chlor) zeigen im Vergleich zu Verbindung **37** ($R_1 = \text{Met}$; keine Halogenierung) keine stärkere Cytotoxizität (IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) **37**: 22,1; **42**: 19,1; **43**: 24,7; **44**: 23,8 und **45**: 25,5). Von den einfach fluorierten Derivaten beeinflusst nur **47** das Zellwachstum negativ ($R_1 = \text{Prop}$; IC_{50} : 16,7 $\mu\text{mol/L}$; Tabelle 6.3). Das im Aromaten in 5-Stellung fluorierte und propylsubstituierte Pyrrol **49** wies eine IC_{50} von 26,9 $\mu\text{mol/L}$ auf. Es unterschied sich damit kaum vom analogen nicht fluorierten Pyrrol **39** (IC_{50} : 30,9 $\mu\text{mol/L}$). Die propylsubstituierten in einem Aromaten chlorierten Pyrrole (**46**, IC_{50} : 13,8 und **48**, IC_{50} : 14,9 $\mu\text{mol/L}$) verringerten beide das Zellwachstum stärker als das analoge nichtchlorierte Pyrrol **39**. Bei Verbindung **46** mit einer IC_{50} von 41,6 $\mu\text{mol/L}$ an MDA-Zellen ist die cytotoxische Wirkung an MCF-7 und MDA-Zellen etwa gleich. Weiterhin wurden zweifach fluorierte Verbindungen synthetisiert, **50** und **51**, die das Zellwachstum stärker hemmen (IC_{50} **50**: 8,5 $\mu\text{mol/L}$ ($R_2 = R_3 = \text{F}$, $R_1 = \text{Met}$); IC_{50} **51**: 8,0 $\mu\text{mol/L}$ ($R_2 = R_3 = \text{F}$, $R_1 = \text{Prop}$)). Diese beiden Substanzen sind die cytotoxischsten hydroxylierten und halogenierten Pyrrole in dieser Arbeit.

Bei den methoxylierten Verbindungen ist das Bild sehr viel inhomogener. Das Pyrrol **26** ($R_1 = \text{Met}$; $R_2 = \text{Cl}$; IC_{50} : 42,1 $\mu\text{mol/L}$) ist weniger toxisch als das Pyrrol **24** ($R_1 = \text{Met}$; $R_3 = \text{Cl}$; IC_{50} : 20,9 $\mu\text{mol/L}$). Ebenso ist das propylsubstituierte **30** ($R_2 = \text{Cl}$; IC_{50} : 32,5 $\mu\text{mol/L}$) weniger toxisch als **28** ($R_3 = \text{Cl}$; IC_{50} : 20,2 $\mu\text{mol/L}$). Die Hemmung des Zellwachstums ist insgesamt schwächer als bei den analogen nichtchlorierten Verbindungen **19** ($R_1 = \text{Met}$; IC_{50} : 10,4 $\mu\text{mol/L}$) und **21** ($R_1 = \text{Prop}$; IC_{50} : 21,4 $\mu\text{mol/L}$). Bei den fluorierten Verbindungen verhält es sich umgekehrt: Die Substanzen mit $R_2 = \text{F}$ (**27**: $R_1 = \text{Met}$, IC_{50} : 7,8 $\mu\text{mol/L}$; **31**: $R_1 = \text{Prop}$, IC_{50} : 12,7 $\mu\text{mol/L}$) sind stärker toxisch als jene mit $R_3 = \text{F}$ (**25**: $R_1 = \text{Met}$ IC_{50} : 13,7 $\mu\text{mol/L}$; **29**: $R_1 = \text{Prop}$ IC_{50} : 18,9 $\mu\text{mol/L}$). Die fluorierten Substanzen sind etwa so stark cytotoxisch wie ihre unsubstituierten Analoga. Die Verbindungen **27** ($R_1 = \text{Met}$, $R_2 = \text{F}$) und **31** ($R_1 = \text{Prop}$, $R_2 = \text{F}$) sind sogar etwas stärker wirksam als **19** ($R_1 = \text{Met}$) und **21** ($R_1 = \text{Prop}$). Vergleicht man die Hemmung des Zellwachstums bei methyl- und propylsubstituierten Triarylpyrrolen, ist sie etwa gleich (**24/28**, **26/30**, die chlorierten Derivate) oder sogar stärker beim methylsubstituierten Derivat (**27/31**, **25/29**, die fluorierten Derivate). Die beiden am stärksten cytotoxisch wirkenden Verbindungen sind die mit zwei Fluoratomen substituierten Verbindungen **32** mit einer IC_{50} von 5,5 $\mu\text{mol/L}$ und **33** mit einer IC_{50} von 3,9 $\mu\text{mol/L}$. Insgesamt sind die methoxylierten fluorierten Verbindungen stärker wirksam als deren chlorierte Analoga. Alle methoxylierten Pyrrole sind an MDA-Zellen nicht cytotoxisch.

6.2.4 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)



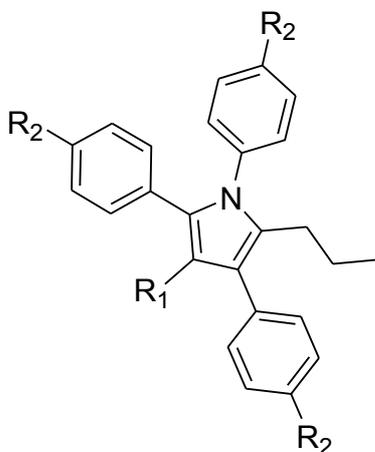
(Nr)	R ₁	R ₂	MCF-7	MDA
52	Met	OH	19,0 ±2,6	20,1 ±0,4
53	Et	OH	12,7 ±0,2	14,6 ±0,3
54	Prop	OH	5,0 ±1,6	18,4 ±2,5
34	Met	OCH ₃	8,8 ±0,1	30,0 ±2,9
35	Et	OCH ₃	6,6 ±1,6	>50
36	Prop	OCH ₃	12,7 ±2,3	>50

Tabelle 6.4: 2,3,5-Triaryl-1,4-dialkylpyrrole (Typ A), IC₅₀ in µmol/L

Die 2,3,5-Triaryl-1,4-dialkylpyrrole (Typ A) mit freier Hydroxygruppe zeigen an MCF-7 und MDA-Zellen gleichermaßen Cytotoxizität in Abhängigkeit von der Länge der Alkylkette in N1 (Tabelle 6.4). Die Typ A-Pyrrole mit zwei Alkylresten zeigen eine Hemmung des Zellwachstums in der Reihenfolge **54** (R₁ = Prop) > **53** (R₁ = Et) > **52** (R₁ = Met). Die cytotoxischste Verbindung ist das propylsubstituierte Derivat **54** mit einer IC₅₀ von 5,0 µmol/L an MCF-7-Zellen, wobei allerdings die Hemmung des Zellwachstums an MDA-Zellen viel schwächer ist (IC₅₀: 18,4 µmol/L). Verbindung **54** ist neben der im vorangegangenen Abschnitt besprochenen Verbindung **46** das einzige hydroxygruppentragende Triarylpyrrol, welches an MDA- und MCF-7-Zellen nicht im gleichen Ausmaß cytotoxisch ist.

An MDA-Zellen zeigen die methoxylierten Pyrrole keine Cytotoxizität. An MCF-7-Zellen hingegen weisen sie eine Hemmung des Zellwachstums auf. Am wirksamsten ist das mit einer Ethylkette substituierte Derivat **35** mit einer IC₅₀ von 6,6 µmol/L an MCF-7-Zellen. Es lässt sich keine Reihenfolge wie bei den hydroxylierten Substanzen erkennen; allerdings ist die propylsubstituierte Substanz **36** die am schwächsten wirksame (IC₅₀: 12,7 µmol/L, MCF-7-Zellen).

6.2.5 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)



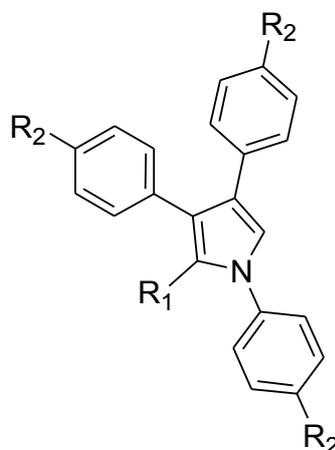
(Nr)	R ₁	R ₂	MCF-7	MDA
86	Met	OH	7,9 ±2,0	12,3 ±0,3
87	Et	OH	10,0 ±2,8	16,4 ±2,9
88	Prop	OH	6,3 ±1,9	6,1 ±0,3
83	Met	OCH ₃	5,3 ±0,8	>50
84	Et	OCH ₃	6,7 ±1,2	>50
85	Prop	OCH ₃	12,6 ±3,7	>50

Tabelle 6.5: 1,2,4-Triaryl-3,5-dialkylpyrrole (Typ B), IC₅₀ in µmol/L

Bei den 1,2,4-Triaryl-3,5-dialkylpyrrolen (Typ B) (Tabelle 6.5) ist im Gegensatz zu den 2,3,5-Triaryl-1,4-dialkylpyrrolen (Typ A) die Reihenfolge nicht -Met < -Et < -Prop. Dennoch ist die cytotoxischste Verbindung wiederum die Substanz mit zwei Propylresten (**88**) mit einer IC₅₀ von 6,3 bzw. 6,1 µmol/L (MCF-7-/ MDA-Zellen).

Bei den methoxylierten Analoga ist die methylsubstituierte Verbindung **83** die cytotoxischste (IC₅₀ an MCF-7-Zellen: 5,3 µmol/L), alle methoxylierten Pyrrole hingegen hemmen das Zellwachstum von MDA-Zellen nicht.

6.2.6 1,3,4-Triarylpyrrole (Typ C)



(Nr)	R ₂	MCF-7	MDA
93	OH	8,0 ±0,9	7,4 ±2,2
92	OCH ₃	12,4 ±1,3	>50

Tabelle 6.6: 1,3,4-Triarylpyrrole (Typ C), IC₅₀ in µmol/L

Interessanterweise ist bei den 1,3,4-Triarylpyrrolen (Typ C) das hydroxylierte Derivat **93** cytotoxischer als das methoxylierte **92** (Tabelle 6.6). Obschon es nicht mit einer Alkylkette substituiert ist, zeigt es bereits eine deutlich stärkere Cytotoxizität (IC₅₀ 8,0 µmol/L) als das analoge 1,2,4-Triarylpyrrol (Typ B) ohne Alkylkette **71** (IC₅₀ 33,1 µmol/L).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Ausnahme von **54** und **88** alle hydroxylierten Derivate der Typ A- und B-Pyrrole, unabhängig von der Kettenlänge des Alkylrestes und der Position des Stickstoffes im Heterocyclus, zu keiner relevanten Unterdrückung der Zellproliferation führen.

Erst durch das Einführen von Chlor oder Fluor in die ortho-Positionen der Aromaten, kommt es bei den propylsubstituierten Pyrrolen unabhängig vom Ort der Chlorsubstitution zu einer Erhöhung der Cytotoxizität (Verbindungen **46** und **48** gegenüber **39** oder **74**). Hingegen erhöht sich diese nicht, wenn sich nur ein Methylrest am Pyrrol befindet (Verbindungen **42** und **44** gegenüber **37**).

Durch Einführung von Fluoratomen in die Aromaten kommt es nur zu einer Erhöhung der Cytotoxizität, wenn es sich bei R₃ um ein Fluoratom handelt (Verbindung **47**, IC₅₀: 16,7 µmol/L).

Alle methoxylierten Triarylpyrrole, unabhängig von ihrem Substitutionsmuster, zeigen keinerlei Hemmung des Zellwachstums von MDA-Zellen.

An MCF-7-Zellen konnten demgegenüber je nach Verbindung verschieden starke Hemmungen der Zellproliferation festgestellt werden. Im allgemeinen sind die fluorierten methoxylierten Pyrrole

cytotoxischer als ihre hydroxylierten Analoga. Auch die nicht in den Aromaten substituierten Triarylpyrrole zeigen dieses Verhalten, mit Ausnahme von Verbindung **20**, die gar nicht wirksam ist. Allgemein sind diejenigen Substanzen mit längerer Alkylkette auch die toxischeren.

Jedoch hemmen die chlorierten methoxylierten 2,3,5-Triaryl-1-alkylpyrrole (Typ A) das Zellwachstum schwächer. Im Falle der dialkylierten Triarylpyrrole ist jeweils das methoxylierte mit der kürzesten Kette und das hydroxylierte mit der längsten Kette das wirksamste.

Während die Eigenschaften der in den Aromaten unsubstituierten oder fluorierten Verbindungen den Schluß nahelegen, dass eine erhöhte Lipophilie zur Erhöhung der Cytotoxizität führt, lassen die Eigenschaften der chlorierten und dialkylierten Triarylpyrrole diesen Schluß nicht zu. Da aber, wie in Kapitel 5.3 dargelegt, die methoxylierten Triarylpyrrole ohnehin eine sehr schlechte Wasserlöslichkeit zeigen, könnte es sein, dass sie unter den Testbedingungen in der Kulturplatte ausfallen. Allerdings würden sie bei MDA- und MCF-7-Zellen gleichermaßen ausfallen. Gegen diese These spricht die unterschiedliche Cytotoxizität der methoxylierten Verbindungen an den beiden Zelllinien. Je lipophiler die Substanz, desto weniger Substanz stünde zur Verfügung, um in die Zelle aufgenommen zu werden. Allerdings würde hierbei zu Anfang der Aufnahme sämtliche gelöste Substanz wie bei einem Schwamm in die Zelle eingesaugt werden, um den Konzentrationsgradienten auszugleichen. So ließe sich erklären, warum eine weitere Erhöhung der Lipophilie nicht zu einer weiteren Erhöhung der Cytotoxizität führt. Die Substanzen sind schlicht zu lipophil, um noch im wässrigen gelöst werden zu können. Sind die Substanzen nicht gelöst, können sie auch nicht aufgenommen werden (Endocytose ausgenommen, dann müssen sich die Substanzen aber immer noch in der Zelle lösen). Allerdings konnte in den Zellkulturplatten keine ausgefallene Substanz beobachtet werden. Es sollten Zellaufnahmestudien mittels Fluorimetrie durchgeführt werden, um diesen Zusammenhang näher zu beleuchten, jedoch fluoreszieren die Verbindungen bei der gleichen Wellenlänge wie die Zelle selbst (Kapitel 5.4). Lipophilere Substanzen können die Lipiddoppelmembran besser überqueren als analoge hydrophilere Substanzen, wenn es keine speziellen Transportsysteme für diese gibt.

Die hydroxylierten Verbindungen zeigen an MDA- und MCF-7-Zellen eine ähnliche Cytotoxizität, so dass der ER für die Ausübung der Cytotoxizität keine Rolle spielen kann. Im Gegensatz dazu sind die methoxylierten Verbindungen an den MDA-Zellen nicht oder kaum wirksam, während MCF-7-Zellen in ihrer Proliferation gehemmt werden. Diese beiden Zelllinien unterscheiden sich jedoch in weit mehr Eigenschaften als nur dem ER-Status voneinander. Insgesamt sind MCF-7-Zellen deutlich empfindlicher und weniger invasiv als MDA-Zellen (siehe Kapitel 6.1). Allerdings läßt sich so nicht erklären, dass die hydroxylierten Verbindungen an beiden Zelllinien wiederum

etwa gleich stark die Proliferation hemmen. Es wäre möglich, dass die Verbindungen tatsächlich über ein spezifisches Target cytotoxisch wirken, da alle methoxylierten Verbindungen die Proliferation von MDA-Zellen nicht hemmen; jene von MCF-7-Zellen aber schon. Zudem erhöht eine Substitution mit Fluor nach den HPLC-Untersuchungen zu urteilen (siehe Kapitel 5.3) die

Lipophilie kaum, wohl aber sehr stark die Cytotoxizität. Außerdem sind in ortho-Position des Aromaten in 2-Stellung chlorierte Typ A-Pyrrole cytotoxischer als in ortho-Position des Aromaten in 5-Stellung Chlorierte, während sich dies bei fluorierten Typ A-Pyrrolen genau andersherum verhält. Diese Verbindungen sind nicht lipophiler als ihre jeweiligen Analoga (laut HPLC).

In den durchgeführten zeitabhängigen Tests zeigte sich, dass alle getesteten Substanzen die Zellproliferation konzentrationsabhängig hemmen. Es kommt zu keiner Erholung der Zellen über den Testzeitraum. Wenn die IC_{50} sehr nah an $10 \mu\text{mol/L}$ liegt, ist kaum eine Verringerung des Zellwachstums feststellbar.

Die Ergebnisse des zeitabhängigen Tests befinden sich im Anhang, Kapitel 9.1.

6.3 Bestimmung der estrogenen und antiestrogenen Wirkung

Die Durchführung des Assays ist im Kapitel 8.2.4 beschrieben. Vier Tage vor Testbeginn werden die MCF-7/2a-Zellen von normalem DMEM („*Dulbecco's modified Eagle medium*“) mit Phenolrot als pH-Indikator und 5% FCS (*fetal calf serum*) auf DMEM mit 5% ctFCS (*charcoal treated* zur Entfernung der Steroide) umgesetzt (siehe Kapitel 8.2). Dieses Medium enthält auch kein Phenolrot, da Phenolrot selbst schwache estrogene Aktivität zeigt¹⁸⁶, wodurch es die Zellproliferation anregt und daher die Testergebnisse verfälschen würde. Auch z.B. Hormone in FCS lässt die Zellen stärker proliferieren, ein Einfluß von zugesetztem E2 auf das Wachstum kann dann nicht mehr beobachtet werden¹⁸⁷. Eine dauerhafte Kultivierung der Zellen ohne FCS ist aber nicht möglich, da MCF-7-Zellen die im FCS enthaltenen Estrogene und Wachstumsfaktoren zur Proliferation benötigen.

Die verwendeten MCF-7/2a-Zellen enthalten das Plasmid ERE_{wtc}Luc. Auf diesem Plasmid befindet sich das ERE und nachgeschaltet das Luciferasegen, wobei im Falle der ER-Aktivierung statt normaler Zielgene die aus dem Leuchtkäfer *Photinus Pyralis* stammende Luciferase abgelesen wird¹⁸⁴. Bei Zugabe von Luciferin (enthalten im Luciferase-assay-Kit der Firma Promega) erfolgt dann die Spaltung desselben zu Oxyluciferin durch die Luciferase unter Emission von Fluoreszenzlicht¹⁸⁸(Abbildung 6.1).

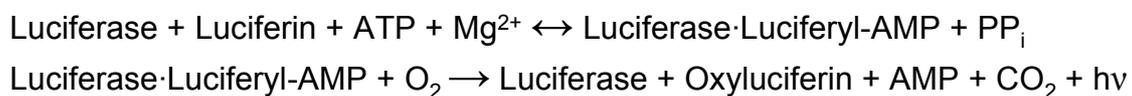


Abbildung 6.1: Reaktionen, welche durch Luciferase katalysiert werden nach de Wet¹⁸⁸

Die Expression der Luciferase erfolgt in Abhängigkeit der estrogenen Potenz der jeweiligen Testsubstanz¹⁸⁹.

Zusätzlich ist in den Zellen noch das Plasmid pWLneo, auf welchem sich eine Resistenz für das Antibiotikum Neomycin (= Geneticin) befindet. Man setzt Geneticin dem Medium hinzu, um sicherzustellen, dass sich nur erfolgreich transfizierte Zellen weitervermehren. Zellen, welche die beiden Plasmide nicht aufgenommen haben, sterben. Es wird dabei davon ausgegangen, dass Zellen entweder beide oder gar kein Plasmid aufgenommen haben¹⁸⁵.

Die Zellen werden in 96-Lochplatten ausgesäht und 24 h später mit Lösungen der Testverbindungen in DMEM beschickt. Nach etwa 48 h erreicht die Expression der Luciferase ein Plateau¹⁹⁰, weswegen nach 50 h der Test abgestoppt und Luciferin zugegeben wird. Die Messung mit einem Luminometer erfolgt direkt nach Zugabe über einen Zeitraum von 10 Sekunden (da die Lumineszenz innerhalb von 2 min abklingt¹⁸⁸) bei einer Wellenlänge von 390-520 nm. Die Lichtemission der Leuchtkäferlumineszenz liegt im Bereich von 490-630 nm¹⁹¹. Natürlich kann in

diesem Testsystem nicht bestimmt werden, wodurch genau die Luciferaseexpression ausgelöst wird. Durch die Untersuchung in ER-positiven Mammakarzinomzellen in einem Ganzzellassay wird aber die gesamte Signalkaskade miteinbezogen. In den im Arbeitskreis Prof. Gust verwendeten MCF-7/2a-Zellen ist nur ER α vorhanden¹⁹².

Es wurde der Einfluß der Kettenlänge des Alkylrestes, der Position des Stickstoffes im Pyrrolring und der Substitution der Aromaten mit Fluor oder Chlor auf die estrogenen Eigenschaften untersucht.

Alle Angaben in den Tabellen erfolgen in nmol/L. Aus den sigmoiden Kurven wurde der EC₅₀-Wert (halbmaximale effective concentration) berechnet (software: OriginPro 8), welcher den Wendepunkt der Kurve darstellt. Um die einzelnen Tests vergleichen zu können wird die Lumineszenz einer 2,5·10⁻⁹ molaren E2-Lösung auf 100% IA (intrinsische Aktivität) und die Negativkontrolle (nur Medium mit 0,1% DMSO) auf 0% gesetzt. Estradiol hat in diesem Assay eine EC₅₀ von 0,1 nmol/L.

6.3.1 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)

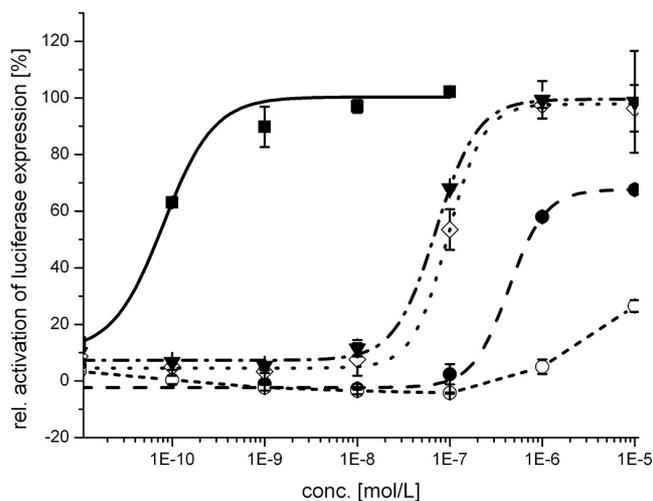
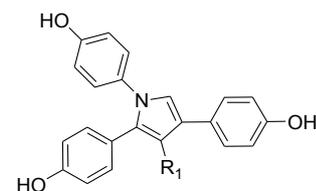


Abbildung 6.2: 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B):

■ E2; ○ 71; ● 72; ◇ 73; ▼ 74

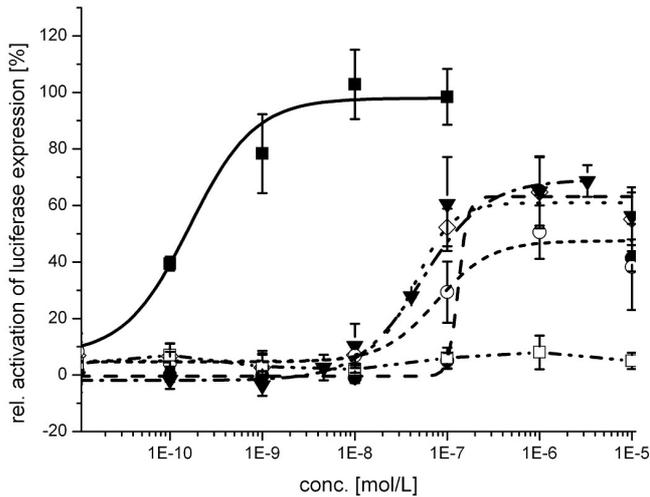
Nr	R ₁	EC ₅₀	IA [%]
71	H	-	38±2
72	Met	440	68±1
73	Et	100	96±8
74	Prop	70	99±18

EC₅₀ in nmol/L



Die 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B) erreichen 100% Transaktivierung, wenn der Alkylrest Ethyl oder Propyl ist. Der aktivste Vertreter ist Verbindung **74** (R₁ = Prop) mit einer EC₅₀ von 70 nmol/L. Die ethylierte Verbindung **73** ist nahezu genauso wirksam mit einer EC₅₀ von 100 nmol/L. Überhaupt keine Wirkung wies, wie bereits Ricarda Hoffmann⁹⁸ an analogen Substanzen zeigen konnte, die nicht alkylierte Verbindung **71** auf (Abbildung 6.2). Verbindung **93**, die analoge Typ C-Verbindung zu **71** zeigte ebenfalls keine estrogenen Aktivität (Daten nicht gezeigt).

6.3.2 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)



Nr	R ₁	EC ₅₀	IA [%]
37	Met	130	65±1
38	Et	50	65±12
39	Prop	50	65±12
40	i-Bu	80	51±9
41	i-Pent	-	-

EC₅₀ in nmol/L

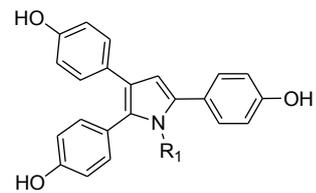


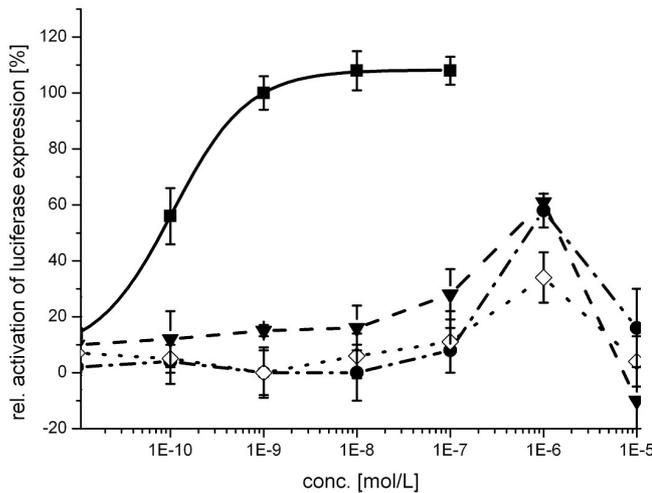
Abbildung 6.3: 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A):

■ E2; ● 37; ◇ 38; ▼ 39; ○ 40; □ 41

Die 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A) erreichen nur 65% Transaktivierung, allerdings sind sie etwas potenter als die N-Arylpyrrole (Typ B): Ihr aktivsten Vertreter, die Verbindungen 38 und 39 haben eine EC₅₀ von 50 nmol/L (Abbildung 6.3). Eine weitere Verlängerung des Alkylrestes über Propyl hinaus führt zu keiner weiteren Verbesserung der estrogenen Eigenschaften; Verbindung 41 mit einem Isopentylrest ist sogar wirkungslos.

In der Hoffnung, die estrogenen Eigenschaften der Verbindungen verbessern zu können, wurden Dialkylderivate der Typ A- und Typ B-Pyrrole synthetisiert.

6.3.3 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B)



Nr	R ₁	EC ₅₀	IA [%]
86	Met	--	58±6
87	Et	--	34±9
88	Prop	--	61±3

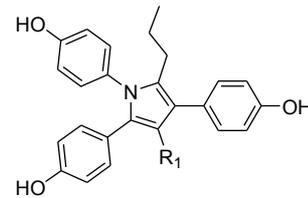
EC₅₀ in nmol/L

Abbildung 6.4: 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B):

■ E2; ● 86; ◇ 87; ▼ 88

Bei den 3,5-Dialkyl-1,2,4-triarylpyrrolen (Typ B) wurde Position 3 mit einem Propylrest substituiert, da sich Triarylheteroaromaten mit dieser Kettenlänge als am potentesten herausgestellt hatten (siehe oben, einfach alkylierte Pyrrole (Typ A) und PPT94, siehe Kapitel 2, Einleitung). Die Länge des Restes in 5-Position (R₁) wurde variiert. Durch die Einführung eines weiteren Alkylsubstituenten in 5-Position der 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B) nahm die Cytotoxizität bei 10⁻⁵ mol/L so stark zu, dass kein EC₅₀ bestimmt werden konnte (Verbindungen 86, 87 und 88) (Abbildung 6.4).

6.3.4 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)

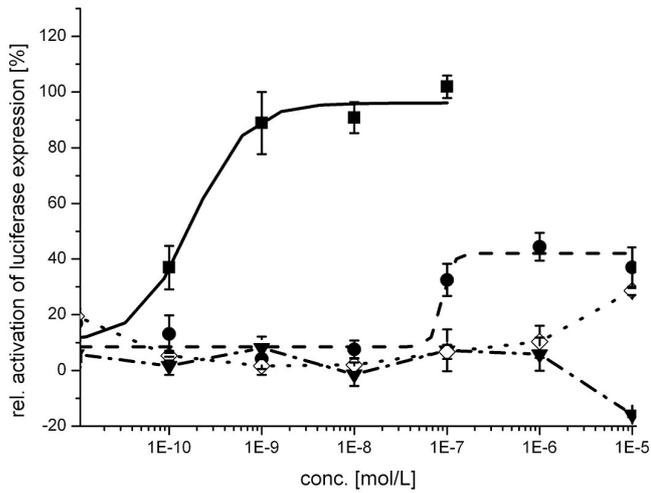
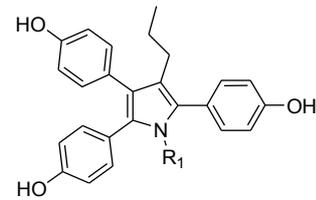


Abbildung 6.5: 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A):
 ■ E2; ● 52; ◇ 53; ▼ 54.

Nr	R ₁	EC ₅₀	IA [%]
52	Met	88	44±5
53	Et	-	29±2
54	Prop	-	-

EC₅₀ in nmol/L



Substitution der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A) mit einem weiteren Alkylrest in 4-Position führte zu den 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrolen (Typ A). Bei diesen führte die Einführung eines zweiten Alkylsubstituenten sogar zum völligen Wirkverlust, mit Ausnahme des mit Methyl- und Propylrest substituierten Pyrrols **52**, welches noch sehr schwache Wirksamkeit zeigte (Abbildung 6.5).

6.3.5 In o-Position der Aromaten Cl-substituierte 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)

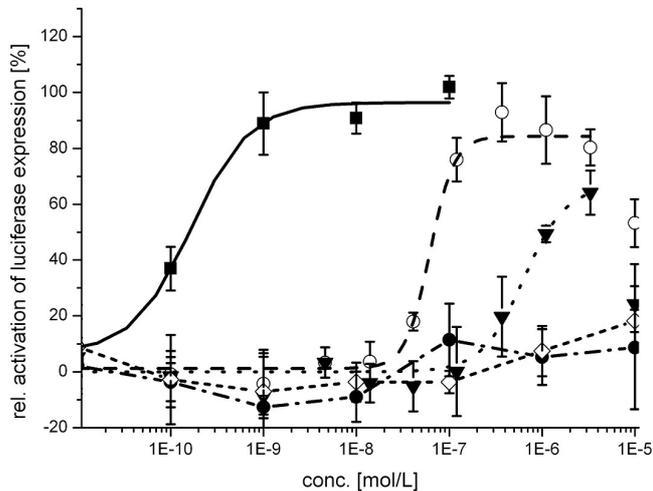
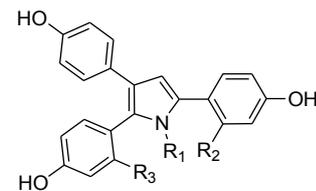


Abbildung 6.6: Chlorierte Pyrrole
 ■ E2; ● 48; ◇ 44; ▼ 42; ○ 46.

Nr	R ₁	R ₂	R ₃	EC ₅₀	IA [%]
44	Met	Cl	H	-	-
42	Met	H	Cl	600	64±7
48	Prop	Cl	H	-	-
46	Prop	H	Cl	63	92±10

EC₅₀ in nmol/L



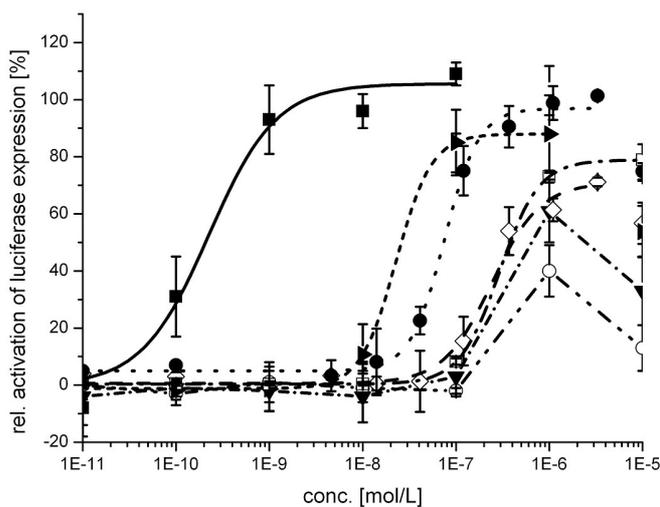
Da die Verbindungen **40** (R₁ = i-Bu) nur schwache und **41** (R₁ = i-Pent) keine estrogenen Eigenschaften mehr aufwiesen (siehe Kapitel 6.3), wurden diese nicht als in den Aromaten halogenierte Derivate synthetisiert. Ebenso wurde **38** (R₁ = Et) nicht weiterverfolgt, da es sich im Estrogenitätstest kaum von dem Derivat **39** mit R₁ = Prop unterschied und das mit Propyl substituierte Pyrrol eine stärkere ER α -Selektivität versprach (siehe Kapitel 2.4). So wurden also nur Triarylpyrrole mit R₁ = Met oder Prop als halogenierte Derivate synthetisiert.

Ebenfalls zu einem vollständigen Wirkverlust führte die Einführung eines Chloratoms in R₂ (Verbindungen **44** und **48**) (Abbildung 6.6). Wenn R₃ Chlor ist, kam es im Fall von R₁ = Methyl (Verbindung **42** EC₅₀: 600 nmol/L) oder Propyl (Verbindung **46** EC₅₀: 63 nmol/L) zu einer Abschwächung der Potenz im Vergleich zum jeweiligen nicht chlosubstituierten N-Alkylpyrrols (EC₅₀: 130 nmol/L (Verbindung **37**) bzw. 50 nmol/L (Verbindung **39**)). Von den in den Aromaten chlorierten, wie auch von den fluorierten Pyrrolen (siehe unten) wurden nur die Methyl- und Propylkette tragenden Derivate synthetisiert. Es sollte zum einen der Einfluß der Chlorierung bzw. Fluorierung auf die Wirkstärke erforscht werden. Dazu wurde das Pyrrol mit R₁ = Propyl gewählt. Mit ihr substituierte Pyrrole sind am potentesten und erreichen höhere intrinsische Aktivitäten. Zum anderen wurde zusätzlich das Pyrrol mit R₁ = Methyl ausgewählt, da so substituierte Pyrrole schwächere estrogenen Aktivität zeigten. Eine Erhöhung der IA durch Chlor oder Fluor würde bei dieser Kettenlänge also mehr auffallen. Außerdem zeigten die mit einer Propylkette substituierten Pyrrole eine höhere Cytotoxizität (siehe Kapitel 6.2, Testung auf Cytotoxizität) Es bestand die Hoffnung, dass sich diese durch Chlosubstitution noch erhöhen würde.

Im Estrogenitätstest ist eine deutliche Erniedrigung der IA in der höchsten Konzentration sichtbar (Abbildungen 6.6 und 6.7). Für den sigmoiden Kurvenfit mit OriginPro 8 wurde daher die höchste Konzentration (10^{-5} mol/L) nicht miteinbezogen. Es wird vermutet, dass dieser Abfall nicht durch eine geringere estrogenische Wirkung der Substanz verursacht wird, sondern durch Verringerung der Zellmasse aufgrund cytotoxischer Effekte.

Ein weiterer Vorteil der methylsubstituierten Triarylpyrrole liegt in der Möglichkeit zu erforschen, ob auch weniger cytotoxische Verbindungen in der höchsten Konzentration einen Abfall der IA aufweisen. Da auch methylsubstituierte Triarylpyrrole mit R_2 oder $R_3 = \text{Cl}$ oder F eine erniedrigte Transaktivierung in der höchsten Konzentration zeigen, kann dieses Verhalten auch einen anderen Grund als die Toxizität haben.

6.3.6 In o-Position der Aromaten F-substituierte 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)



Nr	R ₁	R ₂	R ₃	EC ₅₀	IA [%]
45	Met	F	H	n.a.	40±9
43	Met	H	F	n.a.	61±11
49	Prop	F	H	240	71±1
47	Prop	H	F	70	101±1
50	Met	F	F	290	78±5
51	Prop	F	F	30	88±14

EC₅₀ in nmol/L

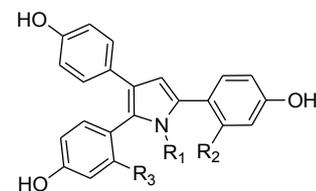


Abbildung 6.7: Fluorierte Pyrrole

■ E2; ● 47; ◇ 49; ▼ 43; ○ 45; □ 50 ► 51.

Im Unterschied zu den chloresubstituierten blieben alle einfach fluorsubstituierten Typ A-Pyrrole estrogenaktiv (Abbildung 6.7). Deshalb wurde bei den fluorierten Pyrrolen ein weiterer Aromat fluoriert. Durch Erhöhung der Lipophilie sollte eine Kombination von estrogenen und cytotoxischen Eigenschaften erreicht werden (*drug targeting*, siehe Kapitel 3, Problemstellung), was bei **51** auch gelang. Diese Verbindung zeigte mit 30 nmol/L die niedrigste EC₅₀ im Test (die zweitpotenteste Verbindung, das analoge Pyrrol ohne Fluor, **39**, zeigte eine EC₅₀ von 50 nmol/L), im Gegensatz zu Verbindung **39** erreichte **51** aber nahezu 100% Transaktivierung (88 % ±14).

Im Vergleich mit den nur einfach fluorsubstituierten Typ A-Propylpyrrolen **49** (240 nmol/L) oder **47** (70 nmol/L) erhöhte sich die Potenz beim zweifach fluorsubstituierten Derivat **51** (30 nmol/L). Dies gilt analog für die methylsubstituierten Typ A-Pyrrole (**45**, **43** vgl. mit **50**).

Es wurde davon abgesehen, weitere Pyrrole mit mehr als einem Chlor in den Aromaten zu synthetisieren, da bei den Verbindungen mit $R_2 = \text{Cl}$ keine estrogene Wirkung mehr feststellbar war. Daher wurde nur die Mehrfachsubstitution mit Fluor verfolgt.

Insgesamt sind die Typ A-Pyrrole potenter, während die Typ B-Pyrrole 100% Transaktivierung erreichen. Durch die Einführung von Fluorsubstituenten in die Aromaten können auch die Typ A-Pyrrole 100% Aktivierung erreichen.

Der Ansatz, durch Einführung einer weiteren Alkylkette eine höhere Estrogenität zu erhalten, war nicht von Erfolg gekrönt. **88** ist zwar noch leicht estrogen und zeigt im Cytotoxizitätstest eine IC_{50} von 6,3 $\mu\text{mol/L}$ an MCF-7-Zellen (siehe Kapitel 6.2, Testung auf Hemmung der Zellproliferation). Allerdings stellte sich heraus, dass die Substanz sehr schnell von Luftsauerstoff zersetzt wird (siehe Kapitel 5.2, Stabilitätstestung). Daher, und auch aufgrund von sehr schlechten Ausbeuten in der Synthese, wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt.

Nur ein einziges substituiertes Pyrrol wies Antiestrogenität auf: **40**, mit einer IC_{50} von 310 nmol/L (Abbildung 6.8).

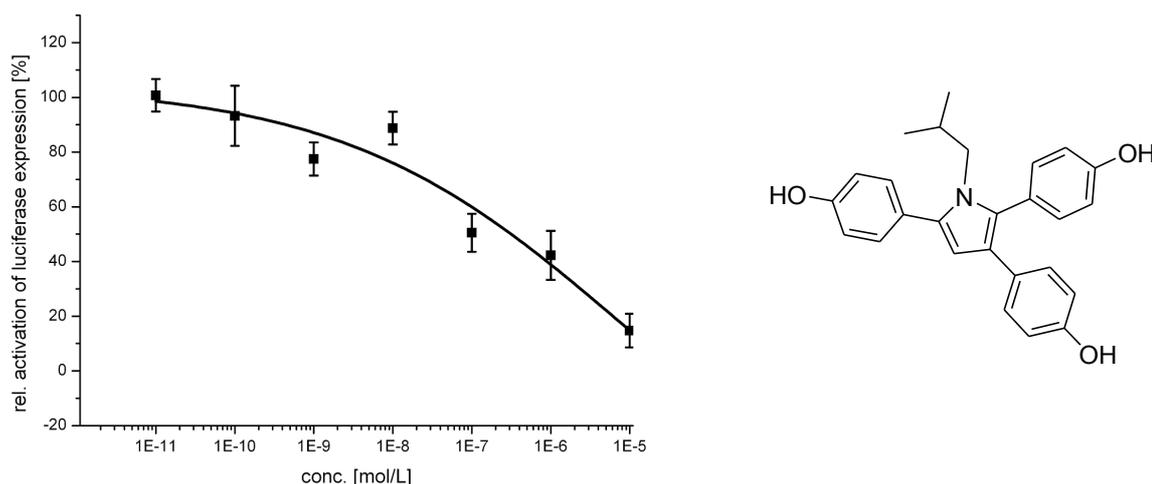


Abbildung 6.8: Antiestrogene Wirkung von **40**: Coinkubation mit E2

Bei allen anderen Verbindungen zeigten sich trotz der Tatsache, dass sie teilweise nicht 100% Transaktivierung erreichten, keine antiestrogenen Eigenschaften (Daten nicht gezeigt). Da der genaue Bindungsmodus mit den verfügbaren Mitteln nicht geklärt werden kann, lässt sich nur

spekulieren, ob sich die Verbindungen etwa durch unterschiedliche Coregulatorrekrutierung anders verhalten als E2 (siehe Kapitel 2.1, „Die Estrogenrezeptoren“).

6.3.7 Coinkubation mit 4-Hydroxytamoxifen

Um herauszufinden, ob die Pyrrole tatsächlich mit der Ligandenbindungstasche interagieren und es sich bei ihnen nicht etwa um allosterische Modulatoren des ER handelt, sollten sie mit dem an der MCF-7/2a-Zelllinie antiestrogen wirkenden 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) coinkubiert werden. Wenn die beiden Moleküle um die Bindungstasche konkurrieren, sollte die Inkubation mit 4-OHT zu einem vollständigen Wirkverlust führen. Zuerst wurde mit 4-OHT ein Antiestrogenitätstest durchgeführt, um 4-OHT in einer Konzentration einzusetzen, welche im Wirkmaximum liegt (Abbildung 6.9). 4-OHT wurde daraufhin in $1 \cdot 10^{-7}$ mol/L eingesetzt. Bei höheren Konzentrationen waren die cytotoxischen Wirkungen von 4-OHT zu stark.

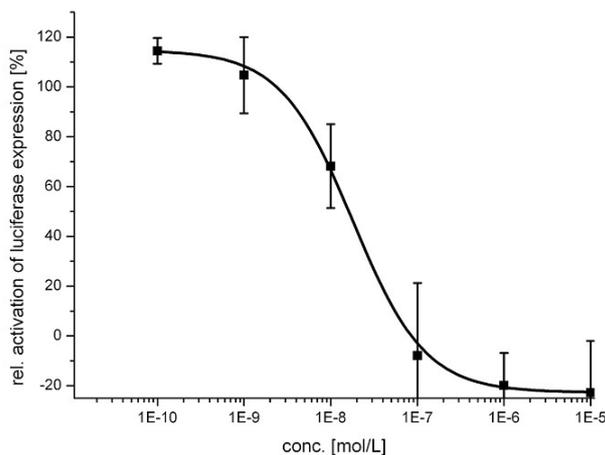


Abbildung 6.9: Konzentrations-Luciferaseexpressionskurve von 4-OHT coinkubiert mit E2 (2,5 nmol/L); IC_{50} von 4-OHT: 15 n mol/L

Da die Rezeptorbindungsaffinitäten der von Hoffmann synthetisierten analogen Pyrrole sehr schwach waren⁹⁸, sollten die Zellen zuerst mit den neuen Pyrrolen inkubiert werden und dann erst 4-OHT hinzugegeben werden. Dies sollte den Pyrrolen erlauben, sich in die Ligandenbindungstasche einzulagern, ohne dass sie sofort mit 4-OHT um die Bindungstasche konkurrieren mussten.

Um eine eventuelle Abhängigkeit von der Zeit zu betrachten, wurde zum einen gleichzeitig mit 4-OHT inkubiert, zum anderen wurden die Pyrrole 1 oder 3 Stunden vor 4-OHT-Zugabe auf die Zellen gegeben. Hierzu wurden die drei wirksamsten Triarylpyrrole **74**, **39** und **51** ausgewählt.

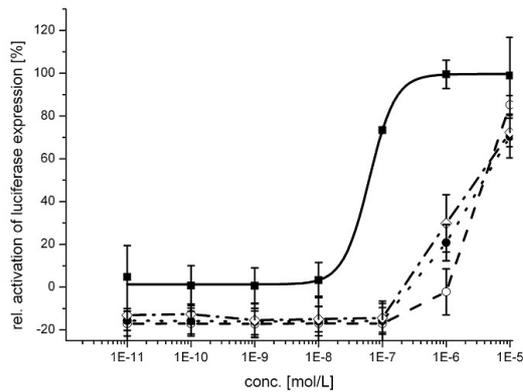


Abbildung 6.10: ■ 74 ohne 4-OHT, ○ gleichzeitig mit 4-OHT-Zugabe, ● 1 h vor, ◇ 3 h vor 4-OHT-Zugabe

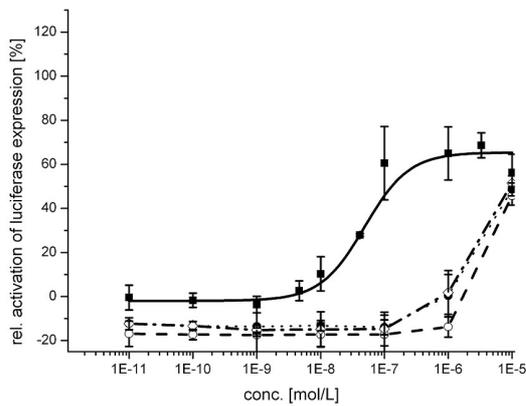


Abbildung 6.11: ■ 39 ohne 4-OHT, ○ gleichzeitig mit 4-OHT-Zugabe, ● 1 h vor, ◇ 3 h vor 4-OHT-Zugabe

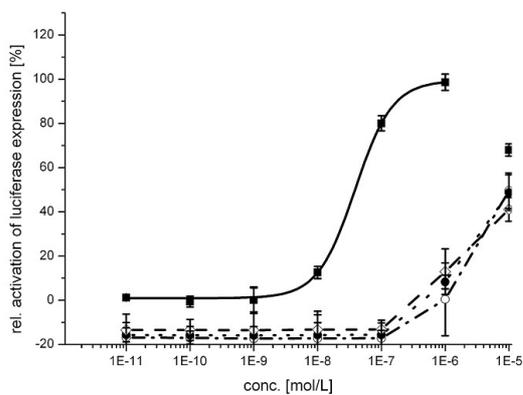


Abbildung 6.12: ■ 51 ohne 4-OHT, ○ gleichzeitig mit 4-OHT-Zugabe, ● 1 h vor, ◇ 3 h vor 4-OHT-Zugabe

In den Abbildungen 6.10 bis 6.12 lässt sich sehen, dass die Estrogenität aller ausgewählten Verbindungen nahezu vollständig durch 4-OHT unterdrückt wird. Hierbei ist es unerheblich, ob die

Zugabe von 4-OHT zeitgleich, eine oder drei Stunden später erfolgte. Erst wenn die Substanzen in einem 100fachen Überschuß (10^{-5} mol/L) vorliegen, zeigt sich eine estrogenische Wirkung. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass tatsächlich eine Interaktion mit der Ligandenbindungsdomäne vorliegt. Wären die Pyrrole allosterische Modulatoren, gingen sie an einer anderen Stelle als der Bindungstasche Wechselwirkungen mit dem Rezeptorprotein ein. Dies würde die Tertiärstruktur desselben verändern und hätte eine veränderte Bindungsfähigkeit für Liganden zur Folge. Wenn die Bindung für 4-OHT erschwert ist, dann sollte die Estrogenität der jeweiligen Verbindung nicht derart beeinträchtigt sein.

Gegen Allosterie als Wirkmechanismus spricht ebenfalls, dass im Estrogenitäts-Assay die Anwesenheit von Estrogenen sorgfältig vermieden wird: Das FCS wird über Aktivkohle filtriert, um Estrogene zu entfernen und es wird mit Medium ohne Phenolrot gearbeitet. Ohne den Liganden (hier Estradiol) jedoch kann der allosterische Modulator nicht wirken.

6.3.8 Testung dreier Abbauprodukte einer ausgewählten Verbindung auf Estrogenität

Wie in Kapitel 5.2 dargelegt wurde, zerfallen viele der untersuchten Verbindungen in Anwesenheit von Sauerstoff. Da es in einem Fall gelang, die Zerfallsprodukte zu isolieren, wurden diese ebenfalls auf Estrogenität getestet.

Sollten die Verbindungen im Assay estrogenische Potenz zeigen, wäre es nämlich für alle zerfallenden Verbindungen unklar, ob die Ursprungsverbindung oder ein Zerfallsprodukt estrogen wirkt. Es sollte überprüft werden, ob Zerfallsprodukte im Estrogenitätstest eine höhere IA aufweisen können als ihre Muttersubstanzen. Da Verbindung **72** nur auf 68 % Transaktivierung kommt, könnte sich hier eine Erhöhung der IA der Zerfallsprodukte beobachten lassen. Es wurde nicht mit der propylsubstituierten Verbindung **74** gearbeitet, da diese 100 % IA erreicht.

Die Abbauprodukte **72a** und **72b** (weitere Informationen zu Struktur und Abbau in Kapitel 4.2.6) und das nur durch seine Masse charakterisierte **72*** zeigten jedoch keine (**72b**, **72***) oder stark abgeschwächte (**72a**) Estrogenität (Abbildung 6.13) und ebenfalls keine antiestrogenische Wirkung (Daten nicht gezeigt). Somit wird für alle estrogenen Verbindungen angenommen, dass jeweils die Ursprungsverbindung die Wirkung ausübt.

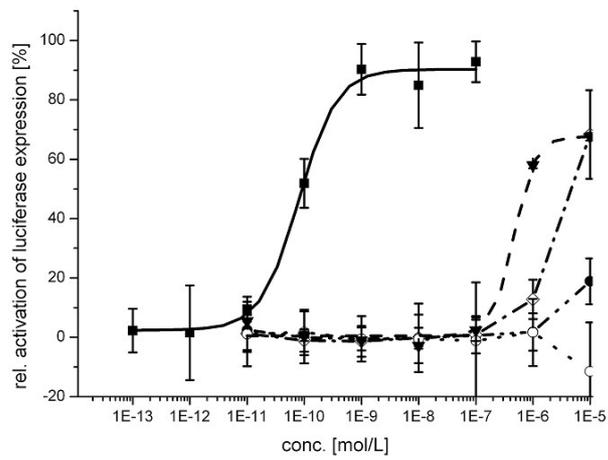


Abbildung 6.13: Testung der Abbauprodukte von **72**:

■ E2 ; ▼ 72; ● 72*; ◇ 72a; ○ 72b

6.4 Prostaglandin E₂-Assay: Hemmung der Cyclooxygenasen

Da die besprochenen Triarylpyrrole einigen selektiven Cyclooxygenase-(COX)hemmern recht ähnlich sehen (Abbildung 6.14) und zudem in der vorangegangenen Arbeit von Hoffmann⁹⁸ festgestellt wurde, dass den hier getesteten Substanzen analoge Verbindungen gute COX-Hemmer sein können, wurden die chlorierten und fluorierten methoxylierten Pyrrole auf COX-Hemmung getestet. Es zeigte sich, dass die Verbindungen im Gegensatz zu den von Hoffmann synthetisierten Substanzen die COX nicht zu hemmen vermochten. Deswegen wurde von einer genaueren Untersuchung abgesehen. Die Durchführung des Tests ist in Kapitel 8 beschrieben.

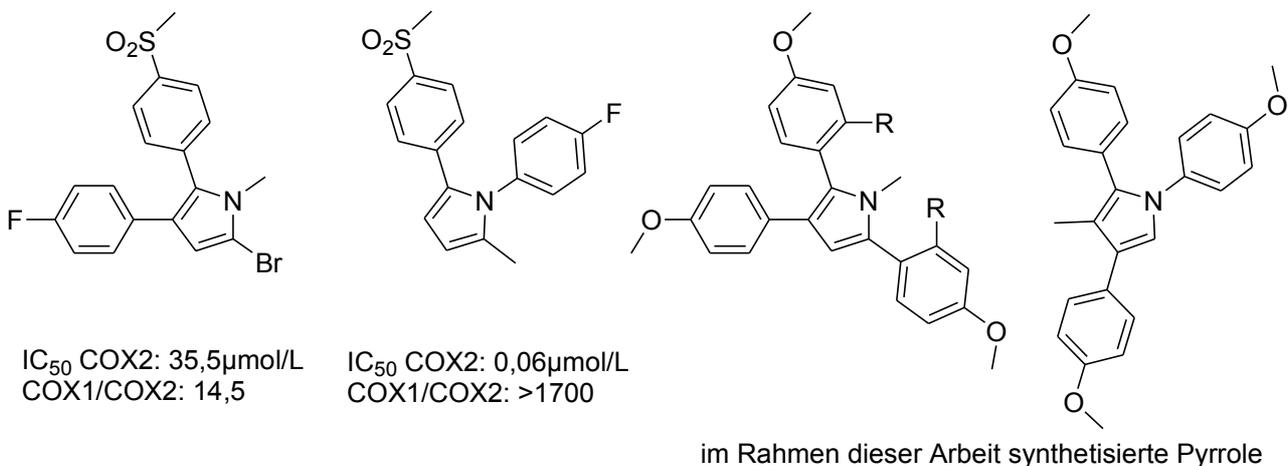


Abbildung 6.14: Strukturelle Ähnlichkeit der Testverbindungen mit bekannten COX-Inhibitoren. links: COX2 bevorzugende und selektive Pyrrole von Wilkerson¹⁹³ und Khanna¹⁹⁴. IC_{50} -Werte bestimmt an isolierten Isoenzymen; rechts: die beiden Grundstrukturtypen der in dieser Arbeit synthetisierten Pyrrole.

In Abbildung 6.15 lässt sich sehen, dass die Substanzen keine COX-Hemmung aufweisen. Die einzige Verbindung, welche überhaupt die Aktivität verringert, ist **27** (Strukturformel Abbildung 6.16), jedoch ist die Wirkung bei 1 μ mol/L genauso wie bei 10 μ mol/L (70 % Enzymaktivität). Verbindung **27** hat von den auf COX-Hemmung getesteten Triarylpyrrolen die stärkste Cytotoxizität an MCF-7-Zellen (IC_{50} : 7,8 μ mol/L). Der Assay wird jedoch mit MDA-Zellen durchgeführt und an diesen besitzt **27** keine cytotoxische Wirkung. **19** scheint die Aktivität der COX sogar zu steigern, eine Bestimmung von COX-„Aktivierung“ ist allerdings mit dem vorliegenden Assay nicht möglich.

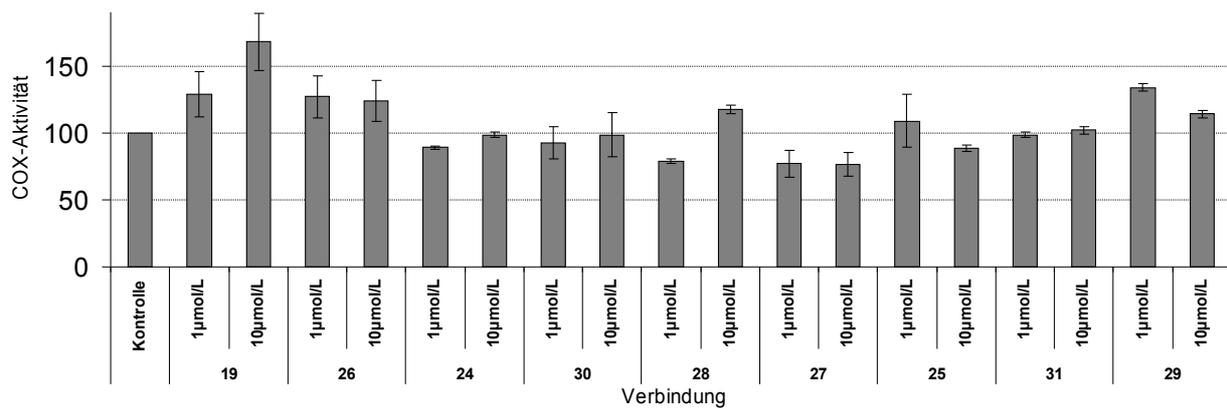


Abbildung 6.15: Bestimmung der Enzymaktivität von COX im Ganzzellassay an MDA-MB-231-Zellen. Kontrolle: 100% Aktivität der Enzyme. Verbindung 19: nichthalogenierte Vergleichssubstanz. Verbindungen 26, 24, 30 und 28: chlorierte Verbindungen; 27, 25, 31 und 29: fluorierte Verbindungen.

Aus diesem Grunde wurde von der weiteren Testung anderer Verbindungen und Bestimmung der Hemmwirkung auf COX 1 und 2 abgesehen. Hydroxylierte analoge Verbindungen zeigten ebenfalls keine Hemmung der COX (Daten nicht gezeigt).

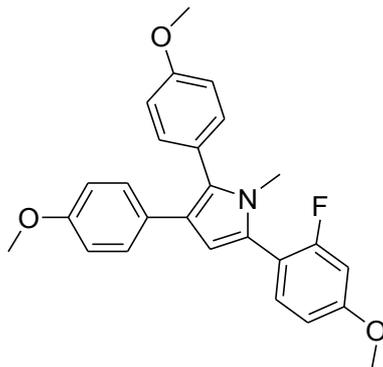


Abbildung 6.16: Verbindung 27 zeigt eine Hemmung der Enzymaktivität um 30 % in einer Konzentration von 10 µmol/L

Da durch Hoffmann aktive Verbindungen synthetisiert worden waren, kann die fehlende Wirkung nicht in der Anwesenheit eines dritten Aromaten begründet sein. Auch ihre Verbindungen trugen drei Aromaten. Das aktivste Pyrrol hatte eine IC_{50} an der COX1 von 20 nmol/L. Da auch die weiteren aktiven Verbindungen in einer Konzentration von 10 µmol/L eine vollständige Hemmung beider Isoenzyme hervorriefen, wäre eine Erweiterung des Testrahmens auf 100 µmol/L für die hier getesteten Verbindungen nicht sinnvoll gewesen. Bei solch hohen unphysiologischen Konzentrationen könnte eine eventuelle Hemmung im Zellassay nicht mehr auf spezifische Interaktion mit dem Enzym zurückgeführt werden. Hoffmanns Verbindungen waren umso schlechter wirksam, desto länger die Alkylkette war. Es kann nur gemutmaßt werden, dass sich die Verbindungen aufgrund ihres anderen Substitutionsmusters sehr viel schlechter in die Ligandenbindungsdomäne der COX einlagern können. Es war gezeigt worden, dass nichtalkylierte Pyrrole mit einem oder mehr Chloratomen in den Aromaten die beste Aktivität an der COX besaßen. Daher wurden Versuche unternommen, analoge Verbindungen zu synthetisieren, um

diese mit den aktiven Verbindungen zu vergleichen, leider erwiesen sich diese als synthetisch nicht zugänglich.

7 Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit gelang es, stabile Triarylpyrrole zu synthetisieren, welche estrogene Wirkung aufweisen.

Estradiol, der natürliche Ligand für die ER, passt, verglichen mit z.B. Aldosteron oder Progesteron, außergewöhnlich gut in seine LBD¹⁹⁵. Veränderungen an diesem Steroidkörper führen in den meisten Fällen zu einer Abschwächung der Estrogenität^{75, 196}. Dennoch gibt es auch sehr viele nichtsteroidale Verbindungen, welche zum Teil sehr starke estrogene Eigenschaften besitzen.

Neben der üblichen Ausrichtung in der LBD, wie sie bei sogenannten „Typ I-Estrogenen“ (E2, DES) vorliegt, gibt es Verbindungen, welche estrogene Eigenschaften haben, ohne die Voraussetzungen für diese zu erfüllen (Im-N-Et, Pip-N-Et, siehe Kapitel 2, „Einleitung“). Für diese sogenannten „Typ II-Estrogene“ wurde ein anderer Bindungsmodus postuliert (Abbildung 7.1).

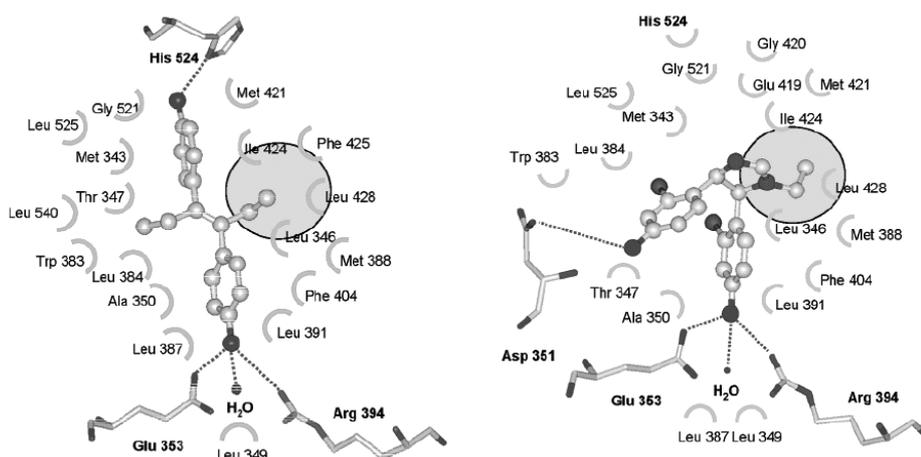


Abbildung 7.1: Links: DES in der LBD von ER α . Rechts: Postulierter Bindungsmodus des Typ II-Estrogens Im-N-Et⁹⁰

Es stellt sich die Frage, zu welcher Gruppe die Triarylpyrrole gehören. Sie verfügen über drei Hydroxygruppen; sowohl, wie in Abbildung 7.2 gezeigt, im Abstand von 12,8 Å (Typ I-Estrogene), als auch im Abstand von 7,5 Å (Typ II-Estrogene).

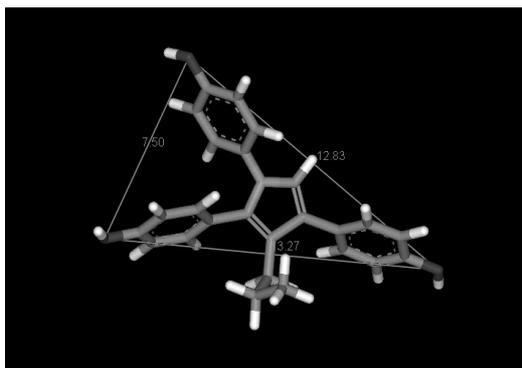


Abbildung 7.2: Abstände der OH-Gruppen von **39**, energieminierte Ausrichtung der Aromaten unter Verwendung von SYBYL 6.91

Typ II-Estrogene zeigen eine sehr schwache RBA, lösen aber in Reporterplasmidassays dennoch Transaktivierung aus. Von den vorliegenden Triarylpyrrolen wurde die RBA nicht bestimmt. Zwei Pyrrolserien mit analogem Substitutionsmuster (als Typ 1 und Typ 2 bezeichnet, siehe Abbildung 7.3) zeigten jedoch sehr geringe RBA-Werte⁹⁸. Daher wird davon ausgegangen, dass auch die jeweilige RBA der Typ A- und Typ B-Pyrrole sehr niedrig sind. Dennoch zeigen die Verbindungen estrogenen Eigenschaften. Dies, und der O-O-Abstand von 7,5 Å, spricht also durchaus für Typ II Estrogene.

Allerdings verschwand die estrogenen Aktivität vollständig, wenn der „isolierte“ Aromat in 2-Stellung (Typ 1) bzw. 4-Stellung (Typ 2) des Pyrrolrings nicht mit einer OH-Gruppe substituiert war⁹⁸. Diese Hydroxylierung wäre aber für eine Typ II-Estrogenität nicht nötig. Zudem wiesen Typ A-, Typ 1- und Typ 2-Pyrrole bei Substitution dieses Aromaten mit Chlor keine estrogenen Eigenschaften mehr auf. Typ II-Estrogene hingegen zeigen bei Substitution der Aromaten mit Chlor eine höhere Aktivität⁸⁶. Daher handelt es sich bei den Typ A- und Typ B-Triarylpyrrolen wahrscheinlich um Typ I-Estrogene. Gewissheit könnte aber nur durch eine Röntgenkristallstruktur vom Pyrrol in der LBD des ER erlangt werden.

Alkylrest	Verbindung (Typ A)	EC ₅₀	Verbindung (Typ B)	EC ₅₀	Verbindung (Typ 1)	EC ₅₀	Verbindung (Typ 2)	EC ₅₀
-Met	37	130	72	440	RH85	--	RH147	--
-Et	38	50	73	100	RH89	38	RH152	25
-Prop	39	50	74	70	RH93	170	RH157	120

Tabelle 7.1: Vergleich der vier verschiedenen Substitutionsmuster in Bezug auf ihre estrogenen Aktivität. EC₅₀ in nmol/L (MCF-7/2a-Zellen).

In Tabelle 7.1 werden ausgewählte Verbindungen miteinander verglichen: Zum einen die in dieser Arbeit synthetisierten Typ A- und Typ B-Pyrrole, zum anderen die 4-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ 1) und die 5-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ 2).

Während bei den Typ 1- und Typ 2-Verbindungen das jeweils ethylsubstituierte potenter ist als das propylsubstituierte Pyrrol, sind bei den Typ A- und Typ B-Verbindungen das propyl- und ethylsubstituierte Pyrrol etwa gleich wirksam. Die jeweils N-arylierten Verbindungen (Typ B und Typ 2) erreichen jeweils 100 % der intrinsischen Aktivität (IA) von E2 im Estrogenitätstest an MCF-7/2a-Zellen. Sie sind volle Agonisten. Die nicht N-arylierten Verbindungen (Typ A und Typ 1) besitzen zwischen 60 und 80 % IA und sind damit partielle Agonisten. Die N-arylierten Pyrrole sind lipophiler. Offenbar lässt sich eine IA von 100 % durch Erhöhung der Lipophilie erreichen. Typ 1 und Typ 2-Pyrrole sind etwa gleich potent, während die Typ A-Pyrrole potenter als die Typ B-Pyrrole sind. Dies ist bemerkenswert, da sich die Verbindungen nur durch die Stellung des Stickstoffs unterscheiden.

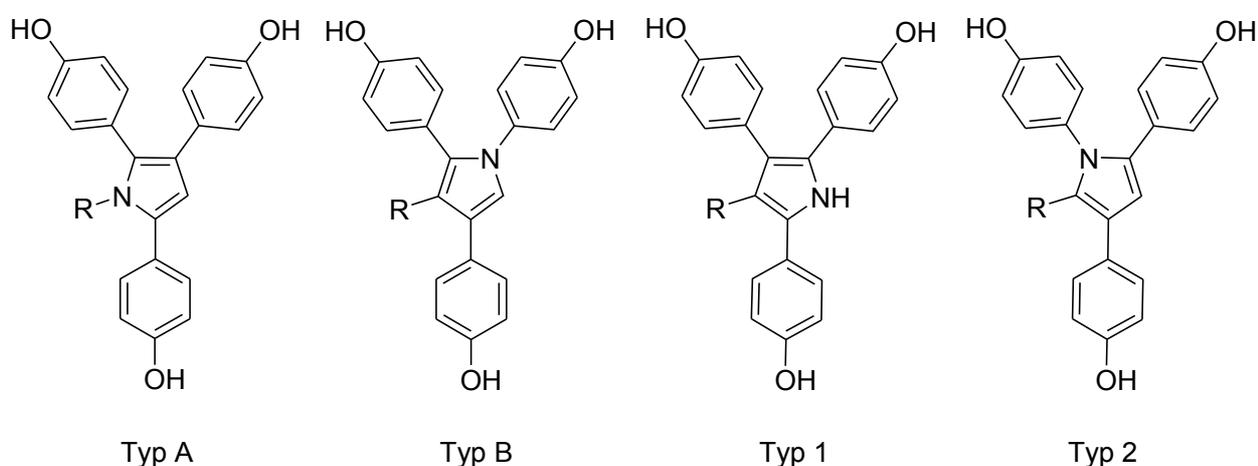


Abbildung 7.3: Strukturformeln und Bezeichnungen der in dieser Diskussion verglichenen Substitutionsmuster von Triarylpyrrolen. R = Alkylrest, der nach unten zeigende, „isolierte“ Aromat ist vermutlich derjenige, welcher den A-Ring von E2 imitiert.

Da die OH-Gruppe am „isolierten“ Aromaten unerlässlich für die estrogene Wirkung ist und eine Substitution mit Chlor in ortho-Position die Estrogenität aufhebt (Verbindungen **44** und **48**), wird angenommen, dass der „isolierte“ Aromat den A-Ring von E2 imitiert. Die Bindungstasche der ER toleriert in diesem Bereich keine größeren Substituenten, wie schon an verschiedenen Steroiden gezeigt werden konnte¹⁹⁶. Im Gegensatz zu Typ II-Estrogenen, bei welchen Cl-Substitution die Estrogenität erhöht, ist hier Chlor eher hinderlich. Dies ist auch in guter Übereinstimmung mit der Literatur über ähnliche Liganden des ER^{93, 98}. Eine Substitution mit Fluor beeinträchtigt die estrogene Wirkung aber nicht. Alle in dieser Arbeit getesteten Verbindungen mit Fluor in den ortho-Positionen der Aromaten behielten ihre estrogene Aktivität. An den synthetisierten Verbindungen lassen sich Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen. So wird gegenüber der nicht mit Fluor substituierten Verbindung **39** durch Fluor in einem Aromaten beim Estrogenitätstest die intrinsische Aktivität erhöht und die Potenz abgeschwächt (Verbindungen **47** und **49**). Auch bei der chlorierten Verbindung **46** geschieht dies. Die analoge chlorierte Verbindung **48** ist allerdings wirkungslos.

Es konnte durch Substitution der Aromaten mit Fluor oder Chlor bei den N-propylierten Typ A-Pyrrolen erreicht werden, dass diese im Estrogenitätstest ebenfalls 100% Transaktivierung erreichten. Die Typ B-Pyrrole erreichten 100 % IA bereits ohne Halogensubstitution. Da die N-arylierten Typ B-Pyrrole lipophiler sind (laut HPLC-Untersuchungen), liegt der Verdacht nahe, dass ein Erreichen von 100% IA nur über die Lipophilie ermöglicht wird. Dafür spricht auch, dass die Typ 1-Pyrrole (am Stickstoff nicht substituiert), welche natürlich viel hydrophiler als die N-arylierten Typ 2-Pyrrole sind, auch nicht 100% IA aufwiesen. Allerdings ist die Lipophilie nicht das einzige Kriterium, denn die lipophileren dialkylierten Typ A und Typ B-Pyrrole wiesen niedrigere IA auf (**53**, **54**, **87**, **88**). Insgesamt besteht keine Korrelation zwischen IA und Lipophilie (Abbildung 7.4).

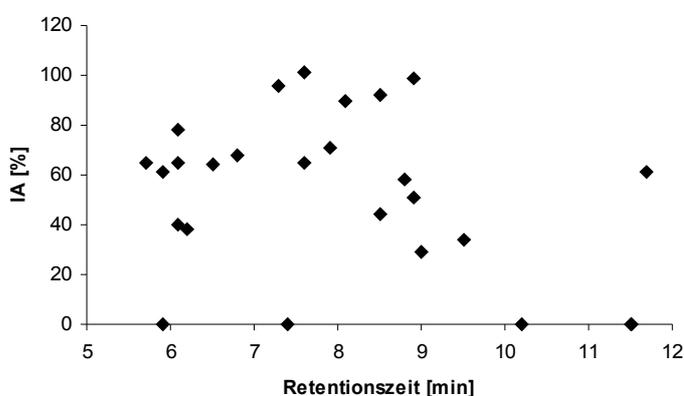


Abbildung 7.4: Retentionszeiten der untersuchten Typ A- und B-Verbindungen gegen die intrinsische Aktivität im Estrogenitätstest aufgetragen.

Keines der hier besprochenen Pyrrole erreicht jedoch die Aktivität von PPT, welches von der Gruppe um Katzenellenbogen synthetisiert und getestet wurde.

Sehr viele heteroaromatische Strukturen mit Wirkung am ER stammen von Katzenellenbogen et al.^{94-97, 197}. PPT ist ein ER α -selektiver Agonist mit einer EC₅₀ von 0,2 nmol/L an MCF-7/2a-Zellen⁹⁸. Im Gegensatz dazu zeigten analoge Imidazole sehr geringe Interaktion mit dem ER. Zudem wirken bestimmte Imidazole sowohl an ER α als auch an ER β ¹⁹⁸. Fink⁹² schlug vor, dass Imidazole aufgrund ihrer Polarität und ihres hohen Dipolmoments so viel schlechtere Liganden seien als Pyrazole. Die vorliegenden Triarylpyrrole haben nahezu die gleiche Struktur wie die hochaktiven Pyrazole und auch ein sehr ähnliches Dipolmoment: Pyrrol hat ein Dipolmoment von 1,8 Debye (D), Pyrazol von 1,6 D, Imidazol hingegen von 3,8 D (alle in Benzol). In polareren Lösungsmitteln können sie Wasserstoffbrücken ausbilden; das Dipolmoment ist dann höher (In Dioxan; Pyrrol: 2,1 D; Pyrazol: 2,2 D)^{116, 199}. Das berechnete Dipolmoment von E2 liegt bei 2,3 D²⁰⁰. Durch unterschiedliche Substituenten wird das Dipolmoment nicht sehr verändert, wenn es sich nicht um Aldehyd- oder Säuregruppen handelt²⁰¹. Da also Pyrrol und Pyrazol vergleichbare Dipolmomente besitzen, können diese nicht die Erklärung für den großen Unterschied in der Wirkung sein.

Außerdem wurde die Basizität des Imidazols als Grund für die schwache Estrogenität angeführt. Pyrrol jedoch ist nicht basisch und wirkt dennoch sehr viel schwächer als die Pyrazole.

Zuerst verglichen Katzenellenbogen und Mitarbeiter ihre triarylsubstituierten Heteroaromaten mit Raloxifen und betteten sie analog zu diesem in die Bindungstasche des ER⁹². Später widerriefen sie diese Annahme, da es sich ja, im Gegensatz zu RAL, bei den Verbindungen um Agonisten handelt. Daraufhin führten sie ein *docking* durch, bei welchem sie diese Agonisten E2 entsprechend in die Bindungstasche legten⁹⁴.

Da PPT den Typ A- und Typ B-Triarylpyrrolen sehr ähnlich sieht, wurden letztere Verbindungen ebenfalls auf ER α / β -Subtypselektivität überprüft.

In Tabelle 7.2 sind die Ergebnisse des ER α / β -Subtyptests an U2-OS-Zellen dargestellt²⁰². Hier erreichen fast alle Verbindungen 100% Transaktivierung. Die aktivste Verbindung ist **40** mit einer EC₅₀ von 0,05 nmol/L und einer IA von 105 %. Im MCF-7/2a-Assay ist diese Verbindung schwächer und zeigt eine EC₅₀ von 80 nmol/L und eine IA von 51 %. Hingegen haben die aktivsten Verbindungen im MCF-7/2a-Assay, Verbindung **39** (EC₅₀: 50 nmol/L; IA: 65 %) im subtypselektiven Test nur eine EC₅₀ von 0,4 nmol/L und eine IA von 55 % und **51** (EC₅₀: 30 nmol/L; IA: 88 %), hier eine EC₅₀ von 0,27 nmol/L und eine IA von 107 %. Einige Verbindungen sind in beiden Testsystemen eher schwach: **45**, **43**, **42** und **50**. Verbindung **37** jedoch hat an MCF-7/2a-Zellen eine EC₅₀ von 130 nmol/L und an U2-OS-Zellen von 20 nmol/L. Sie ist an MCF-7/2a-Zellen etwas wirksamer als Verbindung **49**, an U2-OS-Zellen jedoch etwa 30 mal schwächer als diese. Insgesamt scheint keine Korrelation zwischen den Ergebnissen zu bestehen und im subtypselektiven Test sind die Substanzen etwa 10 bis 100 mal potenter, dies gilt auch für E2.

(Nr)	IA an ER α (%) U2-OS-Zellen	IA (%) MCF-7/2a-Zellen	EC ₅₀ (nmol/L) U2-OS-Zellen	EC ₅₀ (nmol/L) MCF-7/2a-Zellen
37	96	65 \pm 1	20	130
38	103	65 \pm 12	0,98	50
39	55	65 \pm 12	0,4	50
40	105	51 \pm 9	0,05	80
45	86	40 \pm 9	24	--
43	101	61 \pm 11	60	--
49	91	71 \pm 1	0,67	240
47	72	101 \pm 1	0,12	70
42	97	64 \pm 7	16	600
46	87	92 \pm 10	0,31	63
50	110	78 \pm 5	15	290
51	107	88 \pm 14	0,27	30

Tabelle 7.2: EC₅₀ -Werte und IA der getesteten Verbindungen im ER α /ER β -subtypselektiven Test. ER α -Werte sind gezeigt; an ER β keine relevante Interaktion. Im ER α /ER β -subtypselektiven Estrogenitätstest hat E2 eine IA von 100 % und eine EC₅₀ von 0,004 nmol/L an ER α ²⁰².

Wellner²⁰² konnte im ER α /ER β -subtypselektiven Estrogenitätstest nachweisen, dass die Triarylpyrrole nur an ER α eine Wirkung aufweisen (siehe Tabelle 7.2). Es stellt sich die Frage, weswegen die Verbindungen nicht an ER β wirken. Zum einen ist die Ligandenbindungsdomäne von ER α 20 % größer als die von ER β ^{38, 203}. Zum anderen ist in der LBD ein lipophiler Aminosäurerest (Methionin 336) bei ER β länger als bei ER α (Leucin 384)²⁰⁴. Nach dem oben erwähnten *molecular modeling* haben die Pyrrole und auch Pyrazole an dieser Stelle einen größeren Platzbedarf⁹⁴.

Dies eröffnet einen Wirkmechanismus für eine neue Klasse von Therapeutika gegen hormonabhängigen Brustkrebs: Die Substanzen interagieren nur mit ER α , und analoge, von Hoffmann⁹⁸ synthetisierte Verbindungen, *down*-regulieren den ER α so stark wie E2 oder stärker. Bei Brustkrebs wird oft ER β weniger exprimiert als ER α , und ER α im Gegensatz zu gesundem Gewebe sehr viel stärker^{50, 52, 53, 176}. Folglich könnten die Verbindungen nur ER α herunterregulieren und somit das natürliche Gleichgewicht wieder herstellen. Da sie im Vergleich zu E2 im Estrogenitätstest 100-1000 mal schwächer wirksam sind, besteht die Möglichkeit, dass sie die Verringerung des ER α -Gehalts ausüben, bevor sie die Transkription vollständig aktivieren. Vielleicht sind die Verbindungen im Estrogenitätstest auch deswegen eher schwach potent, weil sie den ER α herunterregulieren: Es existiert weniger Rezeptorprotein, also kann das Luciferasegen seltener abgelesen werden. Aufgrund einer Verminderung des Rezeptorproteins könnten auch die RBAs der Typ 1- und Typ 2-Pyrrole so schlecht gewesen sein: es bestand keine Korrelation von Transaktivierung und RBA, eher noch besaßen die estrogen wirksamen

Verbindungen einen geringeren RBA als die schlecht oder nicht wirksamen⁹⁸. Dagegen spricht allerdings, dass im RBA-Assay nur 45 min mit den Substanzen inkubiert wird, während die Verbindungen bei der Bestimmung des ER-Gehaltes 24 Stunden inkubiert werden und so ein größeres Zeitfenster für die *down*-Regulierung besteht. Es sollte in weitergehenden Untersuchungen die *down*-Regulierung der synthetisierten Verbindungen in Abhängigkeit von der Zeit gemessen werden. Hoffmanns Verbindungen waren teilweise in der Lage, den Proteingehalt stärker herunterzuregulieren als E2. Ihre Verbindung **RH175** erreichte auch in 10^{-8} molarer Konzentration die *down*-Regulation von E2 (33 bzw 29% \pm 5) und in höherer Konzentration deutlich weniger (10^{-6} molar: 18%). Dies stellt einen Gegensatz dar zur Literatur, in der eine direkte Korrelation zwischen RBA und *down*-Regulation beschrieben wird²⁰⁵, d.h. eine hohe RBA entspricht einer starken *down*-Regulierung. Allerdings wird der Rezeptorgehalt geringer, je länger man inkubiert. Während Antiestrogene wie ICI 164.384 den Rezeptorgehalt sehr stark verringern, erhöht beispielsweise 4-OHT diesen.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Fähigkeit zur *down*-Regulierung des ER durch PPT zu untersuchen.

In Bezug auf die cytotoxischen Wirkungen weist erst die bei zwei Aromaten in ortho-Position fluorierte Verbindung **51** relevante Cytotoxizität auf (IC_{50} -Werte an MCF-7-Zellen (in $\mu\text{mol/L}$): **39**: 30,9 < **49**: 26,9 < **47**: 16,7 < **51**: 8,0).

Bei Hoffmanns Typ 2-Triarylpyrrolen erhöhte eine Substitution mit Chlor die Cytotoxizität nicht. Es wäre interessant, zu erfahren, ob auch die hier synthetisierten Typ B-Triarylpyrrole mit anderem Substitutionsmuster sich so verhalten würden, trügen sie Chlor oder Fluor in ihren Aromaten. Die N-alkylierten Triarylpyrrole hingegen waren cytotoxischer bei Substitution eines oder mehrerer Aromaten mit einem Halogen (Beispiel siehe Abbildung 7.5). Die IC_{50} (in $\mu\text{mol/L}$) verringert sich durch ein Verschieben des Stickstoffes um eine Position im Ring von $22,5 \pm 3,1$ auf $14,9 \pm 1,3$. Diese Unterschiede sprechen durchaus für eine spezifische Interaktion mit einem bisher nicht identifizierten Target.

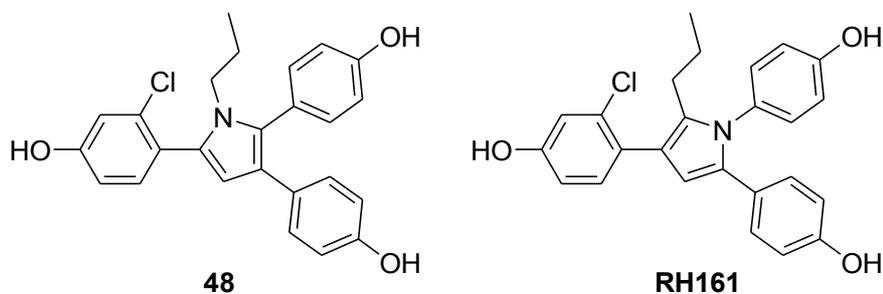


Abbildung 7.5: Die Verbindungen **48** und **RH161** im Vergleich. IC_{50} von **48**: $14,9 \pm 1,3 \mu\text{mol/L}$; von **RH161**: $22,5 \pm 3,1 \mu\text{mol/L}$. Beide Verbindungen weisen keine estrogenen Aktivität mehr auf.

Es kann aus den gewonnenen Erkenntnissen nicht geschlossen werden, ob die Pyrrole durch Interaktion mit einem spezifischen Target toxisch wirken oder nicht. Die Cytotoxizität korreliert nicht mit den estrogenen Eigenschaften. Beispielsweise sind die zweifach alkylierten Verbindungen **88** und **54** recht cytotoxisch (IC_{50} an MCF-7/2a-Zellen: 6,3 bzw. 5,0 $\mu\text{mol/L}$), aber nicht estrogen. Ebenfalls ist das chlorierte **48** cytotoxisch aber nicht mehr estrogen. Es ist in der Tat so, dass sich eine Hemmung des Zellwachstums und Estrogenität bei diesen Verbindungen eher ausschließen. Normalerweise verstärken Estrogene das Wachstum von ER positiven Brustkrebszellen. Antiestrogene bringen das Wachstum zum Stillstand. Von den hier getesteten Verbindungen wirken einige (**51**, **47**, **46**) estrogen und wachstumsinhibierend. Nur Verbindung **40** zeigt leichte antiestrogene Aktivität.

Fluorierte Verbindungen können bei erhaltener Estrogenität cytotoxisch wirken.

Zu den cytotoxischen Eigenschaften der hydroxylierten Verbindungen lässt sich sagen, dass diese wahrscheinlich nicht über den ER ausgeübt werden, denn sie sind an MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen etwa gleich. Dies spricht für eine zelltypunabhängige Wirkung. Es sollten die toxischsten Verbindungen an normalen Zellen getestet werden, um feststellen zu können, ob nicht entartete Zellen ebenfalls angegriffen werden. Beispielsweise könnten Brustepithelzellen wie die nicht tumorigenen MCF-10A-Zellen verwendet werden, die allerdings ER negativ sind²⁰⁶. MCF-7-Zellen werden zwar häufig als Modell für ein hormonabhängiges Mammacarcinom verwendet, können aber nicht die Vielfalt realer Tumoren in lebenden Organismen abbilden.

Zusätzlich sollte versucht werden, weitere Fluoratome in die Aromaten einzuführen, da dies vom ER offenbar gut toleriert wird und eine Erhöhung der Cytotoxizität mit sich bringt. Eine Substitution mit Fluor in meta- statt ortho-Position des A-Rings erbrachte für einige Verbindungen eine höhere RBA¹⁹⁶.

Denkbar wäre auch eine Insertion einer CH_2 -Gruppe zwischen Pyrrol und Aromat um flexible Variationen der Pyrrole zu erhalten, da bereits gezeigt werden konnte, dass dies beispielsweise für TAM zu einer höheren antiestrogenen Aktivität führen kann²⁰⁷.

Auf den ersten Blick erscheint es als Nachteil, dass viele der synthetisierten Verbindungen einer Oxidation durch Luftsauerstoff unterliegen. Allerdings konnten im Laufe der Arbeit aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse Substanzen synthetisiert werden, welche diese Problematik nicht mehr aufweisen. Außerdem folgt der Abbau einem logischen Muster, weswegen Beziehungen zwischen Struktur und Stabilität aufgestellt werden konnten. So sind die in 2 und 5 phenylsubstituierten Triarylpyrrole, welche elektronenziehende Substituenten in den Aromaten tragen und am Stickstoff eine Alkylkette aufweisen, nicht mehr luftsauerstoffempfindlich.

Die in den UV-Untersuchungen beobachtete schwach gelbe Färbung der Untersuchungslösung könnte eventuell durch die Anlagerung von C=O-Bindungen an das Chromophor erklärt werden, welche eine Bathochromie verursachen könnten.

Triarylpyrrole fluoreszieren, haben jedoch ihr Maximum genau dort, wo auch die Zelle fluoresziert. Da die Verbindungen nicht bei höheren Wellenlängen als die Zelle fluoreszieren, konnten leider keine Zellaufnahmestudien durchgeführt werden, obwohl dies aufgrund der unterschiedlichen Aktivitäten von N-arylierten und N-alkylierten Pyrrolen im Estrogenitätstest interessant wäre. Für Fluoreszenz werden planare, starre, durchkonjugierte Moleküle benötigt. Man könnte also weitergehend versuchen, das Pyrrol durch den Einbau einer Bindung zwischen zwei Aromaten zu versteifen, um eine Fluoreszenz bei höheren Wellenlängen zu erreichen, womit auch eine Sichtbarmachung des Rezeptors ohne den Einsatz von Radioaktivität möglich wäre. Oder man könnte eine durch ein Mitglied des Arbeitskreises in der Entwicklung befindliche Methode nutzen, die Zellaufnahme fluorierter Verbindungen mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) zu bestimmen (*continuum source AAS*).

Überraschenderweise konnte keine der hier synthetisierten Verbindungen die Cyclooxygenase hemmen. Aufgrund der Untersuchungen von Hoffmann war zumindest eine Aktivität der Verbindungen **24** und **26** (methylsubstituiert, ein Chloratom in o-Position eines Aromaten) erwartet worden (Abbildung 7.6). Die analoge Verbindung **RH127** zeigte in 1 μ molarer Konzentration eine Hemmung des Enzyms von über 50 %, in 10 μ molarer Konzentration war das Enzym zu 100 % gehemmt.

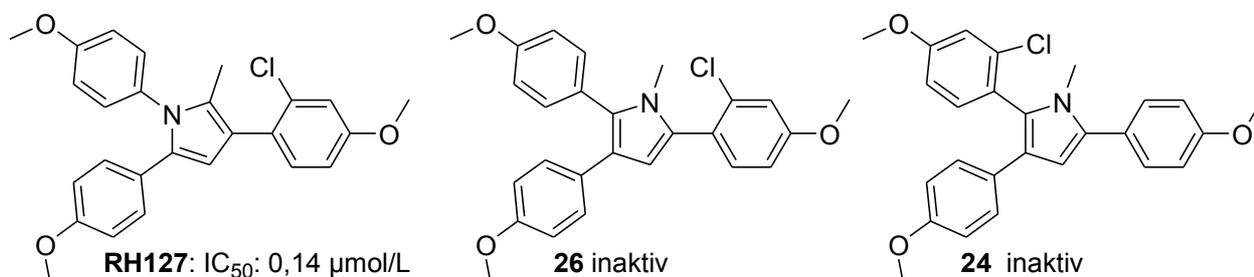


Abbildung 7.6: Vergleich von Hoffmanns analogem Triarylpyrrol **RH127** und den in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen **24** und **26**.

Die von Hoffmann erhoffte Kombination von Cytotoxizität und COX-Hemmung lässt sich mit den 2,3,5-Triarylpyrrolen offensichtlich nicht erreichen. Interessant wäre hier eine Substitution der von Hoffmann synthetisierten 1,2,4-Triaryl-5-alkylpyrrolen mit mehreren Fluoratomen in den Aromaten, da sich mit mehreren Chloratomen der Ringschluss nicht mehr bewerkstelligen ließ²⁰⁸. Hierbei könnte auch die Frage beantwortet werden, ob fluorsubstituierte Triarylpyrrole generell keine COX-Hemmung zeigen.

In vorhergehenden Veröffentlichungen mit ähnlichen Verbindungen war eine Korrelation der Hemmung des Zellwachstums mit der COX-Hemmung festgestellt worden⁹³. Dies konnte hier nicht bestätigt werden.

Da alle Versuche, die Typ B-Pyrrole (3-Alkyl-1,2,4-triaryl-pyrrole) mit Halogenen in den ortho-Position der Aromaten zu substituieren, nicht von Erfolg gekrönt waren, könnten die Typ 2-Pyrrole (1,2,4-Triaryl-5-methylpyrrole) fluoriert werden, da diese auch Wirkung an der COX zeigen. Ein erhöhter Prostaglandinspiegel steht in Zusammenhang mit stärkerer Metastasierung von Brusttumoren²⁰⁹. Etwa 40 % der Mammacarcinome haben erhöhte Prostaglandinspiegel. Eine zellwachstumshemmende Wirkung der Verbindungen über die COX-Inhibition wäre möglich. Für die hier getesteten Triarylpyrrole ist dies aber unwahrscheinlich, da die cytotoxischen Verbindungen keine Hemmung der COX aufwiesen.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass sehr geringe Veränderungen an Molekülen zu einem drastischen Wandel der pharmakologischen Eigenschaften führen können.

Zusammengefasst lässt sich somit nur sagen, dass das eventuelle Target, über welches die Verbindungen cytotoxisch wirken, nicht der ER (siehe Kapitel 6.3) und ebenfalls nicht die COX (siehe Kapitel 6.4) sein kann.

Es könnte vermutet werden, dass die Verbindungen unspezifisch durch Einlagerung in die Lipiddoppelmembran der Zellen toxisch wirken. Jedoch korreliert die Lipophilie nicht mit den ermittelten IC_{50} -Werten (Abbildung 7.7). Als Ausmaß der Lipophilie wurde nicht der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P$) verwendet, da dessen Bestimmung sehr aufwendig ist. Statt dessen wurden die Retentionszeiten aus der HPLC-Methode (Kapitel 8.3) herangezogen. Sie wurden alle unter den gleichen Bedingungen bestimmt und stellen daher ein realistischeres Maß für die Lipophilie dar als berechnete $\log P$ -Werte.

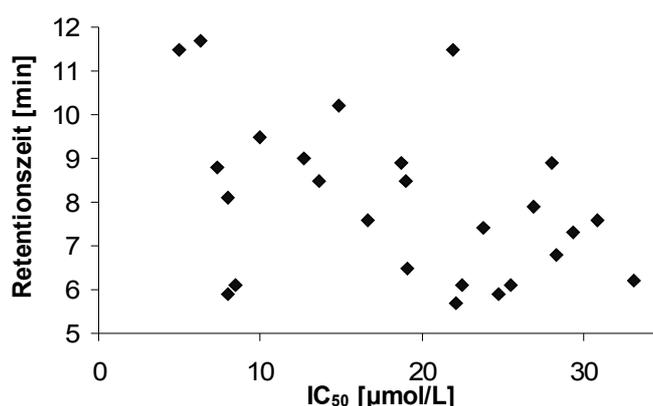


Abbildung 7.7: Retentionszeiten der untersuchten Typ A- und Typ B-Pyrrole gegen die IC_{50} aufgetragen.

Sowohl bei den Cytotoxizitätstests als auch bei den Estrogenitätstests zeichneten sich die Verbindungen durch recht steile Konzentrations-Effekt-Kurven aus. Die Steilheit gibt Auskunft darüber, wie groß der Unterschied zwischen einer minimal messbaren Wirkung und der Maximalwirkung der Verbindung ist. Übertragen auf ein Tiermodell spräche man von Dosis-

Wirkungskurven. Ein enges therapeutisches Fenster ist ungünstig, da die Wirkung dann schlecht zu steuern ist.

Der Mechanismus der Tamoxifenresistenz ist recht spezifisch. Daher könnte es sogar ein Vorteil sein, wenn die Verbindungen nicht über den ER cytotoxisch wirken.

Nach längerer Gabe von Tamoxifen interpretieren MCF-7-Zellen es als Agonisten. Es wirkt also auf resistente Zellen wachstumssteigernd²¹⁰. Dies hat zwei Gründe. Zum einen wird der Coaktivator AIB-1 (*amplified in breast cancer*, auch SRC-3 genannt) überexprimiert. Zum anderen wird der Corepressor *paired box gene 2* (PAX-2) *down*-reguliert²¹¹. SRC-3 und PAX-2 konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle am Her2-Gen (*human epidermal growth factor receptor 2*), an der auch der ER mit Ligand (hier TAM) andockt. PAX-2 führt zur Inhibierung der Ablesung dieses Gens, SRC-3 hingegen zur up-Regulation. TAM-resistente Zellen haben hohe Her2-Spiegel²¹². In ihnen fällt nämlich die Inhibierung durch PAX-2 weg. Bei Her2 handelt es sich um eine Tyrosinkinase, die in Zellwachstumsprozessen eine Rolle spielt. Überexpression von Her2 führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens von Tumoren und schlechterer Prognose.

Dadurch, dass die meisten Verbindungen nur estrogen sind und keine Wirkung an der COX und auch keine Hemmung der Zellproliferation aufweisen, könnten sie als Modellverbindungen für einen Agonismus an ER α verwendet werden (z.B. Verbindung **39**).

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Triarylpyrrole könnten Leitstrukturen sein für ER α -selektive, cytotoxische Verbindungen (z.B. **51**), welche den ER α -Gehalt verringern. Sie könnten in der Behandlung von hormonabhängigen Mammacarcinomen Anwendung finden.

7.1 Zusammenfassung

Es konnten bereits für einige arylierte Heteroaromaten estrogenische Eigenschaften nachgewiesen werden. Teilweise bestand auch starke Estrogenrezeptor α (ER α)-Subtypselektivität. Bestimmte Pyrazole zeigten eine hohe Rezeptorbindungsaffinität (RBA) und eine große Wirkpotenz. Im Gegensatz dazu nahm die RBA drastisch ab, wenn der Pyrazol- durch einen Imidazolheterocyclus ausgetauscht wurde. Durch Synthese und Testung von Pyrrolen sollten die Gründe für diesen Unterschied beleuchtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1-Alkyl-2,3,5-Triarylpyrrole (Typ A) und 3-Alkyl-1,2,4-triarylpyrrole (Typ B) synthetisiert. Die Synthese der Typ A-Pyrrole erfolgte aus den entsprechenden substituierten 1,4-Diketonen und einem primären Amin in einer Paal-Knorr-Pyrrolsynthese, während die Darstellung der analogen Typ B-Pyrrole aus den jeweiligen substituierten 1,3-Diketonen und 2-Amino-Diethylmalonsäureester mit einer Fischer-Fink-Pyrrolsynthese stattfand.

Durch Variation des Substitutionsmusters konnten jeweils estrogenische und cytotoxische Effekte der Verbindungen beobachtet werden.

Die Verbindungen wurden an MCF-7/2a-Zellen auf Estrogenität getestet. Eine Testung auf zellwachstumshemmende Eigenschaften fand an MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen statt.

Nichtalkylierte Triarylpyrrole wirken nicht estrogen. Bei Alkylsubstitution ist die Reihenfolge der estrogenen Potenz Met < Et = Prop > i-Bu > i-Pent. Das potenteste Triarylpyrrol in Bezug auf estrogenen Eigenschaften ist **51** (Typ A, Propylrest, zwei Fluor in ortho-Position der Aromaten) mit einer halbmaximalen Wirkkonzentration (EC_{50}) von 30 nmol/L. Generell sind Typ A-Pyrrole potenter als Typ B-Pyrrole. Allerdings erreichen erstere nicht die volle intrinsische Aktivität (IA), während dies bei Typ B-Pyrrolen der Fall ist. Durch Substitution mit Fluor in ortho-Position der Aromaten kann die IA von Typ A-Pyrrolen ebenfalls 100 % erreichen. Eine Substitution mit Chlor ist nicht vorteilhaft: Wird ein Typ A-Pyrrol mit Chlor in dem Aromaten substituiert, welcher vermutlich den A-Ring des Estradiol (E2) imitiert, wird die estrogenen Wirkung völlig aufgehoben.

Mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration des Zellwachstums (IC_{50}) von 3,9 $\mu\text{mol/L}$ an MCF-7-Zellen handelt es sich bei **33** (Typ A, Propylrest, zwei Fluor in ortho-Position der Aromaten, Methoxygruppen in para-Position der Aromaten) um das cytotoxischste Triarylpyrrol. Die Cytotoxizität korreliert nicht mit der Lipophilie (laut HPLC) der Verbindungen. Durch Fluorierung oder Chlorierung der Aromaten kann die Cytotoxizität erhöht werden. Den gleichen Effekt hat eine weitere Alkylierung der Alkyl-Triarylpyrrole.

Eine Kombination von Estrogenität und Cytotoxizität wurde bei **51** erreicht (IC_{50} : 8,0 $\mu\text{mol/L}$; EC_{50} : 30 nmol/L). Diese war erwünscht, um durch eine Art *drug targeting* zu erreichen, dass sich ER positive Krebszellen bevorzugt mit den Verbindungen anreichern. Letztere könnten dann hauptsächlich dort cytotoxisch wirken.

Im Gegensatz zu sehr ähnlichen Strukturen, bei denen sich lediglich der Stickstoff an einer anderen Position im Pyrrolring befand, wiesen die Verbindungen keine Hemmung der Cyclooxygenase auf.

In Stabilitätstests mittels HPLC konnte herausgefunden werden, dass einige Triarylpyrrole instabil gegenüber Luftsauerstoff sind. Es handelt sich hierbei zum einen um Typ B-Pyrrole mit einem und zwei Alkylresten, zum anderen um die Typ A-Pyrrole mit zwei Alkylresten. Daher wurden nur Typ A-Pyrrole mit einem Alkylrest weiterentwickelt.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Triarylpyrrole könnten Leitstrukturen für ER α -selektive, cytotoxische Verbindungen sein. Sie könnten in der Behandlung von hormonabhängigen Mammacarcinomen Anwendung finden.

7.2 Summary

Several substituted heteroaromatic compounds display estrogenic properties and some of them with estrogen receptor α (ER α) subtype selectivity. Especially, substituted pyrazoles show a high relative binding affinity (RBA) and a strong potency. Both decrease dramatically if the pyrazole core is replaced by an imidazole.

In order to study the influence of the nitrogen position and the number of heteroatoms, two series of substituted triarylpyrroles, which of course only bear one nitrogen, were synthesized and tested for estrogenic activity.

The synthesis of 1-alkyl-2,3,5-triarylpyrroles (type A) was carried out using the corresponding substituted 1,4-diketones and a primary amine in a Paal-Knorr pyrrole synthesis, whereas the analogue 3-alkyl-1,2,4-triarylpyrroles (type B) were obtained by reacting the respective substituted 1,3-diketones with 2-amino diethyl malonic acid ester in a Fischer-Fink pyrrole synthesis.

The testing of estrogenic activity was performed using MCF-7/2a cells, whereas cell growth inhibiting properties were determined in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Depending on the substitution pattern, the compounds showed estrogenic and cytotoxic effects.

Triarylpyrroles without alkyl substituent did not display any estrogenic properties. If the pyrrole ring is substituted with an alkyl residue, the order of estrogenic potency was R = Met < Et = Prop > i-Bu > i-Pent. The most potent triarylpyrrole was compound **51** (type A, propyl residue, fluorine in ortho position of two aryl residues), exhibiting a half maximal effective concentration (EC₅₀) of 30 nmol/L. In general, type A-pyrroles were more potent than type B-pyrroles. However, type A-pyrroles did not reach full intrinsic activity (IA). By substituting the aryl residues with fluorine in the ortho positions, the IA of type A-pyrroles reached 100%. By contrast, if a type A-pyrrole is substituted with chlorine in the ortho position of the aryl residue which presumably mimics the A-ring of estradiol (E2), the estrogenic effect is completely abolished.

The most cytotoxic triarylpyrrole, compound **33** (type A, propyl residue, fluorine in ortho position of two aryl residues, methoxy groups in para position of the aryl residues), showed a half maximal inhibitory concentration of cell growth (IC₅₀) of 3.9 μ mol/L determined in the MCF-7 cell line. By fluorination or chlorination of the aryl residues, the cytotoxicity was increased. The same effect was achieved by further alkylation of the monoalkyl triarylpyrroles. Not all of those substances exhibited higher cytotoxicity, so this rise could not be entirely explained by an increase in lipophilicity (according to HPLC studies).

In this work, it was desired to obtain compounds that accumulate mainly in ER positive breast cancer cells and exert their cytotoxic effects mainly there (*drug targeting*). This combination of

cytotoxicity and estrogenic activity was observed with compound **51** (IC_{50} : 8.0 $\mu\text{mol/L}$, EC_{50} : 30 nmol/L).

In contrast to very similar structures, which only bear the nitrogen in a different position of the pyrrole ring, the compounds showed no inhibition of cyclooxygenase.

In stability tests using HPLC the type B-pyrroles with one and two alkyl residues, and type A-pyrroles with two alkyl residues were found to be unstable towards oxygen. Therefore, only type A-pyrroles with one alkyl residue were developed further.

The compounds presented in this work could be lead structures for ER α -selective, cytotoxic compounds useful in the treatment of hormone dependent breast cancer.

8 Experimenteller Teil

8.1 Synthesen

8.1.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Chemikalien:

Die für die Synthesen verwendeten Chemikalien wurden von Aldrich (dazu auch Fluka), Steinheim, Acros, Geel/Belgien, Lancaster, Morecambe/England, oder VWR, Bruchsal bezogen.

Lösungsmittel:

Die Lösungsmittel wurden durch geeignete Verfahren absolutiert oder als wasserfreie Ware bezogen.

Säulenchromatographie:

Kieselgel 60 (Korngröße 0,063 bis 0,100 mm), VWR, Bruchsal

Dünnschichtchromatographie:

Chromatographiefolien: Kieselgel-60-F₂₅₄ (Merck, Darmstadt)

UV-Detektion bei 254 und 366 nm (UV-Betrachter von Benda, Wiesloch)

Elementaranalyse:

Die Elementaranalyse wurde mit einem Vario EL (Elementar, Hanau) durchgeführt.

Infrarotspektroskopie:

FT-IR Spektrometer (ATI Mattson Genesis, Wigan/GB)

Intensitätsangaben werden wie folgt abgekürzt: w = schwach, m = mittelstark, s = stark, b = breit.

Die Frequenzangabe (ν_{\max}) erfolgt in cm^{-1} .

Kernresonanzspektroskopie:

Die ¹H-NMR-Spektren wurden mit einem Avance/DPX 400 (Bruker, Karlsruhe) bei 400 MHz aufgenommen. Das jeweilige Lösungsmittel ist angegeben. Die chemische Verschiebung (δ) wird in ppm relativ zum internen Standard Tetramethylsilan angegeben.

Abkürzungen für die Signalaufspaltungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett, "t"= Triplett mit "Nase". J = Betrag der Kopplungskonstante.

Bei einigen Spektren wird ein Dublett der Aromaten durch den Peak des Lösungsmittels CDCl₃ überlagert. Wenn möglich, wird trotzdem eine Verschiebung und Aufspaltung angegeben. Die Aufspaltungen der Aromatenprotonen sind AA'BB'-Systeme mit Aufspaltungsmustern höherer Ordnung. Der Einfachheit halber werden sie in diesem experimentellen Teil dennoch als Dubletts bezeichnet.

Massenspektroskopie:

Die Elektronenstossionisations-Massenspektren wurden mit einem CH-7A (Varian MAT, Bremen) bei 70 eV bestimmt. Die jeweiligen Verdampfungstemperaturen und relativen Signallagen und -intensitäten des Molpeaks und der Fragmente sind angegeben.

Schmelzpunkte:

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi B-545 Schmelzpunktgerät bestimmt und sind unkorrigiert.

8.1.2 Synthesevorschriften und analytische Daten

8.1.2.1 Synthese der 2,3,5-Triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)

Synthese von 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid (1)

0,06 mol (9,98 g) 4-Methoxyphenylessigsäure wird mit 0,09 mol (10,7 g) Thionylchlorid vorsichtig unter Rückfluss zum Sieden erhitzt, bis die Gasentwicklung beendet ist. Überschüssiges Thionylchlorid wird abdestilliert und der Ansatz nach Abkühlen gleich in die nächste Reaktion eingetropft.

$C_9H_9ClO_2$ (184,62)

rötliche Flüssigkeit

Ausbeute: 0,06 mol (11,08 g), 100 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,8$

Allgemeine Vorschrift zur Friedel-Crafts-Acylierung mit 4-Methoxyphenyl-essigsäurechlorid:

Aluminiumchlorid und das entsprechende Anisolderivat werden in absolutem Dichlormethan gelöst und mittels Eisbad auf 0°C abgekühlt. 4-Methoxyphenyl-essigsäurechlorid wird zugetropft; dann wird der Ansatz noch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird auf Eis gegossen, eventuell ausgefallenes Aluminiumhydroxid wird mit verdünnter Salzsäure in Lösung gebracht. Die organische Phase wird mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit Wasser, 2 %iger Natriumhydroxidlösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft.

1,2-Bis(4-methoxyphenyl)-ethanon (2)

0,072 mol (9,6 g) Aluminiumchlorid und 0,06 mol (6,49 g) Anisol werden in absolutem Dichlormethan gelöst und mittels Eisbad auf 0°C gebracht. 0,06 mol (11,08 g) 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid (1) wird zugetropft; dann wird der Ansatz noch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung gemäß der allgemeinen Vorschrift wird der zurückbleibende Feststoff aus Ether/Ethanol umkristallisiert, abgesaugt und mit kaltem Ether gewaschen.

$C_{16}H_{16}O_3$ (256,30)

cremeweisses Pulver, Schmp. 113°C

Ausbeute: 0,04 mol (10,38 g), 70 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,5$

1H -NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 8.01$ (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 7.17 (d, 2H, $J = 8.5$, ArH), 7.04 (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 6.86 (d, 2H, $J = 8.6$, ArH), 4.22 (s, 2H, CH_2CO), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.71 (s, 3H, OCH_3)

MS (EI, 50°C): m/z (%) = 256 [M]⁺ (6), 135 (100), 121 (12), 107 (8), 92 (9), 77 (15)

IR (KBr, /cm): 3417(b, w), 3035(w), 2965(m), 2841(m), 2045(w), 1676(s), 1599(s), 1512(s), 1465(m), 1443(m), 1314/1306(m), 1266(s), 1250(s), 1169(s), 1115(m), 1027(s), 992(m), 831(s), 809(m), 780(m), 742(w), 630(w)

1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)-ethan-1-on (3)

0,072 mol (9,6 g) Aluminiumchlorid und 0,06 mol (8,55 g) 3-Chloranisol werden in absolutem Dichlormethan gelöst und mittels Eisbad auf 0°C abgekühlt. 0,06 mol (11,08 g) 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid (1) wird zugetropft; dann wird der Ansatz noch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung gemäß der allgemeinen Vorschrift wird das

zurückbleibende Öl mit Petrolether/Ethylacetat 4+1 an Kieselgel säulenchromatographisch aufgetrennt, um die beiden entstandenen Isomere voneinander zu trennen. In der zweiten Hauptfraktion ist das gewünschte Isomer enthalten und kristallisiert nach Abdampfen des Lösungsmittels aus.

$C_{16}H_{15}ClO_3$ (290,74)

gelbliche Kristalle, Schmp. 71°C

Ausbeute: 0,015 mol (4,36 g), 25 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,5$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 7.52$ (d, 1H, $J = 8.7$, ArH), 7.14 (d, 2H, $J = 8.7$, ArH), 6.92 (d, 1H, $J = 2.5$, ArH), 6.84 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 6.80 (dd, 1H, $J = 2.5$, $J = 8.7$, ArH), 4.21 (s, 2H, CH_2CO), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.78 (s, 3H, OCH_3)

MS: (EI, 50°C): m/z (%) = 290 [M]⁺ (6), 169 (100), 135 (12), 121 (31), 77 (14)

IR (KBr, /cm): 3433(b, m), 3029(w), 2961(w), 2838(w), 2045(w), 1690(s), 1596(s), 1512(s), 1459(m), 1404(w), 1303(m), 1242(s), 1201(m), 1177(m), 1056(s), 1029(s), 987(m), 876(m), 816(m), 785(m)

1-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)-ethan-1-on (4)

0,072 mol (9,6 g) Aluminiumchlorid und 0,06 mol (6,86 mL) 3-Fluoranisol werden in absolutem Dichlormethan gelöst und mittels Eisbad auf 0°C abgekühlt. 0,06 mol (11,08 g) 4-Methoxyphenylethylsäurechlorid (1) wird zugetropft; dann wird der Ansatz noch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung gemäß der allgemeinen Vorschrift wird das zurückbleibende Öl einige Tage stehengelassen. Es kristallisiert ein Teil der Substanz aus. Die Mischung wird mit kaltem Ethylacetat gewaschen. Die zurückbleibenden Kristalle werden getrocknet.

$C_{16}H_{15}FO_3$ (274,29)

gelbliche Kristalle, Schmp. 70°C

Ausbeute: 0,04 mol (11,0 g), 67 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,5$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 7.89$ (t, 1H, $J = 8.8$), 7.18 (d, 2H, $J = 8.5$, ArH), 6.87 (d, 2H, $J = 8.6$, ArH), 6.75 (dd, 1H, $J = 8.9$, $J = 2.3$, ArH), 6.62 (dd, 1H, $J = 13.2$, $J = 2.3$, ArH), 4.20 (d, 2H, $J = 2.6$, CH_2CO), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 274 [M]⁺ (8), 153 (100), 121 (22), 95 (6), 77 (7)

IR (KBr, /cm): 3407(b, w), 3002(w), 2840(w), 1677(s), 1613(s), 1572(m), 1513(s), 1448(m), 1339(s), 1274(s), 1242(s), 1200(s), 1158(m), 1098(m), 1031(s), 991 (m), 951(m), 842(m), 822(m), 788(m), 627(w)

Allgemeine Vorschrift für die Friedel-Crafts-Acylierung mit Alkanoylchlorid:

Aluminiumchlorid wird in Dichlormethan gelöst, mittels Eisbad auf 0°C abgekühlt und Alkanoylchlorid zugetropft. Es wird eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird bei 0°C das entsprechende Anisolderivat in Dichlormethan zugetropft. Bei Raumtemperatur wird gerührt bis die Reaktion beendet ist (DC-Kontrolle). Es wird auf 0°C abgekühlt und Wasser hinzugegeben. Der Ansatz wird mit Dichlormethan ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft.

1-(4-Methoxyphenyl)pentan-1-on (5)

0,048 mol (6,4 g) Aluminiumchlorid wird in Dichlormethan gelöst, zuerst wird 0,039 mol (4,7 mL) Pentanoylchlorid zugetropft, dann 0,046 mol (5 mL) Anisol.

133 8 Experimenteller Teil

C₁₂H₁₆O₂ (192,25)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,035 mol (6,8 g), 91 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,7

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.95 (d, 2H, J = 8.9, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.9), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 2.92 (t, 2H, J = 7.6, COCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.71 (quint, 2H, J = 7.5, COCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.41 (sextett, 2H, J = 7.5, COCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.95 (t, 3H, J = 7.4, COCH₂CH₂CH₂CH₃)

1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)ethan-1-on (6)

0,063 mol (8,35 g) Aluminiumchlorid wird in Dichlormethan gelöst, zuerst wird 0,051 mol (3,62 mL) Acetylchlorid zugetropft, dann 0,06 mol (7,37 mL) 3-Chloranisol.

C₉H₉ClO₂ (184,62)

hellgelbes Öl

Ausbeute: 0,047 mol (8,68 g), 92 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,7

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.68 (d, 1H, J = 8.7, ArH), 6.94 (d, 1H, J = 2.5, ArH), 6.84 (dd, 1H, J = 8.7, J = 2.5, ArH), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 2.64 (s, 3H, COCH₃)

MS: (EI, 35°C): m/z (%) = 184 [M]⁺ (26), 169 (100), 126 (15), 111 (6), 77 (16)

IR (Film, /cm): 3510(b, w), 3082(m), 3006(m), 2971(m), 2841(m), 1910(b, w), 1688(b, s), 1597(b, s), 1489(s), 1397(s), 1305(s), 1250/1233(s), 1184(s), 1094(s), 1038(s), 964(s), 876(s), 817(s), 687(m)

1-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)ethan-1-on (7)

0,063 mol (8,35 g) Aluminiumchlorid wird in Dichlormethan gelöst, zuerst wird 0,051 mol (3,62 mL) Acetylchlorid zugetropft, dann 0,06 mol (6,85 mL) 3-Fluoranisol.

C₉H₉FO₂ (168,16)

farblose längliche Kristalle, Schmp. 51°C

Ausbeute: 0,047 mol (7,84 g), 92 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,7

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.88 (t, 1H, J = 8.8, ArH), 6.75 (dd, 1H, J = 8.9, J = 2.4, ArH), 6.61 (dd, 1H, J = 13.1, J = 2.4, ArH), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 2.59 (d, 3H, COCH₃)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 168 [M]⁺ (29), 153 (100), 110 (16), 95 (11), 82 (7), 77 (6)

IR (KBr, /cm): 3430(b, w), 2966(w), 2838(w), 1668(s), 1613(s), 1574(m), 1501(m), 1442(m), 1366(m), 1339(m), 1263(s), 1230(m), 1195(m), 1160(m), 1121(m), 1068(m), 1025(m), 967(w), 951(m), 845(m), 725(w)

Allgemeine Vorschrift zur α-Bromierung von 4-Methoxyphenylalkanonen:

Das entsprechende 4-Methoxyphenylalkanon wird in THF oder Ether absolut gelöst. Nachdem mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt wurde, wird Brom so langsam zugetropft, dass der Ansatz sich nach jeder Zugabe wieder entfärbt. Es wird weiter gerührt und dann das Lösungsmittel bei Raumtemperatur abgedampft. Der Rückstand wird mit 1 %iger Natriumchloridlösung versetzt und 10 Minuten gerührt. Es wird mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft.

2-Brom-(4-methoxyphenyl)ethan-1-on (8)

0,06 mol (9 g) 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1-on wird in 150 mL THF absolut gelöst. Eine Spatelspitze Aluminiumchlorid wird hinzugegeben. Nachdem mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt wurde, wird 0,06 mol (3,07 mL) Brom langsam zugetropft. Nach Aufarbeitung fallen aus dem Öl

nach Stunden bis Tagen durchsichtige bis braune Kristalle aus. Diese werden abgesaugt und mit Cyclohexan gewaschen.

$C_9H_9BrO_2$ (229,07)

farblose bis braune längliche Kristalle, Schmp. 62°C

Ausbeute: 0,031 mol (7,04 g), 51 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,7$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 7.98$ (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 6.96 (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 4.40 (s, 2H, CH_2Br), 3.89 (s, 3H, OCH_3)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 228 [M]⁺ (5), 135 (100), 121 (9), 92 (11), 77 (17), 63 (7)

IR (KBr, /cm): 3430(b, w), 2939(w), 2840(w), 1689(s), 1600(s), 1513(m), 1439(w), 1326(m), 1264(s), 1262(m), 1208(m), 1169(s), 1119(w), 1022(m), 841(m), 818(m), 747(w), 688(w), 630(w)

2-Brom-(4-methoxyphenyl)pentan-1-on (9)

0,006 mol (1,15 g) 1-(4-Methoxyphenyl)pentan-1-on (5) wird in 40 mL Ether absolut gelöst. Nachdem mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt wurde, wird 0,006 mol (0,3 mL) Brom langsam zugetropft.

$C_{12}H_{15}BrO_2$ (271,15)

grauer Feststoff, Schmp. 38°C

Ausbeute: 4,8 mmol (1,3 g), 80 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,7$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 8.01$ (d, 2H, $J = 9.0$, ArH), 6.96 (d, 2H, $J = 9.0$, ArH), 5.12 (t, 1H, $J = 7.2$, $COCH_2CH_2CH_3$), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 2.14 (m, 2H, $COCH_2CH_2CH_3$), 1.44 (m, 2H, $COCH_2CH_2CH_3$), 0.98 (t, 1H, $J = 7.4$, $COCH_2CH_2CH_3$)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 270 [M]⁺ (1), 230 (2), 191 (5), 135 (100), 107 (8), 92 (12), 77 (16)

IR (KBr, /cm): 3318(b, w), 2934(s), 2871(m), 1668(s), 1604(s), 1572(m), 1510(m), 1459(m), 1421(m), 1376(m), 1347(m), 1259(b, s), 1212(m), 1181(s), 1114(m), 1024(s), 971(m), 849(m), 817(m), 769(w), 695(w)

2-Brom-(2-chlor-4-methoxyphenyl)ethan-1-on (10)

0,03 mol (5,54 g) 1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)ethan-1-on (6) wird in 75 mL THF absolut gelöst. Eine Spatelspitze Aluminiumchlorid wird hinzugegeben. Nachdem mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt wurde, wird 0,03 mol (1,54 mL) Brom langsam zugetropft. Nach Aufarbeitung fallen aus dem Öl nach Stunden bis Tagen durchsichtige bis braune Kristalle aus. Diese werden abgesaugt und mit Cyclohexan gewaschen.

$C_9H_8BrClO_2$ (263,52)

farblose bis braune längliche Kristalle, Schmp. 56°C

Ausbeute: 0,01 mol (2,63 g), 33 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,7$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 7.70$ (d, 1H, $J = 8.8$, ArH), 6.96 (d, 1H, $J = 2.5$, ArH), 6.88 (dd, 1H, $J = 2.5$, $J = 8.8$, ArH), 4.55 (s, 2H, CH_2Br), 3.87 (s, 3H, OCH_3)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 262 [M]⁺ (4), 169 (100), 141 (1), 126 (10), 98 (3), 77 (11), 63 (16)

IR (KBr, /cm): 3368(b, w), 3076(m), 3004(m), 2947(m), 2842(w), 1909(w), 1764(w), 1693(s), 1597(s), 1559(s), 1484(m), 1461(m), 1399(m), 1296(s), 1239(s), 1194(s), 1053(s), 1034(s), 978(m), 885(s), 811(s), 754(w), 675(w)

2-Brom-(2-fluor-4-methoxyphenyl)ethan-1-on (11)

0,048 mol (8,4 g) 1-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)ethan-1-on (7) wird in 120 mL THF absolut gelöst. Eine Spatelspitze Aluminiumchlorid wird hinzugegeben. Nachdem mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt wurde, wird 0,048 mol (2,44 mL) Brom langsam zugetropft. Nach Aufarbeitung fallen aus

135 8 Experimenteller Teil

dem Öl nach Stunden bis Tagen durchsichtige Kristalle aus. Diese werden abgesaugt und mit Cyclohexan gewaschen.

$C_9H_8BrFO_2$ (247,06)

farblose längliche Kristalle, Schmp. 66°C

Ausbeute: 0,018 mol (4,4 g), 37 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,7$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 7.95$ (t, 1H, $J = 8.8$, ArH), 6.80 (dd, 1H, $J = 2.4$, $J = 8.9$, ArH), 6.65 (dd, 1H, $J = 2.4$, $J = 13.3$ ArH), 4.48 (d, 2H, $J = 2.6$, CH_2Br), 3.88 (s, 3H, OCH_3)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 246 [M]⁺ (5), 153 (100), 139 (9), 110 (11), 95 (9), 82 (7)

IR (KBr, /cm): 3403(b, w), 3091(w), 2950(w), 1936(w), 1688(s), 1610(s), 1570(m), 1440(m), 1382(m), 1289(s), 1229(s), 1191(m), 1158(m), 1115(s), 1030(w), 991(w), 855(m), 832(m), 730(w), 684(w), 639(w)

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der 1,4-Diketone:

Das entsprechende Bis-4-methoxyphenylethanonderivat wird in absolutem THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C abgekühlt. Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,5 molar in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird das entsprechende α -Bromketon in THF gelöst zugetropft. Es wird eine weitere Stunde bei -78°C gerührt und der Ansatz über Nacht auf Raumtemperatur kommen gelassen. Die Reaktion wird mit Wasser gestoppt und mit Ethylacetat weiter verdünnt. Nacheinander wird mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, dann wird die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Die Aufarbeitung erfolgt über Säulenchromatographie beginnend mit Petrolether/Ethylacetat 4+1; Gradient bis 1+1, an Kieselgel.

1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (12)

0,024 mol (6,09 g) 1,2-Bis-(4-methoxyphenyl)ethanon (**2**) wird in 200 mL THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C abgekühlt. 52 mL Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,026 mol in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird 0,026 mol (6 g) 2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)-ethanon (**8**) in THF gelöst zugetropft. Es wird gemäß der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet und an Kieselgel chromatographiert.

$C_{25}H_{24}O_5$ (404,46)

hellbeiges Pulver, Schmp. 134°C

Ausbeute: 0,020 mol (7,99 g), 82 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,2$

MS (EI, 210°C): m/z (%) = 404 [M]⁺ (12), 386 (1), 371 (1), 269 (3), 135 (100), 107 (4), 92 (4), 77 (7)

IR (KBr, /cm): 3419(b, w), 2932(w), 2836(w), 2047(w), 1667(s), 1600(s), 1511(s), 1459(m), 1419(m), 1320(m), 1304(m), 1249(b, s), 1167(s), 1112(w), 1029(m), 994(m), 954(w), 848(m), 791(w), 666(w)

1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2,4-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (13)

0,007 mol (2 g) 1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)ethan-1-on (**3**) wird in 57 mL THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C abgekühlt. 15 mL Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,008 mol in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird 0,007 mol (1,58 g) 2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)ethan-1-on (**8**) THF gelöst zugetropft. Es wird gemäß der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet und an Kieselgel chromatographiert.

$C_{25}H_{23}ClO_5$ (438,9)

oranges Pulver, Schmp. 50°C

Ausbeute: 0,003 mol (1,47 g), 49 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,2$

MS (EI, 125°C): m/z (%) = 438 $[M]^+$ (5), 169 (30), 152 (7), 135 (100), 77 (19)

IR (KBr, /cm): 3418(b, s), 2938(w), 2360(m), 2331(m), 1672(m), 1601(s), 1511(m), 1459(w), 1303(m), 1252(s), 1172(m), 1029(m), 832(m)

1-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-2,4-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (14)

0,012 mol (3,37 g) 1-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)ethan-1-on (**4**) wird in 95 mL THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C abgekühlt. 25 mL Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,013 mol in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird 0,013 mol (2,82 g) 2-Brom-(4-methoxyphenyl)ethan-1-on (**8**) in THF gelöst zugetropft. Es wird gemäß der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet und an Kieselgel chromatographiert.

$C_{25}H_{23}FO_5$ (422,45)

gelbes Pulver, Schmp. 115°C

Ausbeute: 0,005 mol (2,11 g), 41 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,2$

MS (EI, 125°C): m/z (%) = 422 $[M]^+$ (12), 404 (1), 287 (3), 153 (51), 135 (100)

IR (KBr, /cm): 3433(b, m), 2934(m), 2360(w), 2333(w), 1670(s), 1608(s), 1510(s), 1460(m), 1338(m), 1252(s), 1172(s), 1118(m), 1031(s), 961(m), 837(s)

4-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-1,2-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (15)

0,007 mol (1,8 g) 1,2-Bis-(4-methoxyphenyl)ethanon (**2**) wird in 58 mL THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C abgekühlt. 15 mL Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,008 mol in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird 0,007 mol (2 g) 2-Brom-1-(2-chlor-4-methoxyphenyl)ethanon (**10**) THF gelöst zugetropft. Es wird gemäß der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet und an Kieselgel chromatographiert.

$C_{25}H_{23}ClO_5$ (438,9)

gelbes Pulver, Schmp. 111°C

Ausbeute: 0,0056 mol (2,46 g), 80 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,2$

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 438 $[M]^+$ (8), 269 (3), 169 (38), 135 (100), 77 (14)

IR (KBr, /cm): 3432(b, m), 2938(w), 2359(w), 2331(w), 1673(m), 1599(s), 1510(m), 1459(w), 1303(m), 1249(s), 1173(m), 1029(m), 835(m)

4-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-1,2-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (16)

0,011 mol (2,77 g) 1,2-Bis-(4-methoxyphenyl)ethanon (**2**) wird in 83 mL THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C abgekühlt. 22 mL Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,011 mol in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird 0,011 mol (2,67 g) 2-Brom-1-(2-fluor-4-methoxyphenyl)ethan-1-on (**11**) in THF gelöst zugetropft. Es wird gemäß der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet und an Kieselgel chromatographiert.

$C_{25}H_{23}FO_5$ (422,45)

gelbes Pulver, Schmp. 99°C

Ausbeute: 0,006 mol (2,5 g), 55 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,2$

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 422 $[M]^+$ (14), 404 (16), 389 (4), 153 (64), 135 (100)

IR (KBr, /cm): 3432(b, m), 2934(w), 2357(m), 2331(m), 1673(s), 1610(s), 1511(m), 1461(m), 1334(m), 1244(s), 1168(m), 1118(m), 1030(m), 948(w), 839(m)

1,4-Bis(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (17)

0,023 mol (6,24 g) 1-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)ethan-1-on (**4**) wird in 150 mL THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C abgekühlt. 49 mL Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,025 mol in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird 0,025 mol (6,09 g) 2-Brom-1-(2-fluor-4-methoxyphenyl)ethan-1-on (**11**) in THF gelöst zugetropft. Es wird gemäß der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet und an Kieselgel chromatographiert.

$\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{O}_5$ (440,44)

gelbes Pulver, Schmp. 116°C

Ausbeute: 0,016 mol (7,23 g), 73 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f=0,2$

MS (EI, 40°C): m/z (%) = 440 $[\text{M}]^+$ (7), 287 (3), 153 (100), 77 (19)

IR (Film, /cm): 3014(m), 2938(m), 2840(m), 2617(w), 2057 (w), 1673(s), 1612(s), 1574(s), 1511(s), 1442(s), 1340(s), 1238(s), 1158(s), 1119(s), 1102(s), 1033(s), 955(m), 838 (s), 757(s), 667(m)

1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-propylbutan-1,4-dion (**18**)

0,017 mol (4,3 g) 1,2-Bis-(4-methoxyphenyl)ethanon (**2**) wird in 130 mL THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C abgekühlt. 34 mL Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,017 mol in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird 0,017 mol (4,55 g) 2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)pentan-1-on (**9**) in THF gelöst zugetropft. Es wird gemäß der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet und an Kieselgel chromatographiert.

$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (446,53)

braungelbes Pulver, Schmp. 100°C

Ausbeute: 0,009 mol (4,1 g), 55 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f=0,2$

MS (EI, 125°C): m/z (%) = 446 $[\text{M}]^+$ (4), 311 (2), 256 (2), 135 (100), 107 (5), 92 (6)

IR (KBr, /cm): 3430(b, w), 2957(w), 2933(w), 2838(w), 1665(s), 1599(s), 1510(s), 1463(w), 1419(w), 1305(m), 1258(s), 1168(s), 1113(w), 1030(m), 993(m), 834(w), 792(w), 666(w), 632(w)

Allgemeine Vorschrift zur Cyclisierung zu 2,3,5-Triarylpyrrolen:

Das entsprechende 1,2,4-Trisaryl-1,4-dion und das entsprechende primäre Amin werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure 24 Stunden bis sieben Tage gekocht. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand mit Petrolether/Ethylacetat 4+1 an Kieselgel chromatographiert.

2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1*H*-pyrrol (**19**)

1 mmol (0,404 g) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**12**) und 4,4 mL einer 8 molaren Methylaminlösung (0,035 mol in Ethanol) werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure 24 Stunden zum Sieden erhitzt.

$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ (399,48)

gelber Feststoff, Schmp. 120°C

Ausbeute: 0,5 mmol (200 mg), 50 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f=0,5$

¹H-NMR: $[\text{CDCl}_3]$ δ = 7.43 (d, 2H, $J = 8.7$, ArH), 7.28 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 7.15 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 6.98 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 6.93 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 6.74 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 6.37 (s, 1H, CH), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.76(s, 3H, OCH₃), 3.43 (s, 3H, NCH₃),

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 399 $[\text{M}]^+$ (100), 384 (24), 370 (8), 199 (11),

IR (KBr, /cm): 3430(b, w), 2934(w), 2834(w), 1893(w), 1612(w), 1561(w), 1518(m), 1499(s), 1463(m), 1287(m), 1246(s), 1176(m), 1030(m), 836(m), 807(w), 651(w)

CHN: berechnet: x0,75 H₂O: C: 75,62; H: 6,47; N: 3,40; gefunden: C: 75,68; H: 6,63; N: 3,64

2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-ethyl-1H-pyrrol (20)

1 mmol (0,404 g) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**12**) und 17,5 mL einer 2 molaren Ethylaminlösung (0,035 mol in Methanol) werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure zwei Tage zum Sieden erhitzt.

C₂₇H₂₇NO₃ (413,51)

gelber Feststoff, Schmp. 145°C

Ausbeute: 0,36 mmol (147 mg), 36 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.42 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 7.29 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.12 (d, 2H, J = 8.9, ArH), 6.97 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.94 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.72 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.35 (s, 1H, CH), 3.89 (q, 2H, J = 7.4, NCH₂CH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 0.87 (t, 3H, J = 7.1, NCH₂CH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 413 [M]⁺ (100), 398 (13), 384 (16), 206 (12)

IR (KBr, /cm): 3405(b, w), 2934(w), 2836(w), 1893(w), 1611(m), 1562(m), 1519(s), 1500(s), 1460(m), 1289(m), 1242(s), 1179(m), 1029(s), 833(m), 800(m), 653(w)

CHN: berechnet: x0,25 H₂O: C: 77,58; H: 6,63; N: 3,35; gefunden: C: 77,41; H: 6,53; N: 2,96

2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (21)

1 mmol (0,404 g) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**12**) und 0,035 mol (3,0 mL) Propylamin werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure fünf Tage zum Sieden erhitzt.

C₂₈H₂₉NO₃ (427,53)

gelber Feststoff, Schmp. 105°C

Ausbeute: 0,3 mmol (130 mg), 30 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.41 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.28 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.11 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.97 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.72 (d, 2H, J = 8.9, ArH), 6.33 (s, 1H, CH), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.80 ("t", 2H, J = 7.6, NCH₂CH₂CH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 1.29 (m, 2H, J = 7.6, NCH₂CH₂CH₃), 0.50 (t, 3H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 427 [M]⁺ (100), 412 (6), 398 (11), 384 (6), 213 (9)

IR (KBr, /cm): 3430(b, w), 2934(w), 2834(w), 1891(w), 1611(m), 1560(w), 1518(m), 1500(s), 1464(m), 1288(m), 1248(s), 1178(m), 1031(s), 838(m), 790(w), 653(w)

CHN: berechnet: C: 78,66; H: 6,84; N: 3,28; gefunden: C: 78,77; H: 6,88; N: 3,08

2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-isobutyl-1H-pyrrol (22)

2 mmol (0,808 g) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**12**) und 0,07 mol (7,0 mL) Isobutylamin werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure sieben Tage zum Sieden erhitzt.

C₂₉H₃₁NO₃ (441,56)

gelber Feststoff, Schmp. 108°C

Ausbeute: 0,34 mmol (147 mg), 17 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.40 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.23 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.12 (d, 2H, J = 8.9, ArH), 6.96 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.92 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.73 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.32 (s, 1H, CH), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (d, 2H, J = 7.6, NCH₂CH(CH₃)₂), 1.42 (m, 1H, NCH₂CH(CH₃)₂), 0.42 (d, 6H, J = 6.7, NCH₂CH(CH₃)₂)

MS (EI, 135°C): m/z (%) = 441 [M]⁺ (100), 426 (2), 398 (15), 220 (7), 135 (7)

139 8 Experimenteller Teil

IR (KBr, /cm): 3430(b, w), 2934(w), 2833(w), 1886(w), 1611(w), 1561(w), 1517(m), 1499(s), 1465(m), 1288(m), 1246(s), 1175(m), 1034(m), 836(m), 805(m), 656(w)

CHN: berechnet: x0,8 H₂O: C: 76,39; H: 7,18; N: 3,06; gefunden: C: 76,15; H: 7,11; N: 2,76

2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-isopentyl-1H-pyrrol (23)

1 mmol (0,404 g) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**12**) und 0,035 mol (4,1 mL) Isopentylamin werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure vier Tage zum Sieden erhitzt.

C₃₀H₃₃NO₃ (455,59)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,4 mmol (182 mg), 40 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.41 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 7.28 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 7.12 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.97 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.72 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.33 (s, 1H, CH), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.84 ("t", 2H, NCH₂CH₂CH(CH₃)₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 1.14 (m, 3H, NCH₂CH₂CH(CH₃)₂), 0.53 (d, 6H, J = 6.0, NCH₂CH₂CH(CH₃)₂)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 455 [M]⁺ (100), 398 (53), 227 (4), 152 (3), 135 (54)

IR (KBr, /cm): 3433(b, s), 2955(m), 2834(w), 1889(w), 1611(m), 1576(m), 1515(m), 1500(m), 1462(m), 1287(m), 1246(s), 1174(m), 1032(m), 834(m), 795(m), 649(w)

CHN: berechnet: C: 79,09; H: 7,30; N: 3,07; gefunden: C: 79,38; H: 7,35; N: 3,04

2-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (24)

1,1 mmol (0,500 g) 1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2,4-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**13**) und 5 mL einer 8 molaren Methylaminlösung (0,04 mol in Ethanol) werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure 24 Stunden zum Sieden erhitzt.

C₂₆H₂₄ClNO₃ (433,93)

gelber Feststoff, Schmp. 103°C

Ausbeute: 0,28 mmol (118 mg), 25 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.43 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 7.21 (d, 1H, J = 8.5, ArH), 7.11 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.08 (d, 1H, J = 2.6, ArH), 6.97 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.82 (dd, 1H, J = 8.5, J = 2.6, ArH), 6.74 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.41 (s, 1H, CH), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.35 (s, 3H, NCH₃)

MS (EI, 130°C): m/z (%) = 433 [M]⁺ (30), 418 (5), 404 (5), 216 (4), 169 (25), 135 (100)

IR (KBr, /cm): 3435(b, s), 2928(w), 1889(w), 1609(m), 1577(w), 1513(m), 1463(m), 1341(w), 1287(m), 1247(m), 1176(m), 1035(m), 834(m), 801(m)

CHN: berechnet: C: 71,97; H: 5,57; N: 3,23; gefunden: C: 71,62; H: 5,65; N: 3,16

2-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (25)

1,7 mmol (0,72 g) 1-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-2,4-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**14**) und 7,5 mL einer 8 molaren Methylaminlösung (0,06 mol in Ethanol) werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure 24 Stunden zum Sieden erhitzt.

C₂₆H₂₄FNO₃ (417,47)

gelber Feststoff, Schmp. 57°C

Ausbeute: 0,94 mmol (393 mg), 55 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.43 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 7.15 (m, 3H, ArH), 6.97 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.72 (m, 4H, ArH), 6.39 (s, 1H, CH), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.40 (s, 3H, NCH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 417 [M]⁺ (100), 402 (23), 388 (13), 208 (14), 135 (3)

IR (KBr, /cm): 3428(b, m), 2935(w), 2834(w), 1887(w), 1625(m), 1578(m), 1518(m), 1498(s), 1464(m), 1288(m), 1246(s), 1177(m), 1108(m), 1024(m), 834(m), 801(m)

CHN: berechnet: C: 74,80; H: 5,79; N: 3,36; gefunden: C: 74,57; H: 5,97; N: 3,33

5-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2,3-bis-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (26)

1 mmol (0,439 g) 4-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-1,2-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**15**) und 4,4 mL einer 8 molaren Methylaminlösung (0,035 mol in Ethanol) werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure 24 Stunden zum Sieden erhitzt.

C₂₆H₂₄ClNO₃ (433,93)

gelber Feststoff, Schmp. 91°C

Ausbeute: 0,6 mmol (265 mg), 61 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.38 (d, 1H, J = 8.5, ArH), 7.28 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.15 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.05 (d, 1H, J = 2.6, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.88 (dd, 1H, J = 8.5, J = 2.6, ArH), 6.74 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.34 (s, 1H, CH), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.26 (s, 3H, NCH₃)

MS (EI, 90°C): m/z (%) = 433 [M]⁺ (100), 418 (21), 404 (14), 216 (9), 135 (10)

IR (KBr, /cm): 3431(b, w), 2934(w), 2834(w), 1897(w), 1609(m), 1565(w), 1517(m), 1491(m), 1463(m), 1287(m), 1246(s), 1177(m), 1035(m), 834(m), 651(w)

CHN: berechnet: C: 71,97; H: 5,57; N: 3,23; gefunden: C: 71,70; H: 5,88; N: 3,15

5-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-2,3-bis-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (27)

2 mmol (0,856 g) 4-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-1,2-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**16**) und 9 mL einer 8 molaren Methylaminlösung (0,071 mol in Ethanol) werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure 24 Stunden zum Sieden erhitzt.

C₂₆H₂₄FNO₃ (417,47)

gelber Feststoff, Schmp. 128°C

Ausbeute: 1,32 mmol (551 mg), 66 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.36 (t, 1H, J = 8.6, ArH), 7.28 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.14 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.75 (m, 4H, ArH), 6.38 (s, 1H, CH), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.34 (s, 3H, NCH₃)

MS (EI, 120°C): m/z (%) = 417 [M]⁺ (100), 402 (21), 388 (13), 208 (9), 135 (44)

IR (KBr, /cm): 3434(b, w), 2959(w), 2836(w), 1897(w), 1624(m), 1560(m), 1516(m), 1496(s), 1468(m), 1290(s), 1246(s), 1179(m), 1155(m), 1122(m), 1027(m), 837(m)

CHN: berechnet: C: 74,80; H: 5,79; N: 3,36; gefunden: C: 74,64; H: 5,95; N: 3,22

2-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (28)

2,2 mmol (0,97 g) 1-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2,4-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**13**) und 0,077 mol (6,5 mL) Propylamin werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure fünf Tage zum Sieden erhitzt.

C₂₈H₂₈ClNO₃ (461,98)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,13 mmol (60 mg), 6 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.41 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.25 (d, 1H, J = 8.4, ArH), 7.09 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.06 (d, 1H, J = 2.6, ArH), 6.97 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.84 (dd, 1H, J = 8.5, J = 2.6 ArH), 6.73

141 8 Experimenteller Teil

(d, 2H, $J = 8.8$, *ArH*), 6.37 (s, 1H, *CH*), 3.86 (s, 6H, *OCH*₃), 3.75 (s, 3H, *OCH*₃), 3.59 (m, 2H, *NCH*₂*CH*₂*CH*₃), 1.28 (m, 2H, *NCH*₂*CH*₂*CH*₃), 0.53 (t, 3H, *NCH*₂*CH*₂*CH*₃)

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 461 [*M*]⁺ (100), 430 (10), 412 (6), 376 (5), 230 (8)

IR (KBr, /cm): 3431(b, m), 2957(w), 2834(w), 2361(w), 1610(m), 1565(m), 1513(m), 1462(m), 1341(w), 1287(m), 1244(s), 1176(m), 1031(m), 834(m), 794(m)

CHN: berechnet: C: 72,80; H: 6,11; N: 3,03; gefunden: C: 73,15; H: 6,35; N: 3,10

2-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1*H*-pyrrol (29)

3,3 mmol (1,4 g) 1-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-2,4-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**14**) und 0,12 mol (9,8 mL) Propylamin werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure vier Tage zum Sieden erhitzt.

*C*₂₈*H*₂₈*FNO*₃ (445,53)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,46 mmol (205 mg), 14 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,5$

¹H-NMR: [*CDCl*₃] $\delta = 7.41$ (d, 2H, $J = 8.8$, *ArH*), 7.18 (t, 1H, $J = 8.4$, *ArH*), 7.12 (d, 2H, $J = 8.9$, *ArH*), 6.96 (d, 2H, $J = 8.8$, *ArH*), 6.73 (m, 4H, *ArH*), 6.36 (s, 1H, *CH*), 3.86 (s, 3H, *OCH*₃), 3.85 (s, 3H, *OCH*₃), 3.75 (s, 3H, *OCH*₃), 3.70 (m halb unter s von *OCH*₃, 2H, *NCH*₂*CH*₂*CH*₃), 1.29 (m, 2H, *NCH*₂*CH*₂*CH*₃), 0.52 (t, 3H, $J = 7.4$, *NCH*₂*CH*₂*CH*₃)

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 445 [*M*]⁺ (100), 416 (10), 388 (9), 222 (9), 135 (12)

IR (KBr, /cm): 3431(b, m), 2955(w), 2360(w), 1887(w), 1626(m), 1572(w), 1517(w), 1502(w), 1460(w), 1287(w), 1244(m), 1170(w), 1029(m), 834(m)

CHN: berechnet: C: 75,48; H: 6,33; N: 3,14; gefunden: C: 75,57; H: 6,68; N: 3,15

5-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2,3-bis-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1*H*-pyrrol (30)

2 mmol (0,878 g) 4-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-1,2-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**15**) und 0,07 mol (5,9 mL) Propylamin werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure drei Tage zum Sieden erhitzt.

*C*₂₈*H*₂₈*ClNO*₃ (461,98)

gelber Feststoff, Schmp. 87°C

Ausbeute: 1,3 mmol (618 mg), 67 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,5$

¹H-NMR: [*CDCl*₃] $\delta = 7.37$ (d, 1H, $J = 8.5$, *ArH*), 7.27 (d, 2H, $J = 8.8$, *ArH*), 7.12 (d, 2H, $J = 8.8$, *ArH*), 7.04 (d, 1H, $J = 2.6$, *ArH*), 6.93 (d, 2H, $J = 8.4$, *ArH*), 6.87 (dd, 1H, $J = 8.5$, $J = 2.6$, *ArH*), 6.72 (d, 2H, $J = 8.8$, *ArH*), 6.32 (s, 1H, *CH*), 3.86 (s, 3H, *OCH*₃), 3.75 (s, 3H, *OCH*₃), 3.63 ("t", 2H, *NCH*₂*CH*₂*CH*₃), 1.20 (sextett, 2H, $J = 7.5$, *NCH*₂*CH*₂*CH*₃), 0.48 (t, 3H, *NCH*₂*CH*₂*CH*₃)

MS (EI, 125°C): m/z (%) = 461 [*M*]⁺ (100), 446 (5), 433 (8), 230 (8), 135 (12)

IR (KBr, /cm): 3420(b, m), 2958(m), 2824(m), 2360(w), 1609(m), 1564(m), 1517(m), 1491(s), 1462(m), 1287(m), 1244(s), 1176(m), 1032(m), 834(s), 795(m), 650(w)

CHN: berechnet: C: 72,80; H: 6,11; N: 3,03; gefunden: C: 72,78; H: 6,36; N: 3,03

5-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-2,3-bis-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1*H*-pyrrol (31)

3,9 mmol (1,6 g) 4-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-1,2-bis-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**16**) und 0,34 mol (11,6 mL) Propylamin werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure drei Tage zum Sieden erhitzt.

*C*₂₈*H*₂₈*FNO*₃ (445,53)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,5 mmol (221 mg), 13 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,5$

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.34 (t, 1H, J = 8.5, ArH), 7.27 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.11 (d, 2H, J = 8.9, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.76 (m, 2H, ArH), 6.72 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.35 (s, 1H, CH), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.70 ("t", 2H, J = 7.6, NCH₂CH₂CH₃), 1.21 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 0.49 (t, 3H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 445 [M]⁺ (100), 416 (2), 388 (3), 323 (1), 222 (9)

IR (KBr, /cm): 3370(b, s), 2956(w), 2834(w), 1888(w), 1626(m), 1579(m), 1517(m), 1498(m), 1463(m), 1287(m), 1246(s), 1177(m), 1153(m), 1102(m), 1029(m), 950(w), 940(w), 835(s), 795(m)

CHN: berechnet: C: 75,48; H: 6,33; N: 3,14; gefunden: C: 75,79; H: 6,37; N: 3,20

2,5-Bis-(2-fluor-4-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (32)

5,5 mmol (2,4 g) 1,4-Bis-(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**17**) und 24 mL einer 8 molaren Methylaminlösung (0,19 mol in Ethanol) werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure zwei Tage zum Sieden erhitzt.

C₂₆H₂₃F₂NO₃ (435,46)

gelber Feststoff, Schmp. 54°C

Ausbeute: 0,83 mmol (360 mg), 15 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.37 (t, 1H, J = 8.6, ArH), 7.16 (m, 3H, ArH), 6.74 (m, 6H, ArH), 6.41 (s, 1H, CH), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.32 (s, NCH₃)

MS (EI, 125°C): m/z (%) = 435 [M]⁺ (100), 420 (32), 405 (15), 217 (9)

IR (KBr, /cm): 3434(b, s), 2954(w), 1626(s), 1577(m), 1517(m), 1496(s), 1464(m), 1314(m), 1288(s), 1245(s), 1156(s), 1121(m), 1035(m), 836(m)

CHN: berechnet: C: 71,71; H: 5,32; N: 3,22; gefunden: C: 71,66; H: 5,67; N: 3,16

2,5-Bis-(2-fluor-4-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (33)

11 mmol (4,9 g) 1,4-Bis-(2-fluor-4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)butan-1,4-dion (**17**) und 0,39 mol (32,6 mL) Propylamin werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure drei Tage zum Sieden erhitzt.

C₂₈H₂₇F₂NO₃ (463,52)

gelber Feststoff, Schmp. 50°C

Ausbeute: 0,88 mmol (408 mg), 8 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.34 (t, 1H, J = 8.6, ArH), 7.19 (t, 1H, J = 8.3, ArH), 7.12 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.75 (m, 6H, ArH), 6.38 (s, 1H, CH), 3.85 (s, 6H, OCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.31 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 0.51 (t, 3H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 463 [M]⁺ (100), 433 (13), 406 (11), 231 (9), 192 (6)

IR (KBr, /cm): 3435(b, s), 2963(m), 1627(s), 1576(s), 1517(s), 1496(s), 1465(m), 1314(m), 1287(s), 1244(s), 1189(m), 1156(s), 1122(m), 1030(m), 837(m)

CHN: berechnet: C: 72,55; H: 5,87; N: 3,02; gefunden: C: 72,53; H: 5,89; N: 3,05

2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-4-propyl-1H-pyrrol (34)

2,5 mmol (1,1 g) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-propylbutan-1,4-dion (**18**) und 11 mL einer 8 molaren Methylaminlösung (0,086 mol in Ethanol) werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure fünf Tage zum Sieden erhitzt.

C₂₉H₃₁NO₃ (441,56)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,38 mmol (167 mg), 15 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

143 8 Experimenteller Teil

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.36 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.15 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.09 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.99 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.81 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.78 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.32 (s, 3H, NCH₃), 2.43 ("t", 2H, J = 7.6, CH₂CH₂CH₃), 1.20 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0.65 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 125°C): m/z (%) = 441 [M]⁺ (100), 412 (53), 385 (17), 220 (14), 135 (38)

IR (KBr, /cm): 3434(b, m), 2955(w), 1889(w), 1612(m), 1576(m), 1517(m), 1504(m), 1462(m), 1362(w), 1267(m), 1246(s), 1174(m), 1105(m), 1029(s), 825(s), 807(s)

CHN: berechnet: C: 78,88; H: 7,08; N: 3,17; gefunden: C: 78,52; H: 7,32; N: 2,85

2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-ethyl-4-propyl-1H-pyrrol (35)

3,4 mmol (1,5 g) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-propylbutan-1,4-dion (**18**) und 60 mL einer 2 molaren Ethylaminlösung (0,12 mol in Methanol) werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure sechs Tage zum Sieden erhitzt.

C₃₀H₃₃NO₃ (455,59)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,22 mmol (102 mg), 7 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [(D₆)DMSO] δ = 7.21 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 7.02 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.91 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.88 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.75 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.64 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.61 (s, 3H, OCH₃), 3.58 (m, 5H, NCH₂CH₃ und OCH₃), 2.16 ("t", 2H, J = 8.0, CH₂CH₂CH₃), 0.96 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0.57 (t, 3H, J = 7.1, NCH₂CH₃), 0.43 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 455 [M]⁺ (100), 426 (53), 398 (22), 380 (4), 227 (16)

IR (KBr, /cm): 3431(b, m), 2955(w), 1890(w), 1622(m), 1514(w), 1461(w), 1342(w), 1286(w), 1245(m), 1176(w), 1031(w), 834(w)

CHN: berechnet: x0,67 H₂O: C: 77,06; H: 7,34; N: 3,00; gefunden: C: 77,00; H: 7,57; N: 2,97

2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1,4-dipropyl-1H-pyrrol (36)

4,7 mmol (2,1 g) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-propylbutan-1,4-dion (**18**) und 0,16 mol (13,5 mL) Propylamin werden in absolutem Ethanol mit einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure sieben Tage zum Sieden erhitzt.

C₃₁H₃₅NO₃ (469,61)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,24 mmol (110 mg), 5 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.33 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 7.14 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.07 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.97 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.81 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.75 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.68 ("t", 2H, J = 7.6, NCH₂CH₂CH₃), 2.38 ("t", 2H, J = 8.0, CH₂CH₂CH₃), 1.20 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃ und NCH₂CH₂CH₃), 0.63 (t, 3H, J = 7.3, NCH₂CH₂CH₃), 0.46 (t, 3H, J = 7.4, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 469 [M]⁺ (100), 440 (42), 412 (21), 234 (14), 135 (16)

IR (KBr, /cm): 3429(b, s), 2961(m), 2836(w), 1890(w), 1616(m), 1517(m), 1462(m), 1343(w), 1260(s), 1176(m), 1100(s), 1027(s), 804(s)

CHN: berechnet: x1 H₂O: C: 76,36; H: 7,64; N: 2,87; gefunden: C: 76,16; H: 7,71; N: 2,52

Allgemeine Vorschrift zur Entschützung der 2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-pyrrole mit Bortribromid:

Das entsprechende 2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-pyrrol wird unter Schutzbegasung in 15 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Mittels Eisbad wird der Ansatz auf 0°C gekühlt und langsam Bortribromid gelöst in 5 mL absolutem Dichlormethan zugetropft. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt und am nächsten Tag auf Eis gegossen und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das

Lösungsmittel bei Raumtemperatur abgedampft. Die Aufreinigung erfolgt über Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 9+1.

2,3,5-Tris-(4-hydroxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (37)

0,45 mmol (180 mg) 2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (**19**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,3 mmol (564 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

$C_{23}H_{19}NO_3$ (357,4)

gelber Feststoff, Schmp. 136°C

Ausbeute: 0,3 mmol (109 mg), 68 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 9.55$ (s, 1H, OH), 9.51 (s, 1H, OH), 9.10 (s, 1H, OH), 7.30 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 7.10 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.83 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.79 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.56 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.20 (s, 1H, CH), 3.3 (s, 3H, NCH₃)

MS (EI, 30°C): m/z (%) = 357 [M]⁺ (100), 327 (4), 280 (4), 178 (7), 121 (5)

IR (KBr, /cm): 3389(b, s), 3043(w), 1892(w), 1702(w), 1567(m), 1519(s), 1500(s), 1377(m), 1235(b, s), 1144(w), 1102(m), 836(m)

CHN: berechnet: x1,1 EtOAc: C: 71,6; H: 6,01; N: 3,08; gefunden: C: 71,66; H: 6,27; N: 3,20

2,3,5-Tris-(4-hydroxyphenyl)-1-ethyl-1H-pyrrol (38)

0,61 mmol (250 mg) 2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-ethyl-1H-pyrrol (**20**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 3,0 mmol (757 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

$C_{24}H_{21}NO_3$ (371,15)

gelboranger Feststoff, Schmp. 127°C

Ausbeute: 0,45 mmol (166 mg), 74 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 9.58$ (s, 1H, OH), 9.53 (s, 1H, OH), 9.08 (s, 1H, OH), 7.27 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 7.11 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.91 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.82 (m, 4H, ArH), 6.54 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.17 (s, 1H, CH), 3.77 (q, 2H, J = 6.8, NCH₂CH₃), 0.77 (t, 3H, J = 7.0, NCH₂CH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 371 [M]⁺ (100), 343 (12), 316 (7), 185 (7), 121 (2)

IR (KBr, /cm): 3392(b, s), 2976(w), 1891(w), 1702(w), 1613(m), 1567(m), 1519(m), 1500(s), 1341(m), 1229(b, m), 1171(m), 1118(w), 836(m)

CHN: berechnet: x 0,5 EtOAc: C: 75,16; H: 6,06; N: 3,37; gefunden: C: 75,16; H: 6,21; N: 3,66

2,3,5-Tris-(4-hydroxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (39)

0,5 mmol (220 mg) 2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (**21**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,6 mmol (645 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

$C_{25}H_{23}NO_3$ (385,46)

oranger Feststoff, Schmp. 119°C

Ausbeute: 0,28 mmol (111 mg), 58 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 9.56$ (s, 1H, OH), 9.51 (s, 1H, OH), 9.08 (s, 1H, OH), 7.26 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 7.09 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.91 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.81 (m, 4H, ArH), 6.54 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.16 (s, 1H, CH), 3.71 ("t", 2H, J = 7.6, NCH₂CH₂CH₃), 1.15 (m, 2H, J = 7.5, NCH₂CH₂CH₃), 0.43 (t, 3H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 385 [M]⁺ (43), 356 (6), 342 (6), 330 (3), 121 (14), 43 (100)

145 8 Experimenteller Teil

IR (KBr, /cm): 3399(b, s), 2962(w), 1892(w), 1702(w), 1613(m), 1567(m), 1519(s), 1500(s), 1343(m), 1232(b, s), 1171(m), 1100(w), 836(m)

CHN: berechnet: x0,4 EtOAc: C: 75,94; H: 6,28; N: 3,33; gefunden: C: 76,02; H: 6,58; N: 3,28

2,3,5-Tris-(4-hydroxyphenyl)-1-isobutyl-1H-pyrrol (40)

0,45 mmol (200 mg) 2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-isobutyl-1H-pyrrol (**22**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,3 mmol (567 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₆H₂₅NO₃ (399,48)

orangeroter Feststoff, Schmp. 210°C

Ausbeute: 0,31 mmol (125 mg), 70 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D6)DMSO] δ = 9.54 (s, 1H, OH), 9.49 (s, 1H, OH), 9.08 (s, 1H, OH), 7.26 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 7.07 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.92 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.82 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.79 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.54 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.16 (s, 1H, CH), 3.66 (d, 2H, J = 7.4, NCH₂CH(CH₃)₂), 1.32 (m, 1H, J = 6.9, NCH₂CH(CH₃)₂), 0.36 (d, 6H, J = 6.7, NCH₂CH(CH₃)₂)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 399 [M]⁺ (75), 356 (21), 199 (5), 121 (28), 43 (100)

IR (KBr, /cm): 3400(b, s), 2958(m), 1892(w), 1703(w), 1613(m), 1567 (m), 1519(s), 1500(s), 1333(m), 1229(b, s), 1171(m), 1100(w), 836(s)

CHN: berechnet: x0,5 EtOAc: C: 75,82; H: 6,54; N: 3,16; gefunden: C: 75,42; H: 6,18; N: 3,54

2,3,5-Tris-(4-hydroxyphenyl)-1-isopentyl-1H-pyrrol (41)

0,5 mmol (229 mg) 2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-isopentyl-1H-pyrrol (**23**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,5 mmol (630 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₇H₂₇NO₃ (413,51)

gelber Feststoff, Schmp. 199°C

Ausbeute: 0,37 mmol (109 mg), 53 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D6)DMSO] δ = 9.55 (s, 1H, OH), 9.51 (s, 1H, OH), 9.08 (s, 1H, OH), 7.26 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 7.10 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.92 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.81 (m, 4H, ArH), 6.54 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.16 (s, 1H, CH), 3.77 ("t", 2H, J = 8.0, NCH₂CH₂CH(CH₃)₂), 1.05 (m, 3H, NCH₂CH₂CH(CH₃)₂), 0.49 (d, 6H, J = 6.4, NCH₂CH₂CH(CH₃)₂)

MS (EI, 170°C): m/z (%) = 413 [M]⁺ (100), 356 (78), 308 (21), 135 (14), 121 (26)

IR (KBr, /cm): 3405(b, m), 2956(m), 1610(m), 1569(m), 1518(s), 1500(s), 1443(m), 1384(m), 1229(b, s), 1171(s), 1101(w), 875(w), 836(m)

CHN: berechnet: x2 H₂O: C: 72,14; H: 6,95; N: 3,12; gefunden: C: 72,31; H: 7,24; N: 2,98

2-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-3,5-bis-(4-hydroxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (42)

0,67 mmol (291 mg) 2-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (**24**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 3,4 mmol (840 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₃H₁₈ClNO₃ (391,85)

oranger Feststoff, Schmp. 105°C

Ausbeute: 0,33 mmol (128 mg), 49 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D6)DMSO] δ = 10.10 (s, 1H, OH), 9.53 (s, 1H, OH), 9.11 (s, 1H, OH), 7.30 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 7.14 (d, 1H, J = 8.4, ArH), 6.99 (d, 1H, J = 2.4, ArH), 6.92 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.85 (d,

2H, J = 8.6, ArH), 6.79 (dd, 1H, J = 8.4, J = 2.5, ArH), 6.57 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.28 (s, 1H, CH), 3.24 (s, 3H, NCH₃)

MS (EI, 170°C): m/z (%) = 391 [M]⁺ (100), 341 (5), 326 (4), 195 (8), 121 (7)

IR (KBr, /cm): 3390(b, s), 2937(w), 2359(w), 1609(m), 1567(m), 1515(s), 1495(s), 1431(m), 1341(m), 1227(s), 1172(s), 1103(w), 896(w), 836(m)

CHN: berechnet: x1,3 H₂O: C: 66,52; H: 5,00; N: 3,37; gefunden: C: 66,35; H: 5,38; N: 3,40

2-(2-Fluor-4-hydroxyphenyl)-3,5-bis-(4-hydroxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (43)

0,84 mmol (352 mg) 2-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (**25**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 4,2 mmol (1056 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₃H₁₈FNO₃ (375,39)

brauner Feststoff, Schmp. 158°C

Ausbeute: 0,28 mmol (106 mg), 34 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D₆)DMSO] δ = 10.05 (s, 1H, OH), 9.55 (s, 1H, OH), 9.14 (s, 1H, OH), 7.30 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 7.07 (t, 1H, J = 8.8, ArH), 6.94 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.84 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.65 (m, 2H, ArH), 6.57 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.26 (s, 1H, CH), 3.28 (s, 3H, NCH₃)

MS (EI, 175°C): m/z (%) = 375 [M]⁺ (100), 359 (5), 345 (3), 187 (9), 167 (2), 81 (3)

IR (KBr, /cm): 3402(b, s), 2930(m), 2361(w), 1612(b, s), 1513(s), 1501(s), 1450(m), 1379(m), 1341(m), 1297(m), 1243(s), 1172(s), 1106(m), 963(w), 836(m)

CHN: berechnet: x1,6 H₂O: C: 68,34; H: 5,29; N: 3,47; gefunden: C: 68,21; H: 5,46; N: 3,49

5-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-2,3-bis-(4-hydroxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (44)

0,45 mmol (195 mg) 5-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2,3-bis-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (**26**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,2 mmol (563 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₃H₁₈ClNO₃ (391,85)

oranger Feststoff, Schmp. 142°C

Ausbeute: 0,26 mmol (100 mg), 57 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D₆)DMSO] δ = 10.07 (s, 1H, OH), 9.57 (s, 1H, OH), 9.11 (s, 1H, OH), 7.29 (d, 1H, J = 8.4, ArH), 7.09 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.94 (m, 3H, ArH), 6.81 (m, 3H, ArH), 6.56 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.19 (s, 1H, CH), 3.13 (s, 3H, NCH₃),

MS (EI, 200°C): m/z (%) = 391 [M]⁺ (100), 374 (2), 195 (5), 152 (2), 120 (1)

IR (KBr, /cm): 3399(b, s), 2944(w), 2360(m), 1609(s), 1566(s), 1519(s), 1493(s), 1433(m), 1376(m), 1338(m), 1226(s), 1172(s), 1060(m), 998(w), 836(m)

CHN: berechnet: x1 H₂O: C: 67,40; H: 4,92; N: 3,41; gefunden: C: 67,02; H: 5,26; N: 3,56

5-(2-Fluor-4-hydroxyphenyl)-2,3-bis-(4-hydroxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (45)

0,72 mmol (300 mg) 5-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-2,3-bis-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (**27**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 3,59 mmol (900 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₃H₁₈FNO₃ (375,39)

brauner Feststoff, Schmp. 137°C

Ausbeute: 0,59 mmol (220 mg), 82 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

147 8 Experimenteller Teil

¹H-NMR: [(D6)DMSO] δ = 10.07 (s, 1H, OH), 9.58 (s, 1H, OH), 9.12 (s, 1H, OH), 7.27 (t, 1H, J = 8.9, ArH), 7.09 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.80 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.70 (m, 2H, ArH), 6.56 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.22 (s, 1H, CH), 3.20 (s, 3H, NCH₃)

MS (EI, 75°C): m/z (%) = 375 [M]⁺ (100), 359 (5), 241 (2), 187 (6), 167 (4), 71 (2)

IR (KBr, /cm): 3404(b, s), 2937(w), 2359(w), 1609(b, s), 1518(s), 1497(s), 1457(m), 1382(m), 1333(m), 1299(m), 1245(s), 1173(s), 1108(m), 963(w), 837(m)

CHN: berechnet: x1,3 H₂O: C: 69,27; H: 5,17; N: 3,51; gefunden: C: 69,45; H: 5,51; N: 3,63

2-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-3,5-bis-(4-hydroxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (46)

0,44 mmol (220 mg) 2-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (**28**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,1 mmol (550 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₅H₂₂ClNO₃ (419,9)

oranger Feststoff, Schmp. 102°C

Ausbeute: 0,17 mmol (70 mg), 38 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D6)DMSO] δ = 10.09 (s, 1H, OH), 9.52 (s, 1H, OH), 9.09 (s, 1H, OH), 7.25 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 7.17 (d, 1H, J = 8.4, ArH), 6.95 (d, 1H, J = 2.4, ArH), 6.89 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.83 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.80 (dd, 1H, J = 8.4, J = 2.5, ArH), 6.55 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.22 (s, 1H, CH), 3.60 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.17 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 0.46 (t, 3H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 200°C): m/z (%) = 419 [M]⁺ (100), 390 (14), 376 (10), 254 (2), 209 (7)

IR (KBr, /cm): 3399(b, s), 2964(m), 2359(w), 1891(w), 1610(m), 1567(m), 1415(s), 1496(s), 1466(m), 1343(m), 1227(s), 1172(s), 1102(w), 896(w), 836(m)

CHN: berechnet: x1,1 H₂O: C: 68,29; H: 5,55; N: 3,19; gefunden: C: 68,12; H: 5,76; N: 3,18

2-(2-Fluor-4-hydroxyphenyl)-3,5-bis-(4-hydroxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (47)

0,40 mmol (178 mg) 2-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (**29**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,0 mmol (500 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₅H₂₂FNO₃ (403,45)

brauner Feststoff, Schmp. 106°C

Ausbeute: 0,31 mmol (126 mg), 71 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D6)DMSO] δ = 10.14 (s, 1H, OH), 9.59 (s, 1H, OH), 9.17 (s, 1H, OH), 7.31 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 7.16 (t, 1H, J = 8.8, ArH), 6.99 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.89 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.71 (m, 2H, ArH), 6.62 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.28 (s, 1H, CH), 3.70 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.24 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 0.52 (t, 3H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 200°C): m/z (%) = 403 [M]⁺ (100), 374 (15), 359 (12), 347 (1), 201 (6)

IR (KBr, /cm): 3401(b, s), 2963(m), 1890(w), 1616(m), 1519(s), 1498(s), 1457(m), 1380(m), 1343(m), 1300(m), 1231(s), 1172(s), 1111(m), 966(m), 836(m)

CHN: berechnet: x2 H₂O: C: 68,32; H: 5,96; N: 3,18; gefunden: C: 68,24; H: 6,27; N: 3,29

5-(2-Chlor-4-hydroxyphenyl)-2,3-bis-(4-hydroxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (48)

0,65 mmol (300 mg) 5-(2-Chlor-4-methoxyphenyl)-2,3-bis-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (**30**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 3,2 mmol (813 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

Nach dem Säulen wird noch mittels MPLC (Fließmittel: Methanol/Wasser: 7+3) weiter aufgereinigt.

C₂₅H₂₂ClNO₃ (419,9)

oranger Feststoff, Schmp. 123°C

Ausbeute: 0,05 mmol (20 mg), 7 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 10.06$ (s, 1H, OH), 9.58 (s, 1H, OH), 9.09 (s, 1H, OH), 7.29 (d, 1H, J = 8.4, ArH), 7.07 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.94 (d, 1H, J = 2.4, ArH), 6.92 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.82 (m, 3H, ArH), 6.54 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.16 (s, 1H, CH), 3.53 ("t", 2H, J = 7.6, NCH₂CH₂CH₃), 1.11 (sextett, 2H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃), 0.41 (t, 3H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 200°C): m/z (%) = 419 [M]⁺ (100), 390 (24), 209 (6), 165 (4), 121 (2)

IR (KBr, /cm): 3399(b, s), 2962(m), 1893(w), 1608(s), 1519(s), 1493(s), 1463(m), 1435(m), 1343(m), 1256(s), 1224(s), 1173(s), 1100(w), 899(w), 838(m)

CHN: berechnet: x1,5 H₂O: C: 67,19; H: 5,64; N: 3,13; gefunden: C: 67,18; H: 5,61; N: 3,29

5-(2-Fluor-4-hydroxyphenyl)-2,3-bis-(4-hydroxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (49)

0,44 mmol (194 mg) 5-(2-Fluor-4-methoxyphenyl)-2,3-bis-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (**31**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,2 mmol (554 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₅H₂₂FNO₃ (403,45)

brauner Feststoff, Schmp. 100°C

Ausbeute: 0,22 mmol (90 mg), 50 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 9.80$ (s, 1H, OH), 9.32 (s, 1H, OH), 8.84 (s, 1H, OH), 7.00 (t, 1H, J = 8.7, ArH), 6.84 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.67 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.56 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.44 (m, 2H, ArH), 6.30 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 5.94 (s, 1H, CH), 3.34 ("t", 2H, J = 7.2, NCH₂CH₂CH₃), 0.89 (sextett, 2H, J = 7.6, NCH₂CH₂CH₃), 0.18 (t, 3H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 200°C): m/z (%) = 403 [M]⁺ (100), 374 (16), 360 (10), 201 (6), 165 (2), 107 (1)

IR (KBr, /cm): 3370(b, s), 2964(m), 2358(w), 1613(s), 1519(s), 1497(s), 1459(m), 1379(m), 1343(m), 1300(m), 1230(s), 1172(s), 1109(m), 964(m), 837(s)

CHN: berechnet: x1,3 H₂O: C: 70,34; H: 5,81; N: 3,28; gefunden: C: 70,21; H: 6,18; N: 3,17

2,5-Bis-(2-fluor-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (50)

1,6 mmol (700 mg) 2,5-Bis-(2-fluor-4-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrol (**32**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 8,0 mmol (2010 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₃H₁₇F₂NO₃ (393,38)

oranger Feststoff, Schmp. 126°C

Ausbeute: 0,89 mmol (350 mg), 55 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 10.10$ (s, 1H, OH), 10.07 (s, 1H, OH), 9.14 (s, 1H, OH), 7.27 (t, 1H, J = 8.8, ArH), 7.06 (t, 1H, J = 8.8, ArH), 6.94 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.69 (m, 4H, ArH), 6.58 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.27 (s, 1H, CH), 3.16 (s, 3H, NCH₃)

MS (EI, 175°C): m/z (%) = 393 [M]⁺ (100), 241 (4), 196 (8), 152 (5)

IR (KBr, /cm): 3393(b, m), 2920(w), 1619(m), 1469(w), 1342(w), 1300(w), 1229(w), 1152(w), 1108(w), 966(w), 831(m)

CHN: berechnet: C: 70,22; H: 4,36; N: 3,56; gefunden: C: 69,91; H: 4,59; N: 3,23

2,5-Bis-(2-fluor-4-hydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (51)

0,86 mmol (400 mg) 2,5-Bis-(2-fluor-4-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-1H-pyrrol (**33**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 4,3 mmol (1080 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₅H₂₁F₂NO₃ (421,44)

orangeroter Feststoff, Schmp. 115°C

Ausbeute: 0,83 mmol (350 mg), 96 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 10.18$ (s, 1H, OH), 10.15 (s, 1H, OH), 9.21 (s, 1H, OH), 7.32 (t, 1H, J = 8.6, ArH), 7.17 (t, 1H, J = 8.8, ArH), 7.01 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.76 (m, 4H, ArH), 6.65 (m, 2H, J = 8.6, ArH), 6.33 (s, 1H, CH), 3.61 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₃), 1.23 (sextett, 2H, J = 7,2, NCH₂CH₂CH₃), 0.53 (t, 3H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 200°C): m/z (%) = 421 [M]⁺ (100), 392 (17), 378 (13), 210 (6)

IR (KBr, /cm): 3386(b, m), 2923(w), 1627(m), 1462(w), 1342(w), 1300(w), 1232(w), 1151(w), 1111(w), 966(w), 846(m)

CHN: berechnet: x1,8 H₂O: C: 66,16; H: 5,46; N: 3,09; gefunden: C: 66,29; H: 5,77; N: 3,15

2,3,5-Tris-(4-hydroxyphenyl)-1-methyl-4-propyl-1H-pyrrol (52)

0,32 mmol (142 mg) 2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-4-propyl-1H-pyrrol (**34**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 1,6 mmol (403 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

Nach dem Säulen wird noch mittels MPLC (Fließmittel: Methanol/Wasser: 7+3) weiter aufgereinigt.

C₂₆H₂₅NO₃ (399,48)

gelber Feststoff, Schmp. 135°C

Ausbeute: 0,05 mmol (20 mg), 15 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 9.53$ (s, 1H, OH), 9.40 (s, 1H, OH), 9.13 (s, 1H, OH), 7.21 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 7.00 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.88 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.85 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.67 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.61 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 3.20 (s, 3H, NCH₃), 2.29 ("t", 2H, J = 7.2, CH₂CH₂CH₃), 1.10 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0.58 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 170°C): m/z (%) = 399 [M]⁺ (100), 370 (77), 343 (20), 199 (6), 184 (5), 134 (13)

IR (KBr, /cm): 3387(b, m), 2957(m), 2927(m), 1666(m), 1608(s), 1511(s), 1438(m), 1368(m), 1266(s), 1239(s), 1169(m), 1106(m), 1050(w), 836(m)

CHN: berechnet: x1,4 H₂O: C: 73,53; H: 6,60; N: 3,30; gefunden: C: 73,36; H: 6,88; N: 3,35

2,3,5-Tris-(4-hydroxyphenyl)-1-ethyl-4-propyl-1H-pyrrol (53)

0,35 mmol (170 mg) 2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1-propyl-4-ethyl-1H-pyrrol (**35**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 1,8 mmol (447 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₇H₂₇NO₃ (413,51)

gelber Feststoff, Schmp. 148°C

Ausbeute: 0,11 mmol (43 mg), 30 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 9.51$ (s, 1H, OH), 9.39 (s, 1H, OH), 9.08 (s, 1H, OH), 7.18 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 7.00 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.87 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.84 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.67 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.57 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 3.64 (q, 2H, J = 7.0, NCH₂CH₃), 2.25 ("t", 2H, J = 7.6, CH₂CH₂CH₃), 1.09 (sextett, 2H, J = 7.5, CH₂CH₂CH₃), 0.71 (t, 3H, J = 7.0, NCH₂CH₃), 0.57 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 413 [M]⁺ (100), 384 (61), 367 (7), 357 (19), 206 (10)

IR (KBr, /cm): 3399(b, s), 2957(m), 2931(m), 1610(s), 1567(m), 1504(s), 1439(m), 1365(m), 1345(m), 1258(s), 1229(s), 1170(m), 1100(w), 836(m)

CHN: berechnet: x1,4 H₂O: C: 73,92; H: 6,85; N: 3,19; gefunden: C: 74,03; H: 7,22; N: 2,80

2,3,5-Tris-(4-hydroxyphenyl)-1,4-dipropyl-1H-pyrrol (54)

0,3 mmol (141 mg) 2,3,5-Tris-(4-methoxyphenyl)-1,4-dipropyl-1*H*-pyrrol (**36**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 1,5 mmol (376 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

$C_{28}H_{29}NO_3$ (427,53)

gelber Feststoff, Schmp. 103°C

Ausbeute: 0,04 mmol (17 mg), 13 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D₆)DMSO] $\delta = 9.53$ (s, 1H, OH), 9.40 (s, 1H, OH), 9.10 (s, 1H, OH), 7.17 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.98 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.86 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.84 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.67 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.58 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 3.59 ("t", 2H, J = 7.4, NCH₂CH₂CH₃), 2.26 ("t", 2H, J = 7.4, CH₂CH₂CH₃), 1.09 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₃ und CH₂CH₂CH₃), 0.56 (t, 3H, J = 7.3, NCH₂CH₂CH₃), 0.39 (t, 3H, J = 7.4, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 175°C): m/z (%) = 427 [M]⁺ (100), 398 (57), 383 (12), 371 (20), 213 (10)

IR (KBr, /cm): 3390(b, s), 2961(m), 2932(m), 1673(m), 1609(s), 1510 (s), 1439(m), 1361(b, m), 1263(s), 1229(s), 1171(m), 1101(m), 834(m)

CHN: berechnet: x2,5 H₂O: C: 71,17; H: 7,25; N: 2,96; gefunden: C: 71,17; H: 7,06; N: 2,78

8.1.2.2 Synthese der 1,2,4-Triarylpyrrole (Typ B)

Synthese von 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion (**55**)

3,38 g 60 %ige Natriumhydridsuspension (2,03 g (0,084 mol) NaH) wird unter Schutzgas in 32 mL auf 18°C gekühltem absolutem DMSO suspendiert. Dann wird das Eisbad entfernt und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem wieder mittels Eisbad auf 18°C abgekühlt wurde, wird 14,02 g (0,084 mol) 4-Methoxybenzoesäuremethylester gelöst in 9 mL absolutem DMSO dazugetropft. Es wird auf 8-10°C abgekühlt und dann 7,51 g (0,05 mol) 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1-on gelöst in 9 mL absolutem DMSO langsam hinzugegeben. Es wird das Eisbad entfernt und gerührt bis die Temperatur bei 30°C ist. Sollte dies nicht von selbst geschehen, wird vorsichtig auf 30°C erwärmt. Paul is dead. Der Ansatz wird auf eine Mischung aus 175 g Eiswasser und 3,4 mL Phosphorsäure gegossen. Der ausgefallene Feststoff wird abgenutscht und mit kaltem Wasser gewaschen. Es wird mit Ethanol umkristallisiert und mit kaltem Cyclohexan gewaschen.

$C_{17}H_{16}O_4$ (284,31)

gelbe Nadeln, Schmp. 76°C

Ausbeute: 0,044 mol (12,4 g), 86 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petroether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,7$

¹H-NMR: [(D₆)DMSO] $\delta = 8.14$ (d, 4H, J = 8.9, ArH), 7.21 (s, 1H, COCHCOH), 7.09 (d, 4H, J = 8.9, ArH), 3.87 (s, 6H, OCH₃)

MS (EI, 210°C): m/z (%) = 284 [M]⁺ (75), 177 (16), 135 (100), 108 (62), 92 (17), 77 (23)

IR (KBr, /cm): 2960/2936(w), 2568(w), 2359(w), 1602(s, b), 1500(s, b), 1439(s), 1304(s), 1259(s), 1230(s), 1171(s), 1116(s), 1023(s), 840(s), 781(s), 721(w), 635(w)

Allgemeine Vorschrift zur Alkylierung von 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion:

1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion und Kaliumtertiäributanolat werden unter Schutzgas in absolutem THF gelöst. Es wird 10 min. zum Rückfluss erhitzt. Dann wird das entsprechende Iodalkan in THF gelöst zugetropft. Es wird unter Rückfluss erhitzt bis die Reaktion beendet ist (DC-Kontrolle). Danach wird das Lösungsmittel abgedampft, der Rückstand in Dichlormethan gelöst und mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft.

1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-methylpropan-1,3-dion (56)

0,021 mol (6 g) 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion (**55**) und 0,021 mol (2,37 g) Kaliumtertiärbutanolat werden in THF erhitzt. 0,022 mol (1,38 mL) Iodmethan wird zugetropft. Es wird etwa zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt.

C₁₈H₁₈O₄ (298,33)

gelblicher Feststoff, Schmp. 74°C

Ausbeute: 0,019 mol (5,8 g), 92 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 2+1): R_f = 0,4

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.88 (d, 4H, J = 8.9, ArH), 6.84 (d, 4H, J = 8.9, ArH), 5.06 (q, 1H, J = 7.0, COCHCO), 3.78 (s, 6H, OCH₃), 1.52 (s, 3H, CH₃)

MS (EI, 40°C): m/z (%) = 298 [M]⁺ (7), 135 (100), 92 (16), 77(22)

IR (KBr, /cm): 3417(b, w), 2939(w), 2917(w), 2843(w), 1674(s), 1658(s), 1599(s), 1571(m), 1511(w), 1417(w), 1263(s), 1239(m), 1170(s), 1117(w), 1022(m), 973(m), 855(m), 809(w), 794(w)

1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-ethylpropan-1,3-dion (57)

0,035 mol (10 g) 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion (**55**) und 0,035 mol (3,95 g) Kaliumtertiärbutanolat werden in THF erhitzt. 0,037 mol (2,96 mL) Iodethan wird zugetropft. Es wird etwa vier Stunden zum Rückfluss erhitzt.

C₁₉H₂₀O₄ (312,36)

gelblicher Feststoff, Schmp. 65°C

Ausbeute: 0,033 mol (10,2 g), 92 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 2+1): R_f = 0,4

¹H-NMR: [(D₆)DMSO] δ = 7.98 (d, 4H, J = 8.9, ArH), 7.05 (d, 4H, J = 8.9, ArH), 5.56 (t, 1H, J = 6.5, COCHCO), 3.83 (s, 6H, OCH₃), 1.89 (quint, 2H, J = 7.2, CH₂CH₃), 0.93 (t, 3H, J = 7.4, CH₂CH₃)

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 312 [M]⁺ (5), 284 (5), 177 (2), 135 (100), 77 (14)

IR (KBr, /cm): 3431(b, w), 2967(w), 2935(w), 2840(w), 1677(s), 1660(m), 1603(s), 1575(m), 1510(m), 1421(m), 1262(s), 1228(m), 1184(s), 1114(m), 1029(m), 992(m), 840(m), 814(w), 782(w)

1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-propylpropan-1,3-dion (58)

0,035 mol (10 g) 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion (**55**) und 0,035 mol (3,95 g) Kaliumtertiärbutanolat werden in THF erhitzt. 0,037 mol (3,6 mL) Iodpropan wird zugetropft. Es wird etwa sieben Stunden zum Rückfluss erhitzt.

C₂₀H₂₂O₄ (326,39)

gelblicher Feststoff, Schmp. 58°C

Ausbeute: 0,027 mol (8,7 g), 76 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 2+1): R_f = 0,4

¹H-NMR: [(D₆)DMSO] δ = 7.99 (d, 4H, J = 8.9, ArH), 7.05 (d, 4H, J = 8.9, ArH), 5.59 (t, 1H, J = 6.5, COCHCO), 3.83 (s, 6H, OCH₃), 1.83 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.34 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0.88 (t, 3H, J = 7.4, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 326 [M]⁺ (1), 284 (16), 135 (100), 92 (17)

IR (KBr, /cm): 3438(b, m), 2960(w), 2934(w), 2871(w), 1686(m), 1658(m), 1601(s), 1509(m), 1462(m), 1261(s), 1174(s), 1117(w), 1028(m), 842(w), 792(w)

Allgemeine Vorschrift zur cyclisierung zum 1H-Pyrrolcarboxylat:

Das entsprechende alkylierte Diketon wird in wasserfreier Essigsäure unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Diethyl-(2-amino)malonsäureester wird langsam zugetropft. Die Reaktion ist beendet, wenn

keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist (Blasenzähler). Nach Abkühlen wird zum Ansatz kaltes Wasser gegeben und mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat wird das Lösungsmittel abgedampft. Nach einigen Stunden bilden sich Kristalle. Es wird mit Ethanol umkristallisiert, abgesaugt und mit kaltem Ethanol gewaschen.

Ethyl-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol-2-carboxylat (59)

0,032 mol (9 g) 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)propan-1,3-dion (**55**) wird in 135 mL wasserfreier Essigsäure zum Sieden erhitzt. 0,127 mol (22,18 g) Diethyl-(2-amino)malonsäureester wird langsam zugetropft. Nach etwa zwei Stunden ist die Gasentwicklung beendet. Nach Abkühlen wird zum Ansatz 500 mL kaltes Wasser gegeben und mit Dichlormethan ausgeschüttelt.

$C_{21}H_{21}NO_4$ (351,40)

weiße kristalline Substanz, Schmp. 145°C

Ausbeute: 0,019 mol (6,7 g), 60 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 9.15$ (s, 1H, NH), 7.57 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.54 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.98 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.95 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.50 (d, 1H, J = 3.0, CH), 4.30 (q, 2H, J = 7.1, CH_2CH_3), 3.87 (s, 6H, OCH_3), 1.30 (t, 3H, J = 7.1, CH_2CH_3)

MS (EI, 75°C): m/z (%) = 351 [M]⁺ (100), 305 (71), 263 (50), 175 (6), 135 (43)

IR (KBr, /cm): 3330(b, m), 2959(w), 2838(w), 1894(w), 1662(s), 1604(s), 1506(s), 1454(s), 1443(s), 1265(b, s), 1177(m), 1116(m), 1031(m), 839(m), 818(m), 783(m)

Ethyl-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-carboxylat (60)

0,034 mol (10 g) 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-methylpropan-1,3-dion (**56**) wird in 135 mL wasserfreier Essigsäure zum Sieden erhitzt. 0,134 mol (23,49 g) Diethyl-(2-amino)malonsäureester wird langsam zugetropft. Nach etwa dreieinhalb Stunden ist die Gasentwicklung beendet. Nach Abkühlen wird zum Ansatz 500 mL kaltes Wasser gegeben und mit Dichlormethan ausgeschüttelt.

$C_{22}H_{23}NO_4$ (365,42)

weiße kristalline Substanz, Schmp. 152°C

Ausbeute: 0,01 mol (3,9 g), 31 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 8.92$ (s, 1H, NH), 7.46 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.31 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.00 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.95 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 4.19 (q, 2H, J = 7.1, CH_2CH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 2.08 (s, 3H, CH_3), 1.18 (t, 3H, J = 7.1, CH_2CH_3)

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 365 [M]⁺ (100), 319 (56), 291 (10), 276 (21), 159 (10)

IR (KBr, /cm): 3371(m), 2957(m), 2836(w), 1897(w), 1611(w), 1567(m), 1507(s), 1459(m), 1283(m), 1244(s), 1180(m), 1111(w), 1034(m), 907(w), 837(m), 640(w)

Ethyl-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-4-ethyl-1H-pyrrol-2-carboxylat (61)

0,033 mol (10,23g) 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-ethylpropan-1,3-dion (**57**) wird in 124 mL wasserfreier Essigsäure zum Sieden erhitzt. 0,131 mol (22,94 g) Diethyl-(2-amino)malonsäureester wird langsam zugetropft. Nach etwa fünf Stunden ist die Gasentwicklung beendet. Nach Abkühlen wird zum Ansatz 500 mL kaltes Wasser gegeben und mit Dichlormethan ausgeschüttelt.

$C_{23}H_{25}NO_4$ (379,45)

weiße kristalline Substanz, Schmp. 145°C

Ausbeute: 6,27 mmol (2,4 g), 19 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,6$

153 8 Experimenteller Teil

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 8.88 (s, 1H, NH), 7.45 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.29 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 7.00 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.94 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 4.15 (q, 2H, J = 7.1, OCH₂CH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 2.52 (q, 2H, J = 7.5, CH₂CH₃), 1.14 (t, 3H, J = 7.1, OCH₂CH₃), 0.91 (t, 3H, J = 7.5, CH₂CH₃)

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 379 [M]⁺ (100), 351 (40), 333 (45), 189 (6), 135 (12)

IR (KBr, /cm): 3318(b, s), 2971(w), 2836(w), 1658(s), 1613(w), 1562(w), 1534(w), 1509(m), 1474(m), 1436(m), 1272(m), 1247(s), 1178(m), 1036(m), 836(m), 774(w)

Ethyl-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrrol-2-carboxylat (62)

0,032 mol (10,40 g) 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-propylpropan-1,3-dion (**58**) wird in 135 mL wasserfreier Essigsäure zum Sieden erhitzt. 0,127 mol (22,32 g) Diethyl-(2-amino)malonsäureester wird langsam zugetropft. Nach etwa acht Stunden ist die Gasentwicklung beendet. Nach Abkühlen wird zum Ansatz 500 mL kaltes Wasser gegeben und mit Dichlormethan ausgeschüttelt.

C₂₄H₂₇NO₄ (393,48)

weiße kristalline Substanz, Schmp. 157°C

Ausbeute: 3,10 mmol (1,21 g), 10 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 8.91 (s, 1H, NH), 7.44 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.28 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.99 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 4.15 (q, 2H, J = 7.1, OCH₂CH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 2.47 ("t", 2H, J = 7.5, CH₂CH₂CH₃), 1.25 (m, 2H, J = 7.1, CH₂CH₂CH₃), 1.14 (t, 3H, J = 7.1, OCH₂CH₃), 0.70 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 120°C): m/z (%) = 393 [M]⁺ (100), 364 (29), 318 (56), 196 (5), 135 (17)

IR (KBr, /cm): 3297(b, s), 2959(w), 2837(w), 2330(w), 1660(s), 1565(w), 1509(m), 1442(m), 1275(m), 1246(m), 1178(m), 1109(w), 1035(m), 836 (w), 644(w)

Allgemeine Vorschrift zur Esterverseifung und Decarboxylierung der Pyrrolcarboxylate:

Das entsprechende Pyrrolcarboxylat und Kaliumhydroxidplättchen werden in Ethylenglycol gelöst und unter Rückfluss eine Stunde lang zum Sieden erhitzt. Die Reaktion findet unter Lichtausschluss und Schutzgasatmosphäre statt. Nach Abkühlen wird der Ansatz in Wasser gegossen. Das Produkt fällt aus und wird abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser einen neutralen pH-Wert zeigt.

2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol (63)

0,011 mol (4 g) Ethyl-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol-2-carboxylat (**59**) und 0,057 mol (3,19 g) KOH werden in 125 mL Ethylenglycol gelöst und eine Stunde zum Sieden erhitzt.

C₁₈H₁₇NO₂ (279,33)

beiges Pulver, Schmp. 228°C

Ausbeute: 6,80 mmol (1,90 g), 60 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,7

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 8.31 (s, 1H, NH), 7.49 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 7.44 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 7.03 (m, 1H, CH), 6.94 (d, 2H, J = 9.4, ArH), 6.91 (d, 2H, J = 9.1, ArH), 6.65 (m, 1H, CH), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃)

MS (EI, 80°C): m/z (%) = 279 [M]⁺ (100), 264 (45), 250 (7), 139 (12), 118 (8), 96 (4)

IR (KBr, /cm): 3441(b, s), 2956(m), 2839(w), 1887(w), 1610(m), 1575(m), 1505(s), 1469(m), 1438(m), 1252(b, s), 1179(m), 1129(m), 1033(s), 927(w), 834(s), 797(m)

2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-1H-pyrrol (64)

0,011 mol (3,89 g) Ethyl-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxylat (**60**) und 0,053 mol (2,98 g) KOH werden in 119 mL Ethylenglycol gelöst und eine Stunde zum Sieden erhitzt.

C₁₉H₁₉NO₂ (293,36)

beiges Pulver, Schmp. 186°C

Ausbeute: 8,47 mmol (2,48 g), 77 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,7

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 8.08 (s, 1H, NH), 7.41 (d, 4H, J = 8.7, ArH), 7.00 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.97 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.87 (d, 1H, J = 2.6, CH), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 2.30 (s, 3H, CH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 293 [M]⁺ (100), 278 (31), 263 (8), 250 (1), 145 (11)

IR (KBr, /cm): 3458(b, m), 2956(w), 2836(w), 1897(w), 1611(m), 1566(m), 1506(s), 1457(m), 1284(m), 1251(s), 1179(m), 1110(w), 1035(m), 905(w), 836(m), 766(w)

2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-3-ethyl-1*H*-pyrrol (**65**)

4,87 mmol (1,85 g) Ethyl-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-4-ethyl-1*H*-pyrrol-2-carboxylat (**61**) und 0,024 mol (1,37 g) KOH werden in 55 mL Ethylenglycol gelöst und eine Stunde zum Sieden erhitzt.

C₂₀H₂₁NO₂ (307,39)

beiges Pulver, Schmp. 150°C

Ausbeute: 3,60 mmol (1,11 g), 74 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,7

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 8.02 (s, 1H, NH), 7.38 (d, 4H, J = 8.7, ArH), 6.97 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.94 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.80 (d, 1H, J = 2.7, CH), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 2.73 (q, 2H, J = 7.5, CH₂CH₃), 1.03 (t, 3H, J = 7.5, CH₂CH₃)

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 307 [M]⁺ (100), 292 (63), 278 (25), 261 (7), 153 (2)

IR (KBr, /cm): 3400(b, s), 2938(m), 2879(m), 1608(m), 1607(m), 1458(m), 1385(w), 1247(m), 1178(m), 1087(m), 1037(m), 883(w), 832(w), 637(w)

2,4-Bis-(4-Methoxyphenyl)-3-Propyl-1*H*-Pyrrol (**66**)

5,13 mmol (2,02 g) Ethyl-3,5-bis-(4-methoxyphenyl)-4-propyl-1*H*-pyrrol-2-carboxylat (**62**) und 0,026 mol (1,44 g) KOH werden in 58 mL Ethylenglycol gelöst und eine Stunde zum Sieden erhitzt.

C₂₁H₂₃NO₂ (321,41)

beiges Pulver, Schmp. 134°C

Ausbeute: 4,31 mmol (1,39 g), 84 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,7

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 8.02 (s, 1H, NH), 7.38 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 7.37 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.96 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.79 (d, 1H, J = 2.7, CH), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 2.66 ("t", 2H, J = 8.0, CH₂CH₂CH₃), 1.41 (sextett, 2H, J = 7.5, CH₂CH₂CH₃), 0.79 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 90°C): m/z (%) = 321 [M]⁺ (76), 292 (100), 265 (17), 160 (6), 135 (23)

IR (KBr, /cm): 3405(m), 2963(m), 2838(w), 1692(w), 1609(m), 1567(w), 1506(s), 1461(m), 1376(w), 1244(b, s), 1178(m), 1109(w), 1032(m), 929(w), 832(m), 778(w)

Allgemeine Vorschrift zur N-Arylierung der 1*H*-Pyrrole:

Das entsprechende 2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrrol wird mit Iodanisol, L-Prolin, Kaliumcarbonat und Kupferiodid in einem trockenen Schlenk Kolben unter Schutzbegasung in absolutem DMF gelöst und 72 Stunden unter Rückfluss auf 140°C erhitzt. Nach Erkalten wird die Reaktion durch Zugabe von Ethylacetat und Wasser gestoppt, mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird

155 8 Experimenteller Teil

abgedampft und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat 8+1 gereinigt.

1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol (67)

4 mmol (1,12 g) 2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol (**63**), 4,4 mmol (1,03 g) Iodanisol, 0,8 mmol (92 mg) L-Prolin, 8 mmol (1,11 g) Kaliumcarbonat und 0,4 mmol (76 mg) Kupferiodid werden in 8 mL absolutem DMF erhitzt.

$C_{25}H_{23}NO_3$ (385,46)

gelber Feststoff, Schmp. 132°C

Ausbeute: 0,451 mmol (174 mg), 11 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,4$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 7.50$ (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 7.13 (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 7.10 (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 7.08 (d, 1H, $J = 1.8$, CH), 6.92 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 6.85 (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 6.77 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 6.59 (d, 1H, $J = 1.4$, CH), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.78 (s, 3H, OCH_3)

MS (EI, 125°C): m/z (%) = 385 [M]⁺ (31), 370 (7), 279 (7), 237 (5), 135 (100)

IR (KBr, /cm): 3428(b, m), 2931(w), 2836(w), 1887(w), 1671(w), 1611(m), 1513(s), 1464(m), 1393(w), 1291(m), 1248(s), 1175(m), 1031(m), 960(w), 834(m), 805(m)

CHN: berechnet: $x0,6 H_2O$: C: 75,78; H: 6,16; N: 3,54; gefunden: C: 75,85; H: 6,26; N: 3,53

1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-1H-pyrrol (68)

2 mmol (587 mg) 2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-1H-pyrrol (**64**), 2,2 mmol (515 mg) Iodanisol, 0,4 mmol (46 mg) L-Prolin, 4 mmol (553 mg) Kaliumcarbonat und 0,2 mmol (38 mg) Kupferiodid werden in 4 mL absolutem DMF erhitzt.

$C_{26}H_{25}NO_3$ (399,48)

gelber Feststoff, Schmp. 107°C

Ausbeute: 0,370 mmol (148 mg), 18 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,4$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 7.42$ (d, 2H, $J = 8.6$, ArH), 7.04 (d, 4H, $J = 8.9$, ArH), 6.97 (d, 2H, $J = 8.7$, ArH), 6.87 (d, 4H, $J = 8.3$, ArH), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 2.09 (s, 3H, CH_3)

MS (EI, 210°C): m/z (%) = 399 [M]⁺ (100), 384 (15), 369 (9), 251 (13), 199 (10)

IR (KBr, /cm): 3429(b, w), 2955(w), 2833(w), 1875(w), 1613(w), 1575(w), 1536(m), 1516(s), 1506(s), 1460(m), 1296(m), 1244(s), 1177(m), 1110(m), 1034(m), 832(m)

CHN: berechnet: $x0,25 H_2O$: C: 77,30; H: 6,36; N: 3,47; gefunden: C: 77,50; H: 6,35; N: 3,78

1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-ethyl-1H-pyrrol (69)

2 mmol (615 mg) 2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-3-ethyl-1H-pyrrol (**65**), 2,2 mmol (515 mg) Iodanisol, 0,4 mmol (46 mg) L-Prolin, 4 mmol (553 mg) Kaliumcarbonat und 0,2 mmol (38 mg) Kupferiodid werden in 4 mL absolutem DMF erhitzt.

$C_{27}H_{27}NO_3$ (413,51)

gelber Feststoff, Schmp. 59°C

Ausbeute: 0,4 mmol (165 mg), 20 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 6+1): $R_f = 0,5$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 7.44$ (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 7.09 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 7.02 (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 6.94 (d, 1H, $J = 8.7$, ArH), 6.88 (s, 1H, CH), 6.81 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 6.77 (d, 2H, $J = 9.0$, ArH), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 2.65 (q, 2H, $J = 7.6$, CH_2CH_3), 0.98 (t, 3H, $J = 7.5$, CH_2CH_3)

MS (EI, 125°C): m/z (%) = 413 [M]⁺ (20), 398 (8), 206 (4), 135 (100), 107(8)

IR (KBr, /cm): 3418(b, m), 2934(w), 2836(w), 1886(w), 1677(m), 1609(m), 1512(s), 1463(m), 1389(w), 1297(m), 1250(s), 1174(m), 1032(m), 968(w), 832(m)

CHN: berechnet: x0,75 H₂O: C:75,94; H: 7,20; N: 3,28; gefunden: C: 76,22; H: 7,05; N: 3,41

1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-propyl-1H-pyrrol (70)

2 mmol (643 mg) 2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-3-propyl-1H-pyrrol (**66**), 2,2 mmol (515 mg) Iodanisol, 0,4 mmol (46 mg) L-Prolin, 4 mmol (553 mg) Kaliumcarbonat und 0,2 mmol (38 mg) Kupferiodid werden in 4 mL absolutem DMF erhitzt.

C₂₈H₂₉NO₃ (427,53)

gelber Feststoff, Schmp. 60°C

Ausbeute: 0,4 mmol (171 mg), 20 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 6+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.43 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 7.08 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 7.02 (d, 2H, J = 8.9, ArH), 6.94 (d, 1H, J = 8.7, ArH), 6.87 (s, 1H, CH), 6.81 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.76 (d, 2H, J = 8.9, ArH), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.58 ("t", 2H, J = 8,0, CH₂CH₂CH₃), 1.36 (sextett, 2H, J = 7.4, CH₂CH₂CH₃), 0.75 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 120°C): m/z (%) = 427 [M]⁺ (100), 398 (88), 371 (20), 213 (13), 135(13)

IR (KBr, /cm): 3405(b, w), 2958(m), 2836(w), 1887(w), 1681(m), 1609(m), 1512(s), 1463(m), 1390(w), 1295(m), 1249(s), 1174(m), 1032(m), 956 (w), 831(m)

CHN: berechnet: x1,7 H₂O: C:73,40; H: 7,13; N: 3,06; gefunden: C: 73,17; H: 7,48; N: 3,04

Allgemeine Vorschrift zur Entschützung der 1,2,4-Tris(4-methoxyphenyl)-pyrrole mit Bortribromid:

Das entsprechende 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-pyrrol wird unter Schutzbegasung in 15 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Mittels Eisbad wird der Ansatz auf 0°C gekühlt und langsam Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan zugetropft. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt und am nächsten Tag auf Eis gegossen und mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur abgedampft. Die Aufreinigung erfolgt über Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 9+1.

1,2,4-Tris-(4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol (71)

0,44 mmol (170 mg) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol (**67**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,2 mmol (552 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₂H₁₇NO₃ (343,38)

gelber Feststoff, Schmp. 125°C

Ausbeute: 0,4 mmol (138 mg), 91 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D₆)DMSO] δ = 9.60 (s, 1H, OH), 9.40 (s, 1H, OH), 9.21 (s, 1H, OH), 7.40 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 7.17 (d, 1H, J = 2.0, CH), 7.00 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.92 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.74 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.73 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.63 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.51 (d, 1H, J = 2.0, CH)

MS: (EI, 250°C): m/z (%) = 343 [M]⁺ (100), 293 (6), 229(6), 224 (15), 172 (8), 149 (25)

IR (KBr, /cm): 3390 (b, s), 1889(w), 1613(m), 1589 (m), 1516/1504(s), 1235(b, m), 1171(m), 1102(w), 836(s), 801(m)

CHN: berechnet: x0,8 H₂O: C:73,85; H: 5,40; N: 3,91; gefunden: C: 73,71; H: 5,61; N: 3,59

1,2,4-Tris-(4-hydroxyphenyl)-3-methyl-1H-pyrrol (72)

157 8 Experimenteller Teil

0,38 mmol (150 mg) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol (**68**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 1,9 mmol (470 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₃H₁₉NO₃ (357,40)

gelber Feststoff, Schmp. 119°C

Ausbeute: 0,24 mmol (85 mg), 63 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D7)DMF] δ = 9.71 (s, 1H, OH), 9.63 (s, 1H, OH), 9.45 (s, 1H, OH), 7.38 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 7.01 (m, 5H, 4ArH, 1CH), 6.90 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.78 (m, 4H, ArH), 2.16 (s, 3H, CH₃)

MS: (EI, 230°C): m/z (%) = 357 [M]⁺ (100), 238 (8), 223 (18), 179 (6), 107 (4), 65 (5)

IR (KBr, /cm): 3392(b, s), 1887(w), 1613(m), 1565 (m), 1514(s), 1217(b, m), 1171(m), 1101(w), 834(s)

CHN: berechnet: x1 H₂O: C: 73,58; H: 5,64; N: 3,73; gefunden: C: 73,68; H: 5,26; N: 3,70

1,2,4-Tris-(4-hydroxyphenyl)-3-ethyl-1*H*-pyrrol (**73**)

0,48 mmol (200 mg) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-ethyl-1*H*-pyrrol (**69**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,4 mmol (606 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₄H₂₁NO₃ (371,43)

gelber Feststoff, Schmp. 98°C

Ausbeute: 0,35 mmol (130 mg), 73 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D6)DMSO] δ = 9.46 (s, 1H, OH), 9.42 (s, 1H, OH), 9.25 (s, 1H, OH), 7.26 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.90 (m, 4H, ArH), 6.86 (s, 1H, CH), 6.77 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.67 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.64 (d, 2H, J = 8.8), 2.63 (q, 2H, J = 7.5, CH₂CH₃; in DMSO verdeckt vom Wasserpeak, sichtbar in CDCl₃), 0.87 (t, 3H, J = 7.4, CH₂CH₃)

MS: (EI, 170°C): m/z (%) = 371 [M]⁺ (100), 356 (49), 342 (19), 186 (7), 121 (6), 65 (9)

IR (KBr, /cm): 3430(b, s), 1889(w), 1613(m), 1512(m), 1445(m), 1229(b, s), 1172(m), 1101(w), 835(s)

CHN: berechnet: x0,5 H₂O: C: 75,77; H: 6,09; N: 3,68; gefunden: C: 75,60; H: 6,24; N: 3,60

1,2,4-Tris-(4-hydroxyphenyl)-3-propyl-1*H*-pyrrol (**74**)

0,33 mmol (140 mg) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-propyl-1*H*-pyrrol (**70**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 1,6 mmol (410 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

C₂₅H₂₃NO₃ (385,46)

gelber Feststoff, Schmp. 80°C

Ausbeute: 0,14 mmol (54 mg), 43 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D6)DMSO] δ = 9.45 (s, 1H, OH), 9.41 (s, 1H, OH), 9.25 (s, 1H, OH), 7.24 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.89 (m, 4H, ArH), 6.85 (s, 1H, CH), 6.76 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.67 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.63 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 2.46 ("t", 2H, J = 8.0, CH₂CH₂CH₃), 1.25 (sextett, 2H, J = 7.5, CH₂CH₂CH₃), 0.67 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 170°C): m/z (%) = 385 [M]⁺ (83), 356 (100), 330 (16), 193 (7), 131 (7), 77 (3)

IR (KBr, /cm): 3370(b, s), 2955/2928(m), 1886(w), 1613(m), 1562(m), 1449(m), 1388(b, m), 1229(b, s), 1170(m), 1098(w), 835(s)

CHN: berechnet: x0,75 H₂O: C: 75,26; H: 6,32; N: 3,51; gefunden: C: 75,45; H: 6,52; N: 3,64

8.1.2.3 Synthese der 1,2,4-Triaryl-3,5-dialkylpyrrole (Typ B)

Synthese von N-Methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-N-methylacetamid (75)

0,085 mol (15,62 g) 4-Methoxyphenylessigsäurechlorid (**1**) und 0,1 mol (10 g) N-Methoxy-N-methylammoniumchlorid werden in absolutem Dichlormethan gelöst/ suspendiert. Es wird auf 0°C gekühlt und 0,19 mol (15,6 mL) Pyridin zugetropft. Danach wird noch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Es werden 40 mL Wasser hinzugegeben und der Ansatz nacheinander mit 40 mL 2N HCl, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Es wird mit Natriumsulfatlösung getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Die Substanz wird sogleich in der nächsten Reaktion weiterverarbeitet.

$C_{11}H_{15}NO_3$ (209,24)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,08 mol (17,7 g), 100 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,1$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 7.21$ (d, 2H, $J = 8.7$, ArH), 6.85 (d, 2H, $J = 8.7$, ArH), 3.79 (s, 3H, ArOCH₃), 3.71 (s, 2H, CH₂O), 3.62 (s, 3H, NOCH₃), 3.19 (s, 3H, NCH₃)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 209 [M]⁺ (11), 148 (13), 121 (100), 78 (13)

Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)pentan-2-on (76)

Aus 0,06 mol (2,9 g) Magnesiumspänen und 0,06 mol (7,35 g) Brompropan wird in absolutem Ether das Grignardreagenz Propylmagnesiumbromid hergestellt. Dieses wird zu 0,02 mol (4,35 g) N-Methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-N-methylacetamid (**75**), gelöst in absolutem THF und mittels Eisbad auf 0°C abgekühlt, langsam hinzugegeben. Es wird drei Stunden bei 0°C und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird auf gekühlte 6N HCl gegeben und mit Ether ausgeschüttelt. Es wird mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, die Etherphase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft.

$C_{12}H_{16}O_2$ (192,25)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,01 mol (2,2 g), 54 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [$CDCl_3$] $\delta = 7.11$ (d, 2H, $J = 8.7$, ArH), 6.86 (d, 2H, $J = 8.7$, ArH), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.61 (s, 2H, ArCH₂O), 2.41 (t, 2H, $J = 7.3$, CH₂CH₂CH₃), 1.57 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0.87 (t, 3H, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 192 [M]⁺ (18), 135 (31), 121 (100), 77 (24)

IR (Film, /cm): 3417(b, w), 2962(s), 2934(s), 1711(s), 1611(m), 1512(s), 1463(m), 1364(w), 1300(m), 1249(s), 1178(m), 1124(m), 1035(s), 831(m)

Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)butanon (77)

Aluminiumchlorid wird in Dichlormethan gelöst, mittels Eisbad auf 0°C abgekühlt und Butyrylchlorid zugetropft. Es wird eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird bei 0°C Anisol in Dichlormethan zugetropft. Bei Raumtemperatur wird gerührt bis die Reaktion beendet ist (DC-Kontrolle). Es wird auf 0°C abgekühlt und Wasser hinzugegeben. Der Ansatz wird mit Dichlormethan ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft.

$C_{11}H_{14}O_2$ (178,23)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,076 mol (13,5 g), 97 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,7$

$^1\text{H-NMR}$: [CDCl_3] $\delta = 7.95$ (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 6.93 (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 2.90 (t, 2H, $J = 7.3$, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.57 (sextett, 2H, $J = 7.6$, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.00 (t, 3H, $J = 7.4$, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 178 [$\text{M}]^+$ (11), 150 (6), 135 (100), 107 (12)

Allgemeine Vorschrift zur Bromierung siehe Kapitel 8.1.2.1 "Synthese der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 1,4-Dialkyl-2,3,5-triarylpyrrole (Typ A)"

2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)propanon (78)

0,05 mol (8,2 g) 1-(4-Methoxyphenyl)propanon wird in 80 mL Ether absolut gelöst. Nachdem mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt wurde, wird 0,05 mol (2,6 mL) Brom langsam zugetropft.

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{BrO}_2$ (243,1)

grüne Kristalle, Schmp. 37°C

Ausbeute: 0,05 mol (12,1 g), 100 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,7$

$^1\text{H-NMR}$: [CDCl_3] $\delta = 8.02$ (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 6.96 (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 5.26 (q, 1H, $J = 6.6$, COBrHCH_3), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 1.89 (d, 2H, $J = 6.6$, COBrHCH_3)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 242 [$\text{M}]^+$ (2), 164 (12), 135 (100), 107 (19)

2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)butanon (79)

0,056 mol (10 g) 1-(4-Methoxyphenyl)propanon (**77**) wird in 80 mL Ether absolut gelöst. Nachdem mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt wurde, wird 0,056 mol (2,9 mL) Brom langsam zugetropft.

$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{BrO}_2$ (257,12)

blaugraue Kristalle, Schmp. 43°C

Ausbeute: 0,056 mol (14,4 g), 100 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,7$

$^1\text{H-NMR}$: [CDCl_3] $\delta = 8.00$ (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 6.95 (d, 2H, $J = 8.9$, ArH), 5.04 (t, 1H, $J = 7.1$, $\text{COBrHCH}_2\text{CH}_3$), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 2.17 (m, 2H, $\text{COBrHCH}_2\text{CH}_3$), 1.07 (t, 3H, $J = 7.3$, $\text{COBrHCH}_2\text{CH}_3$)

MS (EI, 35°C): m/z (%) = 256 [$\text{M}]^+$ (2), 177 (1), 135 (100), 121 (3)

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der 1,4-Diketone siehe Kapitel 8.1.2.1 "Synthese der 1-Alkyl-2,3,5-triarylpyrrole und 2,3,5-Triaryl-1,4-dialkylpyrrole (Typ A)"

1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-methylheptan-1,4-dion (80)

0,012 mol (2,3 g) 1-(4-Methoxyphenyl)pentan-2-on (**76**) wird in 80 mL absolutem THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C gebracht. 25 mL Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,013 mol in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird 0,013 mol (3,18 g) 2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)propanon (**78**) in absolutem THF gelöst zugetropft. Es wird gemäß der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet und säulenchromatographisch aufgereinigt.

$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_4$ (354,44)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,008 mol (2,9 g), 69 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,3$

MS (EI, 75°C): m/z (%) = 354 [$\text{M}]^+$ (8), 284 (2), 219 (6), 148 (4), 135 (100)

1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-ethylheptan-1,4-dion (81)

0,014 mol (2,7 g) 1-(4-Methoxyphenyl)pentan-2-on (**76**) wird in 80 mL absolutem THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C gebracht. 29 mL Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,015 mol in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird 0,015 mol (3,95 g) 2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)butanon (**79**) in absolutem THF gelöst zugetropft. Es wird gemäß der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet und säulenchromatographisch aufgereinigt.

$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_4$ (368,47)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,01 mol (3,7 g), 71%

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,3$

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 368 [M]⁺ (9), 298 (4), 233 (7), 191 (1), 135 (100)

1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-propylheptan-1,4-dion (82)

0,003 mol (0,6 g) 1-(4-Methoxyphenyl)pentan-2-on (**76**) wird in 25 mL absolutem THF gelöst und mit dem Kryostaten auf -78°C gebracht. 6,5 mL Kaliumhexamethyldisilazanlösung (0,0033 mol in Toluol) wird zugespritzt. Eine Stunde bei -78°C rühren, dann wird 0,003 mol (0,92 g) 2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)pentanon (**9**) in absolutem THF gelöst zugetropft. Es wird gemäß der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet und säulenchromatographisch aufgereinigt.

$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (382,49)

gelbes Öl

Ausbeute: 1,8 mmol (0,7 g), 59 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,3$

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 382 [M]⁺ (10), 312 (3), 247 (8), 135 (100), 121(10)

Allgemeine Vorschrift zur Cyclisierung der 1,3-Diaryl-1,4-dione zu 1,2,4-Triaryl-3,5-dialkylpyrrolen:

Das entsprechende 1,3-Diaryl-1,4-dion wird in Eisessig gelöst. Unter Rühren wird 4-Methoxybenzolamin portionsweise hinzugegeben. Es wird drei Stunden unter Schutzgasatmosphäre zum Sieden erhitzt und der Ansatz nach Abkühlen auf Eis gegeben. Mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung wird auf pH-Wert 8 eingestellt. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wird in Toluol gelöst und erwärmt. Nach Abfiltrieren fallen silbrige Kristalle aus, die verworfen werden. Es wird erneut das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat 6+1 chromatographiert.

1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-5-propyl-1H-pyrrol (83)

8,2 mmol (2,91 g) 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-methylheptan-1,4-dion (**80**) wird in 80 mL Eisessig gelöst. Unter Rühren wird 0,053 mol (6,6 g) 4-Methoxybenzolamin portionsweise hinzugegeben. Es wird drei Stunden unter Schutzgasatmosphäre zum Sieden erhitzt und der Ansatz nach Abkühlen auf Eis gegeben und nach der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet.

$\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{NO}_3$ (441,56)

gelbes Öl

Ausbeute: 1,18 mmol (520 mg), 14 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): $R_f = 0,5$

¹H-NMR: [CDCl_3] δ = 7.33 (d, 2H, $J = 8.6$, ArH), 7.08 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 7.03 (d, 2H, $J = 8.7$, ArH), 6.97 (d, 2H, $J = 8.7$, ArH), 6.82 (d, 2H, $J = 8.8$, ArH), 6.74 (d, 2H, $J = 8.7$, ArH), 3.87 (s, 3H,

161 8 Experimenteller Teil

OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.49 ("t", 2H, J = 7.6, CH₂CH₂CH₃), 2.05 (s, 2H, CH₃), 1.18 (sextett, 2H, J = 7,6, CH₂CH₂CH₃), 0.62 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 125°C): m/z (%) = 441 [M]⁺ (60), 412 (100), 385 (17), 220 (7), 135 (60)

IR (KBr, /cm): 3433(b, m), 2956(m), 2932(m), 2835(m), 2360(w), 1610(m), 1569(m), 1511(s), 1461(m), 1375(m), 1288(s), 1246(s), 1175(s), 1106(m), 1035(s), 828(m)

CHN: berechnet: x0,5 H₂O: C: 77,36; H: 7,16; N: 3,11; gefunden: C: 77,32; H: 7,11; N: 3,13

1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-ethyl-5-propyl-1H-pyrrol (84)

9,7 mmol (3,59 g) 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-ethylheptan-1,4-dion (**81**) wird in 80 mL Eisessig gelöst. Unter Rühren wird 0,063 mol (7,8 g) 4-Methoxybenzolamin portionsweise hinzugegeben. Es wird drei Stunden unter Schutzgasatmosphäre zum Sieden erhitzt und der Ansatz nach Abkühlen auf Eis gegeben und nach der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet.

C₃₀H₃₃NO₃ (455,59)

gelber Feststoff, Schmp. 96°C

Ausbeute: 0,15 mmol (70 mg), 2 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.32 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 7.06 (m, 4H, ArH), 6.96 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.80 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.74 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.49 (q, 2H, J = 7.5, CH₂CH₃), 2.43 ("t", 2H, J = 7.6, CH₂CH₂CH₃), 1.16 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 0.86 (t, 3H, J = 7.4, CH₂CH₃), 0.61 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 120°C): m/z (%) = 455 [M]⁺ (80), 426 (100), 399 (19), 227 (10), 135 (32)

IR (KBr, /cm): 3438(b, m), 2959(m), 2932(m), 1610(m), 1573(w), 1511(s), 1461(m), 1380(w), 1288(m), 1246(s), 1177(m), 1106(w), 1033(m), 838(w), 818(w)

CHN: berechnet: x0,5 H₂O: C: 77,56; H: 7,38; N: 3,02; gefunden: C: 77,62; H: 7,44; N: 2,97

1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3,5-dipropyl-1H-pyrrol (85)

6,5 mmol (2 g) 1,3-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-propylheptan-1,4-dion (**82**) wird in 80 mL Eisessig gelöst. Unter Rühren wird 0,042 mol (5,2 g) 4-Methoxybenzolamin portionsweise hinzugegeben. Es wird drei Stunden unter Schutzgasatmosphäre zum Sieden erhitzt und der Ansatz nach Abkühlen auf Eis gegeben und nach der allgemeinen Vorschrift aufgearbeitet.

C₃₁H₃₅NO₃ (469,61)

gelbes Öl

Ausbeute: 0,3 mmol (138 mg), 6 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.30 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 7.03 (m, 4H, ArH), 6.95 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.78 (d, 2H, J = 8.9, ArH), 6.72 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 2.39 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃ und CH₂CH₂CH₃), 1.18 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃ und CH₂CH₂CH₃), 0.66 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃), 0.59 (t, 3H, J = 7.4, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 125°C): m/z (%) = 469 [M]⁺ (9), 440 (29), 413 (10), 234 (6), 135 (100)

IR (Film, /cm): 3424(b, w), 3019(s), 2961(m), 2872(w), 2400(w), 1708(w), 1608(w), 1511(s), 1465(m), 1246(s), 1216(s), 1177(m), 1034(m), 834(m), 771(s), 669(s)

CHN: berechnet: x0,25 H₂O: C: 78,53; H: 7,55; N: 2,95; gefunden: C: 78,45; H: 7,93; N: 2,65

Allgemeine Vorschrift zur Entschützung der 1,2,4-Triaryl-3,5-Dialkylpyrrole mit Bortribromid:

Das entsprechende 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-pyrrol wird unter Schutzbegasung in 15 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Mittels Eisbad wird der Ansatz auf 0°C gekühlt und langsam Bortribromid gelöst in 5 mL absolutem Dichlormethan zugetropft. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt und am nächsten Tag auf Eis gegossen und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das

Lösungsmittel bei Raumtemperatur abgedampft. Die Aufreinigung erfolgt über Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 9+1

1,2,4-Tris-(4-hydroxyphenyl)-3-methyl-5-propyl-1H-pyrrol (86)

0,71 mmol (313 mg) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-methyl-5-propyl-1H-pyrrol (**83**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 3,5 mmol (888 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

$C_{26}H_{25}NO_3$ (399,48)

roter Feststoff, Schmp. 86°C

Ausbeute: 0,18 mmol (70 mg), 25 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 9.55$ (s, 1H, OH), 9.28 (s, 1H, OH), 9.26 (s, 1H, OH), 7.09 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.85 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.78 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.68 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.57 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 2.35 ("t", 2H, J = 7.8, $CH_2CH_2CH_3$), 1.87 (s, 3H, CH_3), 1.08 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_3$), 0.53 (t, 3H, J = 7.3, $CH_2CH_2CH_3$)

MS (EI, 50°C): m/z (%) = 399 [M]⁺ (54), 370 (100), 343 (16), 262 (6)

IR (KBr, /cm): 3393(b, s), 2959(m), 1889(w), 1700(s), 1595(m), 1512(s), 1443(s), 1374(s), 1261(b, s), 1171(s), 1101(m), 1044(m), 830(s)

CHN: berechnet: x2 H₂O: C: 71,71; H: 6,71; N: 3,22; gefunden: C: 71,31; H: 6,68; N: 2,90

1,2,4-Tris-(4-hydroxyphenyl)-3-ethyl-5-propyl-1H-pyrrol (87)

0,39 mmol (178 mg) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3-ethyl-5-propyl-1H-pyrrol (**84**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 2,0 mmol (489 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

$C_{27}H_{27}NO_3$ (413,51)

orangeroter Feststoff, Schmp. 121°C

Ausbeute: 0,11 mmol (45 mg), 28 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 9.52$ (s, 1H, OH), 9.28 (s, 1H, OH), 9.26 (s, 1H, OH), 7.09 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.93 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.87 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.77 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.66 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.57 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 2.30 (m, 4H, CH_2CH_3 und $CH_2CH_2CH_3$), 1.06 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_3$), 0.73 (t, 3H, J = 7.3, $CH_2CH_2CH_3$), 0.53 (t, 3H, J = 7.3, $CH_2CH_2CH_3$)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 413 [M]⁺ (61), 384 (100), 357 (18), 206 (4)

IR (KBr, /cm): 3403(b, m), 2960(m), 1891(w), 1610(m), 1512(s), 1443(m), 1374(m), 1342(w), 1230(b, m), 1171(m), 1101(w), 1013(w), 830(m)

CHN: berechnet: x2,25 H₂O: C: 71,42; H: 6,99; N: 3,09; gefunden: C: 71,31; H: 7,04; N: 3,08

1,2,4-Tris-(4-hydroxyphenyl)-3,5-dipropyl-1H-pyrrol (88)

0,32 mmol (150 mg) 1,2,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-3,5-dipropyl-1H-pyrrol (**85**) wird in 15 mL Dichlormethan gelöst. 1,6 mmol (400 mg) Bortribromid gelöst in 5 mL Dichlormethan wird zugetropft.

$C_{28}H_{29}NO_3$ (427,53)

roter Feststoff, Schmp. 115°C

Ausbeute: 0,023 mmol (10 mg), 7 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): $R_f = 0,6$

¹H-NMR: [(D6)DMSO] $\delta = 9.52$ (s, 1H, OH), 9.27 (s, 1H, OH), 9.25 (s, 1H, OH), 7.07 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.91 (d, 2H, J = 8.6, ArH), 6.84 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 6.75 (d, 2H, J = 8.4, ArH), 6.64 (d,

2H, J = 8.6, ArH), 6.55 (d, 2H, J = 8.5, ArH), 2,27 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃ und CH₂CH₂CH₃), 1.06 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃ und CH₂CH₂CH₃), 0.57 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃), 0.51 (t, 3H, J = 7.3, CH₂CH₂CH₃)

MS (EI, 170°C): m/z (%) = 427 [M]⁺ (64), 398 (100), 371 (17), 213 (5)

IR (KBr, /cm): 3399(b, m), 2957(m), 1889(w), 1611(m), 1512(s), 1444(m), 1376(m), 1342(w), 1229(b, m), 1170(m), 1100(w), 1012(w), 828(m)

CHN: berechnet: x1,5 H₂O: C: 73,98; H: 7,10; N: 3,08; gefunden: C: 74,23; H: 7,07; N: 2,70

8.1.2.4 Synthese der 1,3,4-Triarylpyrrole (Typ C)

Synthese von 3-(Dimethylamino)-1,2-bis-(4-methoxyphenyl)-prop-2-en-1-on (**89**)

0,01 mol (2,74 g) 1,2-Bis-(4-methoxyphenyl)-ethanon (**2**) wird in 54 mL absolutem Toluol gelöst, 0,043 mol (5,69 mL) Dimethylformamid-dimethylacetal wird zugetropft. Unter Schutzgas wird 16 Stunden lang zum Sieden erhitzt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird aus Hexan/Ethylacetat 4+1 umkristallisiert.

C₁₉H₂₁NO₃ (311,37)

knallgelbes Pulver, Schmp. 122°C

Ausbeute: 0,004 mol (1,16 g), 43 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.42 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.36 (s, 1H, NCH), 7.06 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.91 (d, 2H, J = 8.7, ArH), 6.76 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 3.79 (s, 6H, OCH₃), 2.74 (s, 6H, NCH₃)

MS (EI, 75°C): m/z (%) = 311 [M]⁺ (19), 294 (20), 135 (100), 121 (10), 105 (16), 92 (10), 77 (21)

IR (KBr, /cm): 3431(b, w), 2964(m), 2934(w), 2835(w), 1904(w), 1603(s), 1585(s), 1560(s), 1506(s), 1457/1440(m), 1384(m), 1296(s), 1250/1293(s), 1171(m), 1083(m), 1025(m), 938(m), 885(s), 844(m), 766(m), 708(w), 636(w)

Synthese von Ethyl-3,4-bis-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol-2-carboxylat (**90**)

0,015 mol (5 g) 3-(Dimethylamino)-1,2-bis-(4-methoxyphenyl)-prop-2-en-1-on (**89**) wird in drei mL Eisessig gelöst. 0,015 mol (3,56 g) Diethyl 2-aminomalonat-hydrochlorid wird zugegeben. Es wird eine Stunde unter Schutzgas bei Raumtemperatur gerührt, dann werden 77 mL Eisessig zugefügt und zwölf Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Abkühlen lassen, der Eisessig wird abgedampft. Der Rückstand wird mit Dichlormethan aufgenommen und zuerst mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und dann mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Mit Natriumsulfat wird getrocknet und dann das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wird mit Petrolether/Ethylacetat 4+1 an Kieselgel chromatographiert.

C₂₁H₂₁NO₄ (351,4)

gelbes Pulver, Schmp. 131°C

Ausbeute: 0,006 mol (2,1 g), 40 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 9.13 (s, 1H, NH), 7.19 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.03 (m, 3H, ArH, NCH), 6.84 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.75 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 4.20 (q, 2H, J = 7.1, COCH₂CH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 1.19 (t, 3H, J = 7.1, COCH₂CH₃)

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 351 [M]⁺ (45), 305 (100), 290 (14), 262 (8), 191 (10), 121 (4)

IR (KBr, /cm): 3312(b, s), 2959/2933(m), 2835(m), 1889(w), 1681(b, s), 1613(s), 1537(s), 1493(s), 1463(s), 1422(s), 1380(s), 1350(m), 1245(b, s), 1180(s), 1132(s), 1033(s), 940(w), 835(s), 798(m), 778(m), 694(w), 611(m)

Synthese von 3,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrol (**91**)

0,0043 mol (1,5 g) Ethyl-3,4-bis-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrrol-2-carboxylat (**90**) und 0,021 mol (1,2 g) KOH werden in 48 mL Ethylenglycol gelöst und unter Rückfluss eine Stunde lang zum Sieden erhitzt. Die Reaktion findet unter Lichtausschluss und Schutzgasatmosphäre statt. Nach Abkühlen wird der Ansatz in Wasser gegossen. Das Produkt fällt aus, wird abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser einen neutralen pH-Wert zeigt.

C₁₈H₁₇NO₂ (279,33)

hellbraunes Pulver, Schmp. 110°C

Ausbeute: 0,0023 mol (0,65 g), 55 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 8.23 (s, 1H, NH), 7.19 (d, 4H, J = 8.8, ArH), 6.85 (d, 2H, J = 2.7, CHNCH), 6.82 (d, 4H, J = 8.8, ArH), 3.80 (s, 6H, OCH₃)

MS (EI, 100°C): m/z (%) = 279 [M]⁺ (100), 264 (28), 249 (8), 192 (9), 165 (7), 132 (5)

IR (KBr, /cm): 3452(s), 2976(w), 2842(w), 2026(w), 1901(w), 1610(m), 1542(s), 1500(s), 1470/1459(m), 1288(s), 1242(s), 1183(s), 1105(m), 1057(m), 1025(s), 946(m), 892(m), 840(s), 790(s), 633(m)

Synthese von 1,3,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**92**)

2 mmol (559 mg) 3,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**91**) wird mit 2,2 mmol (515 mg) Iodanisol, 0,4 mmol (46 mg) L-Prolin, 4 mmol (553 mg) Kaliumcarbonat und 0,2 mmol (38 mg) Kupferiodid in einem trockenen Schlenkcolben unter Schutzgasatmosphäre in absolutem DMF gelöst und 72 Stunden unter Rückfluss auf 140°C erhitzt. Nach Abkühlen wird die Reaktion durch Zugabe von Ethylacetat und Wasser gestoppt, mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird abgedampft und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat 8+1 gereinigt.

C₂₅H₂₃NO₃ (385,46)

gelber Feststoff, Schmp. 98°C

Ausbeute: 0,0012 mol (0,47 g), 60 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Petrolether/Ethylacetat 4+1): R_f = 0,5

¹H-NMR: [CDCl₃] δ = 7.38 (d, 2H, J = 9.0, ArH), 7.23 (d, 4H, J = 8.8, ArH), 7.05 (s, 2H, CHNCH), 6.97 (d, 2H, J = 9.0, ArH), 7.23 (d, 4H, J = 8.8, ArH), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 6H, OCH₃)

MS (EI, 150°C): m/z (%) = 385 [M]⁺ (100), 370 (17), 237 (10), 192 (10), 77 (2)

IR (KBr, /cm): 3433(b, w), 2928(w), 2834(w), 1609(w), 1542(m), 1516(m), 1500(m), 1462(m), 1399(w), 1286(m), 1244(s), 1177(m), 1108(w), 1031(m), 949(w), 834(m), 783(m), 644(w)

CHN: berechnet: C: 77,90; H: 6,01; N: 3,63; gefunden: C: 78,18; H: 6,16; N: 3,26

Synthese von 1,3,4-Tris-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**93**)

0,84 mmol (325 mg) 1,3,4-Tris-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**92**) wird unter Schutzgasatmosphäre in 15 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Mittels Eisbad wird der Ansatz auf 0°C gekühlt und langsam 4,2 mmol (1,06 g) Bortribromid gelöst in 5 mL absolutem Dichlormethan zugetropft. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt und am nächsten Tag auf Eis gegossen und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur abgedampft. Die Aufreinigung erfolgt über Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 9+1

C₂₂H₁₇NO₃ (343,38)

hellbeiges Pulver, Schmp. 120°C

Ausbeute: 0,41 mmol (0,14 g), 47 %

DC: (Kieselgel, Fließmittel: Dichlormethan/Methanol 9+1): R_f = 0,6

¹H-NMR: [(D₆)DMSO] δ = 9.50 (s, 1H, OH), 9.24 (s, 2H, OH), 7.43 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 7.04 (d, 4H, J = 8.5, ArH), 6.83 (d, 2H, J = 8.8, ArH), 6.66 (d, 4H, J = 8.5, ArH)

MS (EI, 175°C): m/z (%) = 343 [M]⁺ (100), 224 (18), 171(6), 146 (9)

IR (KBr, /cm): 3391(b, m), 2925(w), 1886(w), 1612(w), 1543(s), 1520(s), 1500(m), 1401(m), 1233(b, s), 1171(m), 1101(m), 1056(w), 1012(w), 953(w), 833(m), 785(m)

CHN: berechnet: x0,6 H₂O: C: 74,60; H: 5,18; N: 3,94; gefunden: C: 74,35; H: 5,28; N: 3,94

8.2 Biochemische und pharmakologische Methoden

8.2.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

Verwendete Geräte:

8-Kanalabsauger	Integra Biosciences, Göttingen
8/12-Kanalpipette 30-300 µL Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
Analysenwaage Sartorius BP2110	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav Systec 2540 EL	Systec GmbH, Wettenberg
Brutschrank HERAcell 240 CO ₂ Incubator	Heraeus, Hanau
Labortiefkühltruhe Profiline Taurus PLTA	National Lab, Mölln
Luminometer Viktor ² , 1420 Multilabel Counter	Wallac Perkin Elmer, Turku/FIN
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroplattenreader FLASHScan S12	Analytik Jena, Jena
Mikroskop Axiovert 25C	Carl Zeiss, Jena
Neubauerzählkammer	Carl Zeiss, Jena
pH-Meter 761 Calimetric	Knirk
Pipetten 1000 µL, 200 µL, 20 µL, verstellbar	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe PIPETBOY acu	Integra Biosciences, Chur/CH
Schüttelmaschine Gerhardt LS10	Gerhardt, Bonn
Schüttelmaschine TiMix, Haube TH15	Edmund Bühler, Hechingen
Sterilfilterhalter SM 16254	Sartorius AG, Göttingen
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus, Hanau
Transferpipette 2-20 µL	Brand GmbH, Wertheim
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK106	Bandelin, Berlin
Vakuumgerät Microgon easy-load Masterflex	Microgon, Laguna Hills/USA
Vakuumpumpe KNF Neuberger Laboport	KNF, Freiburg
Vortex Genie2	Scientific Industries NY/USA
Wasserbad Haake fisons W26	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge Eppendorf centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg

Verbrauchsmaterialien:

96-Well-Mikrotiterplatten (klar), steril	Nunc, Roskilde/DK
96-Well-Mikrotiterplatten (weiß), steril	Nunc, Roskilde/DK
Einmalkanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kimtech wipes	Kimberley-Clark, Surrey/GB
Membranfilter	Sartorius AG, Göttingen
Parafilm	Peching Plastic Packaging, Menasha/USA
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 200 und 1000 µL	Sarstedt AG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Sarstedt AG, Nümbrecht
Serologische Pipetten; 2, 5, 10, 25 mL; steril	Sarstedt AG, Nümbrecht
Vorfilter	Schleicher&Schüll Microscience GmbH, Dassel
Zellkulturflaschen 25cm ²	Sarstedt AG, Nümbrecht

Zellkulturflaschen 75cm²
Zentrifugenröhrchen, 15; 50 mL

TPP, CH
Sarstedt AG, Nümbrecht

Reagenzien und Lösungen:

17β-Estradiol
Cell-Lysis Buffer
Dextran 60 (MG: 60000 - 90000)
DMEM mit/ohne Phenolrot, 4,5 % Glucose
DMSO/DMF p.a.
Ethanol 96% (vergällt und unvergällt)
FCS
Glutardialdehyd, 25%ige wässrige Lösung
Kristallviolett p.a.
Luciferaseassay-Reagenz
Norit A Aktivkohle
PBS: KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄·2H₂O, KCl
Trypsin

Fluka, Buchs/CH
Promega, Mannheim
Sigma, Deisenhofen
PAA Laboratories GmbH, Pasching/AT
Fluka, Buchs/CH
Merck, Darmstadt
Biochrom AG, Berlin
Merck-Schuch., Hohenbrunn
Roth, Karlsruhe
Promega, Mannheim
Serva, Heidelberg
Roth, Karlsruhe
ICN, Eschwege

Kristallviolettlösung 0,02 %
Glutardialdehydlösung 1%

100 mg Kristallviolett in 500 mL Aqua dem. lösen
12,5 mL PBS und 0,5 mL Glutardialdehydlösung
25 %

PBS

KH₂PO₄, 0,2 g
NaCl, 8 g
Na₂HPO₄·2H₂O, 1,44 g und
KCl 0,2 g
in 1 L Aqua bidest. lösen. Bei Bedarf
autoklavieren.

ct-FCS

5% Norit A, 0.05% Dextran 60 in Tris-Puffer 200
mL (pH 7.5), abzentrifugieren, Pellet mit 500 mL
FCS 3h bei 4°C rühren und abfiltrieren, genauere
Anweisung siehe⁹⁸

Trypsinlösung

0.05% Trypsin, 0.02% EDTA in PBS (steril) lösen
und Sterilfiltrieren

Tris-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.0 mM EDTA, 3.0 mM
NaN₃

Zelllinien:

MCF-7
MCF-7-2a
Vektor ERE_{wc}luc
MDA-MB-231

8.2.2 Allgemeine Kultivierungsbedingungen

8.2.2.1 Passagieren und Mediumwechsel

Alle Arbeiten bis zum Abstoppen werden in einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Es werden MCF-7, MCF-7/2a und MDA MB 231-Zellen kultiviert.

Als Medium wird für alle drei Zelllinien DMEM mit 4,5 g/L Glucose, 15 g/L Phenolrot und 5 % FCS verwendet.

167 8 Experimenteller Teil

MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen werden ein Mal pro Woche passagiert, MCF-7-2a zweimal. Dazu wird das Medium aus der 25 cm² Zellkulturflasche abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsinlösung 0,05% kurz geschwenkt. Nach Absaugen des Trypsins werden die Zellen für etwa zwei Minuten in den Brutschrank überführt. Danach lassen die Zellen sich mit frischem Medium von der Zellkulturflaschenwand herunterspülen und werden durch auf- und abpipettieren vereinzelt. In eine mit Medium vorbereitete Zellkulturflasche wird bei MCF-7-Zellen 0,4 mL Zellsuspension und bei MDA MB 231-Zellen 0,1 mL Zellsuspension eingetropfelt. Drei bis vier Tage nach Passage wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wird das alte Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

8.2.3 Testung auf Hemmung der Zellproliferation

8.2.3.1 Aussaat der Zellen

Die Zellen werden geerntet wenn sie eine 70-80%ige Konfluenz zeigen. Es wird vorgegangen wie beim Mediumwechsel. Nachdem die Zellen vereinzelt worden sind werden sie mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dabei können tote Zellen mit Trypanblaulösung angefärbt werden; diese werden dann nicht mitgezählt.

Für den zeitabhängigen Test werden 750 MCF-7-Zellen in 100 µL Medium; also pro Vertiefung einer 96-Lochplatte benötigt; für die Bestimmung der IC₅₀ 1000 Zellen pro Vertiefung (MCF-7-Zellen). Für MDA-Zellen benötigt man bei der IC₅₀-Bestimmung 500 Zellen in 100 µL.

Eine für die geplante Anzahl 96-Lochplatten ausreichende Menge Zellsuspension wird mit Medium auf die gewünschte Zellmenge herunterverdünnt.

Mit einer Mehrkanalpipette werden nun je 100 µL Zellsuspension in die Vertiefungen pipettiert. Man lässt die Zellen drei Tage im Brutschrank anwachsen.

8.2.3.2 Substanzzugabe

Für die IC₅₀ werden in DMSO Verdünnungsreihen mit 50; 25; 12,5; 6,25 und 3,13 mmol/L Konzentration der Testsubstanz hergestellt. Von diesen Verdünnungen werden je 10 µL mit 5 mL Medium im tip-tub gemischt und 100 µL dieser Lösung nach folgendem Pipettierschema auf die 96-Lochplatte pipettiert:

(Konzentrationsangaben jetzt in µmol/L)

	Substanz 1						Substanz 2				
DMSO	3,13	6,25	12,5	25	50	DMSO	3,13	6,25	12,5	25	50

In Reihe eins und sieben wird nur 100 µL Medium mit 0,2 % Lösungsmittel (DMSO; für Cisplatin DMF) als Negativkontrolle pipettiert.

Als Vergleichssubstanz wird Cisplatin in den Konzentrationen 10; 5; 2,5; 1,25 und 0,63 mmol/L verwendet.

So können zwei Substanzen mit je acht Werten pro Verdünnung auf einer Platte getestet werden.

Am Ende der Substanzzugabe wird eine Platte (ohne Substanzlösung) abgestoppt wie weiter unten beschrieben. Diese Platte dient zur Information, wie viele Zellen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe vorhanden waren.

Für den zeitabhängigen Cytotoxizitätstest werden in DMSO Verdünnungsreihen mit 10, 5 und 1 mmol/L Konzentration der Testsubstanz hergestellt. Von diesen Verdünnungen werden je 10 µL mit 5 mL Medium im tip-tub gemischt und 100 µL dieser Lösung nach folgendem Pipettierschema auf je 5 96-Lochplatten pipettiert:

(Konzentrationsangaben jetzt in µmol/L)

Cisplatin			Substanz 1			Substanz 2					
0,5	1	5	1	5	10	1	5	10	DMSO	DMF	

In Reihe zehnte und elfte wird nur 100 µL Medium mit 0,2 % Lösungsmittel (DMSO; für Cisplatin DMF) als Negativkontrolle pipettiert.

Als Vergleichssubstanz wird Cisplatin in den Konzentrationen 5, 1 und 0,5 mmol/L verwendet.

So können drei Substanzen mit je acht Werten pro Verdünnung auf einer Platte getestet werden.

Am Ende der Substanzzugabe wird eine Platte (ohne Substanzlösung) abgestoppt wie weiter unten beschrieben. Diese Platte dient zur Information, wie viele Zellen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe vorhanden waren.

8.2.3.3 Abstoppen des Zelltests

Bei der IC₅₀-Bestimmung mit MCF-7-Zellen wird nach 96 Stunden abgestoppt; bei MDA-Zellen nach 72 Stunden.

Dazu wird das Medium abgesaugt und je 100 µL Abstopplösung (1% Glutardialdehyd in PBS) in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer halben Stunde wird die Abstopplösung entfernt und 150 µL PBS in die Vertiefungen pipettiert. So können die Zellen etwa zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Beim zeitabhängigen Cytotoxizitätstest wird je eine Platte nach 72, 120, 144, 168 und 216 Stunden abgestoppt wie beim IC₅₀-Test beschrieben.

8.2.3.4 Färben und Auswertung

Das PBS wird entfernt und pro Vertiefung 100 µL Kristallviolettlösung (0,02%ig) pipettiert. Nach einer halben Stunde wird die Lösung entfernt und die Platten in Wasser gewaschen. Die Platten bleiben etwa 15 Minuten im Wasser; danach werden sie gut getrocknet. Anschließend wird pro Vertiefung 180 µL 70%iger Ethanol pipettiert. Nachdem die Platten für etwa zwei bis vier Stunden auf die Schüttelmaschine gelegt wurden können sie vermessen werden.

Die erhaltenen Werte werden auf die Lösungsmittelkontrolle und auf die Ausgangszellmasse bezogen:

$$T/C_{\text{corr}} [\%] = \frac{T-C_0}{C-C_0} \cdot 100$$

Abbildung 8.1: T/C corr:

T: Mittelwert der Extinktionen der jeweiligen Substanzverdünnungen eines Abstopzeitpunkts

C: Mittelwert der Extinktionen der Lösungsmittelblindwerte eines Abstopzeitpunkts

C₀: Mittelwert der Extinktionen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe (t₀)

Die Darstellung erfolgt in Abhängigkeit von der Zeit.

8.2.4 Luciferaseassay für Estrogenität und Antiestrogenität

8.2.4.1 Kultivierung und Aussaat der Zellen

Die Zellen werden kultiviert wie bei den allgemeinen Kultivierungsbedingungen beschrieben. Zusätzlich wird immer 50 µL/ 5mL Medium Geneticinlösung in die Kulturflasche pipettiert.

Vier Tage vor Aussaat eines Tests werden die Zellen auf Medium mit 5% ct-FCS ohne Phenolrot passagiert.

Es werden 10000 MCF-7-2a Zellen pro well in weiße Platten ausgesät wie weiter oben beschrieben.

8.2.4.2 Substanzzugabe

Für die Belegung der weißen Platten werden Verdünnungsreihen auf klaren Platten folgendermaßen hergestellt :

Von Estradiol wird eine Stammlösung mit 0,1 mmol/L in DMSO hergestellt, von den Testsubstanzen Stammlösungen mit 10 mmol/L in DMSO.

In eine klare Platte wird in Reihe A je 90 µL DMEM sine pipettiert; in alle weiteren Reihen 180 µL. In die erste Reihe wird dann 10 µL Stammlösung von Estradiol in die ersten vier Vertiefungen pipettiert, 10 µL Substanz 1 in die nächsten vier Vertiefungen und so weiter. Mit einer Zwölfkanalpipette werden die Lösungen gut durchmischt und 20 µL der Lösung in die nächste Reihe überführt. Nach Wechseln der Pipettenspitzen wird wieder gut gemischt und wiederum in die folgende Reihe überführt und so weiter. Beginnend mit der geringsten Konzentration werden dann je 20 µL der Verdünnungsplatte in die entsprechende Vertiefung der weißen Platte pipettiert.

In alle Vertiefungen außer Antiestrogenität und Positiv- und Negativkontrolle werden zuerst 80 µL DMEM mit 5% ct-FCS ohne Phenolrot pipettiert.

Die 96-Lochplatten werden folgendermaßen belegt:

Die Konzentrationsangaben sind in mol/L.

Positivkontrolle (Medium mit Estradiol)				Negativkontrolle (Medium mit DMSO)			
Estradiol	10 ⁻⁷		Substanz 1	10 ⁻⁵		Substanz 2	10 ⁻⁵
	10 ⁻⁸			10 ⁻⁶			10 ⁻⁶
	10 ⁻⁹			10 ⁻⁷			10 ⁻⁷
	10 ⁻¹⁰			10 ⁻⁸			10 ⁻⁸
	10 ⁻¹¹			10 ⁻⁹			10 ⁻⁹
	10 ⁻¹²			10 ⁻¹⁰			10 ⁻¹⁰
	10 ⁻¹³			10 ⁻¹¹			10 ⁻¹¹

So ist es möglich, auf einer Platte drei Substanzen in je sieben Konzentrationen mit je vier Werten zu bestimmen.

Für die Testung der Antiestrogenität werden die gleichen Verdünnungsreihen benutzt. Statt 80 µL DMEM wird jedoch 80 µL Lösung der Positivkontrolle (siehe unten) hinzupipettiert.

Für die Positivkontrolle wird eine $3 \cdot 10^{-6}$ molare Estradiollösung hergestellt und hiervon 16,5 µL in 20 mL DMEM mit ct-FCS ohne Phenolrot gelöst (Endkonzentration: $2,5 \cdot 10^{-9}$ M). In die sechs Vertiefungen der Positivkontrolle werden von dieser Lösung je 80 µL pipettiert.

Für die Negativkontrolle werden 80 µL DMEM pipettiert.

In alle zwölf Vertiefungen der ersten Reihe der weißen Platten werden 20 µL DMEM mit einem Prozent DMSO pipettiert.

Die weißen Platten bleiben bis zum Abstoppen 50 Stunden im Brutschrank.

8.2.4.3 Abstoppen des Zelltests

Nach Beendigung der Inkubation wird das Medium abgesaugt und je 50 µL cell lysis buffer in die Vertiefungen pipettiert. Die Zellen werden eine halbe Stunde auf der Schüttelmaschine lysiert. Danach kann mit einem Luminometer die Lumineszenz vermessen werden.

8.2.4.4 Auswertung

Die Positivkontrolle wird gleich 100 % gesetzt, die Negativkontrolle gleich Null. Alle erhaltenen Werte werden in Bezug dazu gesetzt.

8.2.5 Testung auf Hemmung der Cyclooxygenase

Von den Testsubstanzen werden 10 mmol/L und 1mmol/L Stammlösungen in DMSO hergestellt. 400 µL der MDA-MB-231-Zellsuspension einer Passage werden mit 40 mL DMEM mit 5 % FCS verdünnt und je 500 µL davon in 3 24-Lochplatten verteilt. Diese Platten werden für etwa eine Woche im Brutschrank inkubiert, bis 70 % Konfluenz erreicht ist. Das alte Medium wird abgesaugt und durch 500 µL neues Medium ersetzt. In diesem neuen Medium sind 0,1 % der jeweiligen Testsubstanzstammlösung bzw. für die Kontrolle 0,1 % DMSO enthalten. Die Platten werden für 23 h weiter im Brutschrank inkubiert. Eine 1000 mmol/L Arachidonsäurelösung wird mit DMEM 1/1000 verdünnt. Durch Zugabe von 50 µL dieser Lösung zum Testmedium wird die COX stimuliert. Nach insgesamt 24 h werden je 200 µL Medium pro *well* entnommen und in Eppendorf-Cups überführt. Dann wird das verbliebene Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Mit den Zellen wird eine Bradford-Proteinbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse werden auf die Proteinmenge bezogen.

Die Messung der Hemmung der COX erfolgt in 96-Lochplatten mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) durch Bestimmung der Menge an PGE₂. Es handelt sich hierbei um ein Testkit der Firma Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA (Katalognummer: 514010.1). Die Durchführung erfolgte anhand der beigelegten Beschreibung. Es wird eine Standardkurve mittels der acht Standard-PGE₂-Lösungen aufgenommen (50 µL pro Vertiefung). Die Testlösungen werden 1:25 mit dem beiliegenden ELISA-Puffer verdünnt und von dieser Verdünnung je 50 µL pro Vertiefung pipettiert. Die Messung erfolgt nach Zugabe des beiliegenden Ellman's Reagenz UV/Vis-photometrisch bei 405 bis 420 nm.

8.3 HPLC-Methode zur Untersuchung der Stabilität

8.3.1 HPLC-System

HPLC-Autosampler 565	Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn
HPLC-Pumpe 522	Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn
HPLC-UV-Diodenarray-Detektor 540	Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn
Kroma System 2000 Software	Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn
Trennsäule mit Vorsäule	Eurospher 100-5 C18, 250x4 mm, Knauer GmbH, Berlin

8.3.2 Geräte zur Inkubation der Proben

Temperaturregler Thermo Haake C10	Haake, Karlsruhe
Wasserbad Thermo Haake P5	Haake, Karlsruhe

Für den Versuch mit Verbindung **72** unter Brutschrankbedingungen wurden die Proben in Zellkulturflaschen in den Brutschrank gelegt.

8.3.3 Mobile Phase

Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus zwei Komponenten verwendet.

Komponente A: Aqua bidest. (30 %)

Komponente B: Methanol (70 %)

8.3.4 Versuchsbedingungen

Es wurden 10^{-2} molare methanolische Stammlösungen hergestellt, welche mit PBS auf $4,3 \cdot 10^{-4}$ mol/L verdünnt wurden. Löste sich die Verbindung in dieser Verdünnung nicht, wurde Methanol zugetropft. Die Lösung wurde sofort in das HPLC-System injiziert. Danach wurden die Proben bei 37°C im Wasserbad inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 24 h, nach 216 h und an 5 Zeitpunkten dazwischen) erneut vermessen.

Detektionswellenlänge: 275 nm

Flussrate: 0.8 mL/min

Injektionsvolumen: 20 µL

Temperatur: Raumtemperatur

8.3.5 LC-MS

Für die LC-MS-Untersuchungen wurden Gradienten, ebenfalls bestehend aus Methanol/Wassergemischen, bei einer Flußrate von 0,4 mL/min gefahren. Die Substanzen wurden hierfür allerdings nur in Methanol gelöst. Die Gradienten waren für die verschiedenen Verbindungen unterschiedlich:

Verbindung **54**: 10 min 60% Methanol, in 23 min auf 70% Methanol

Verbindungen **74** und **72**: 10 min 55% Methanol, in 23 min auf 70% Methanol

Verbindung **88**: 10 min 60% Methanol, in 23 min auf 70% Methanol

Massenspektrometer:

Die Proben wurden an einem Agilent 6210 ESI-TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA vermessen. Die Flußrate wurde auf 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ eingestellt, Spray Spannung auf 4 kV. Badegasflußrate: 15 psi (1 bar). Alle weiteren Parameter wurden so eingestellt, dass die größte Menge $[\text{M}+\text{H}]^+$ detektiert werden konnte.

(ESI-TOF = electrospray ionization - time of flight)

8.4 UV/Vis-Messungen und Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Für die UV/Vis-Messungen wurde die entsprechende Substanz in Methanol gelöst und so lange verdünnt, bis eine Absorption im Lambert-Beerschen Bereich vorlag. Es wurde ein Spektrum von 200 bis 500 nm aufgenommen.

Unter etwa 230 nm wird die Eigenabsorption von Methanol so stark, dass keine Messung der Absorption der Verbindungen mehr möglich ist, daher hört die Darstellung dort auf. Es wurde die Absorption des Lösungsmittels (Methanol) von der Absorption der Substanzlösung abgezogen, so dass die in den Diagrammen gezeigte Absorption die der reinen Substanz ist.

Für die Bestimmung der Sättigungslöslichkeit wurde der jeweilige Feststoff in eine Lösung von DMEM sine mit 0,1 % DMSO in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde für eine halbe Stunde ins Ultraschallbad gehängt und dann abkühlen gelassen. Es wurde darauf geachtet, dass noch ungelöste Substanz vorhanden war. Die Reaktionsgefäße wurden bei 4500 g für 4 min abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Überstand wurde mittels UV-Spektrometer vermessen und mit PBS mindestens dreimal 1+1 verdünnt, damit DMEM nicht mehr durch seine Absorption störte (siehe Abbildung). Außerdem wurde eine Kalibriergerade durch Lösen in Methanol und Verdünnung mit PBS erstellt. Es befanden sich jeweils fünf bis sechs Konzentrationen im Lambert-Beerschen Bereich.

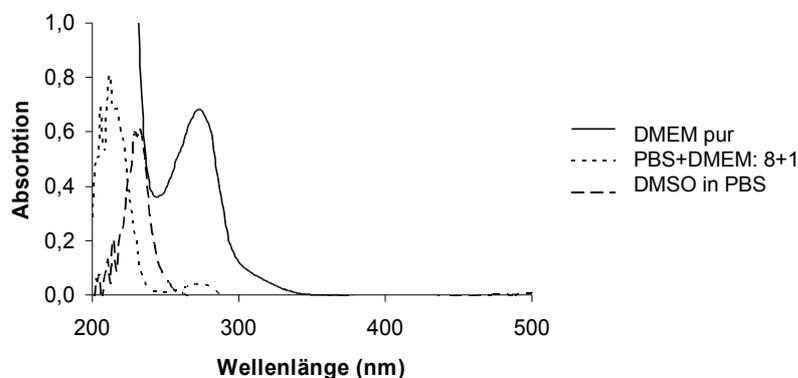
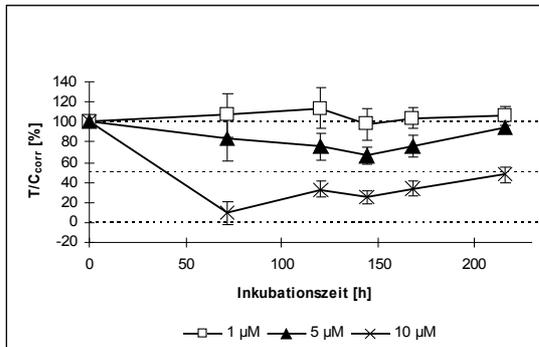


Abbildung 8.2: Absorption der Lösungsmittel bei der Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

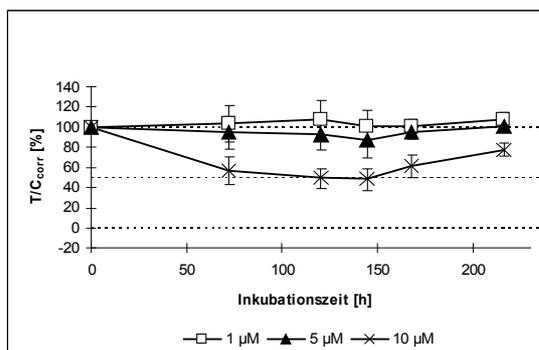
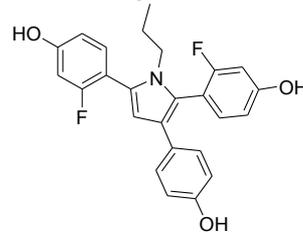
9 Anhang

9.1 Diagramme des zeitabhängigen Cytotoxizitätstests

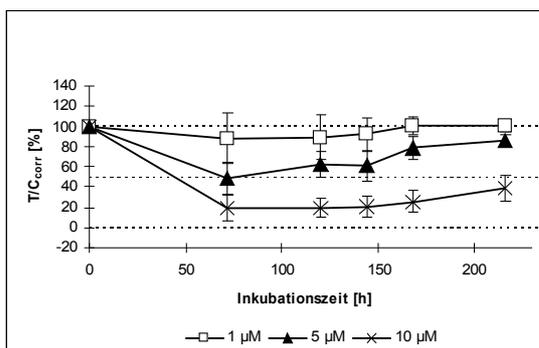
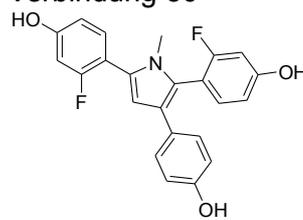
Hydroxylierte Verbindungen:



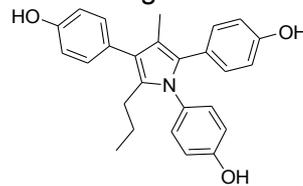
Verbindung 51

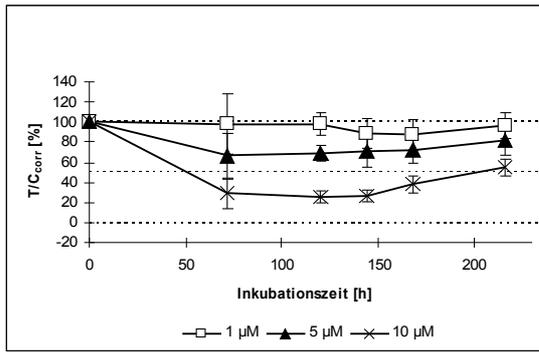


Verbindung 50

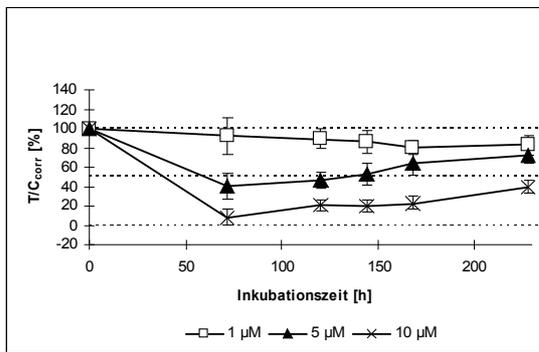
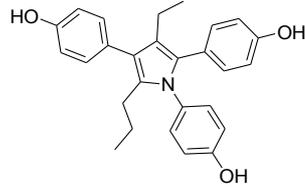


Verbindung 86

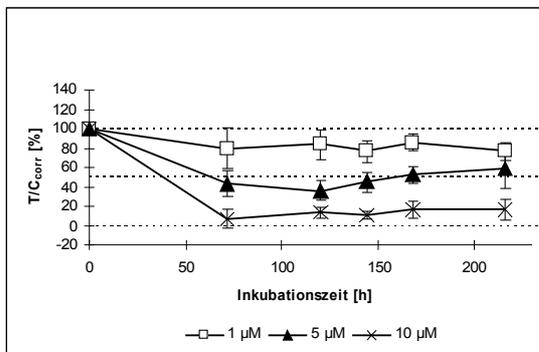
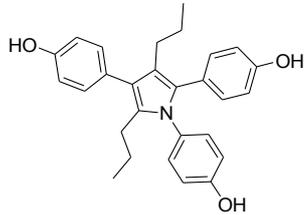




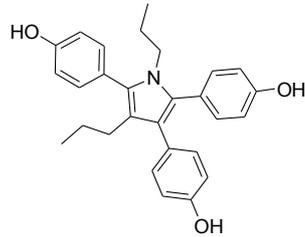
Verbindung 87



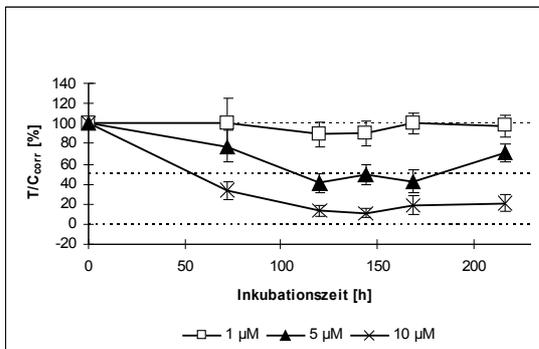
Verbindung 88



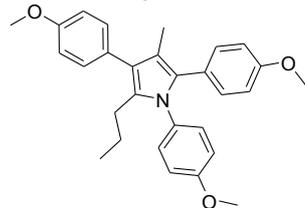
Verbindung 54

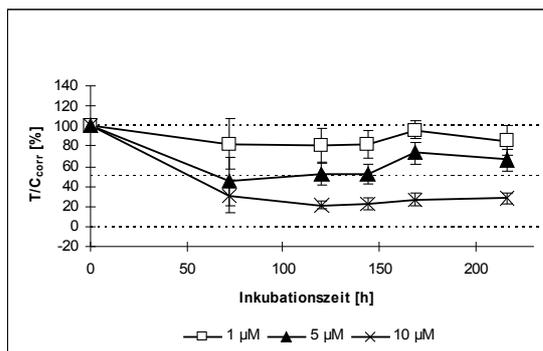


Methoxylierte Verbindungen:

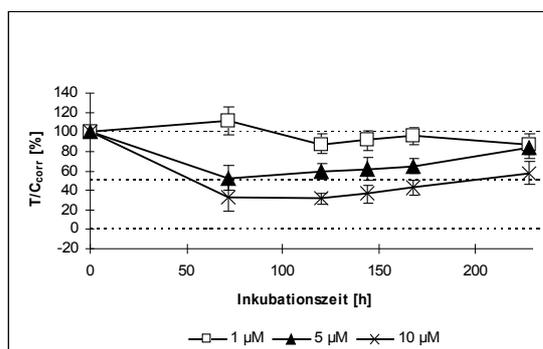
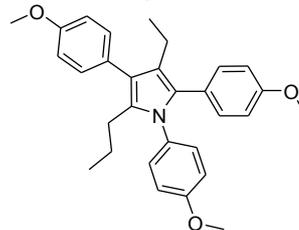


Verbindung 83

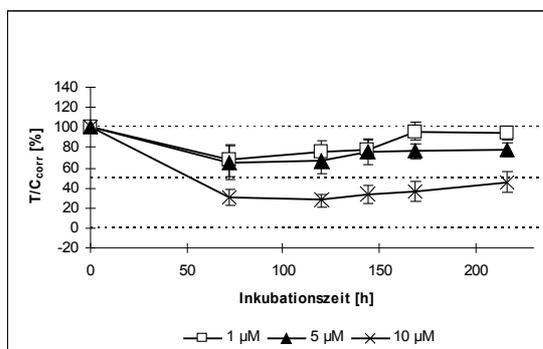
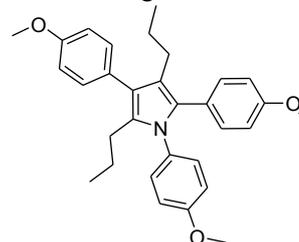




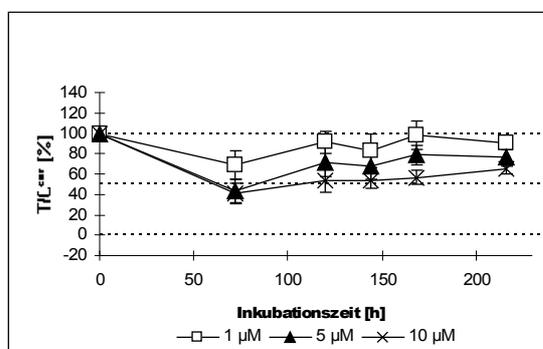
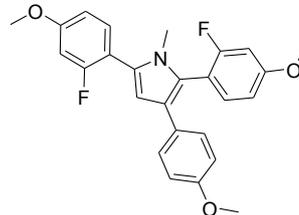
Verbindung 84



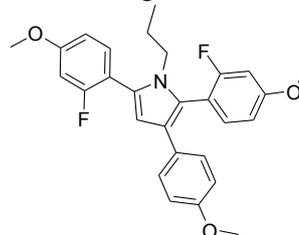
Verbindung 85

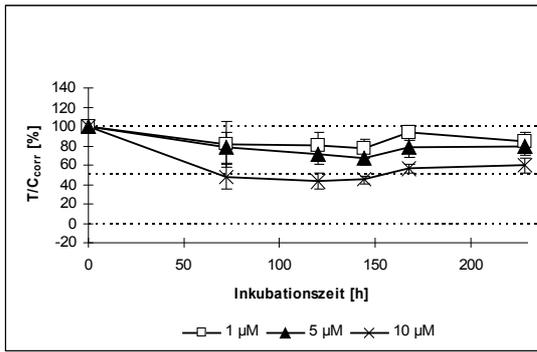


Verbindung 32

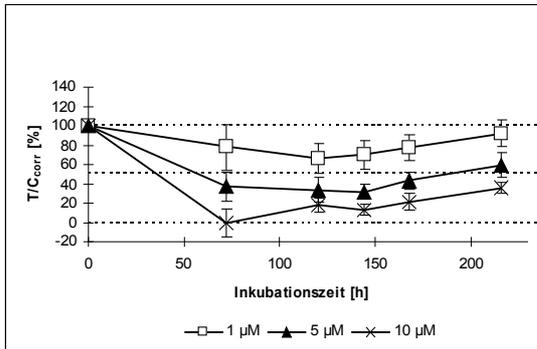
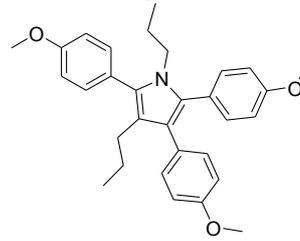


Verbindung 33

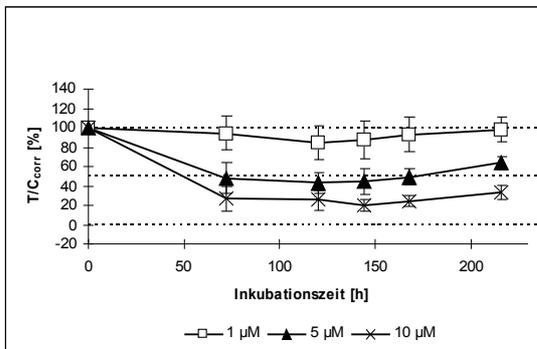
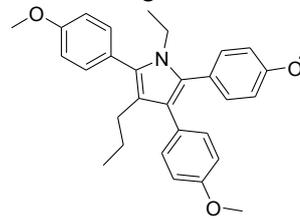




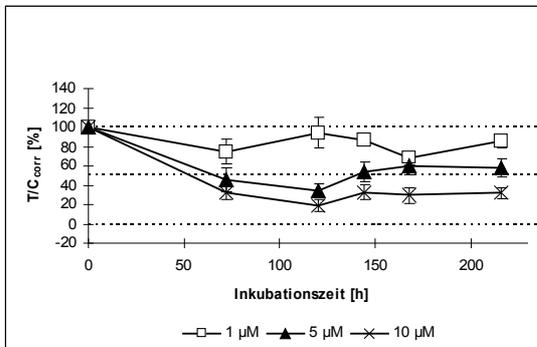
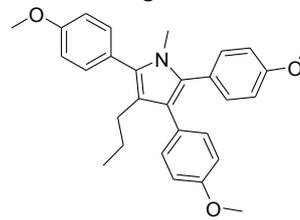
Verbindung 36



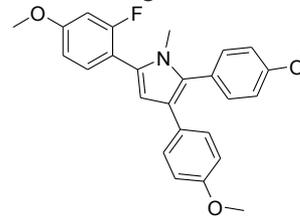
Verbindung 35

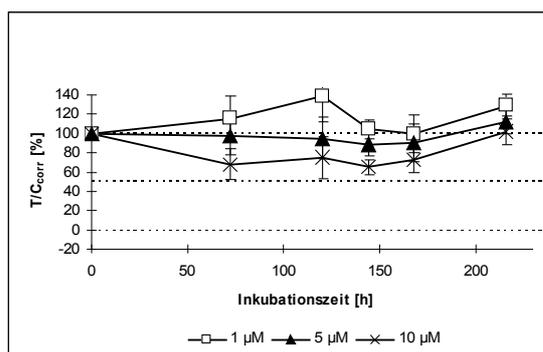


Verbindung 34

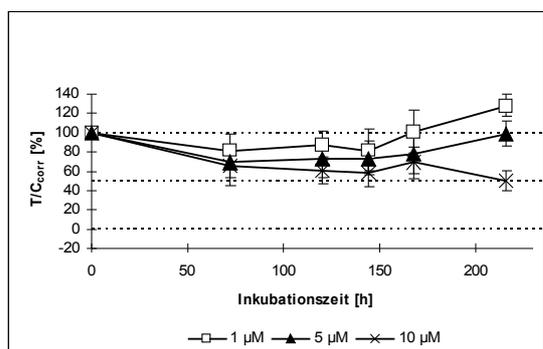
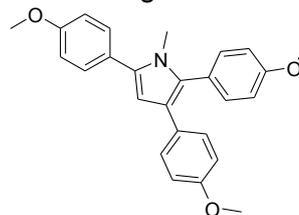


Verbindung 27

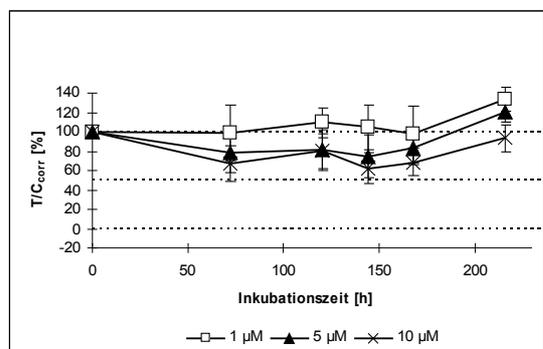
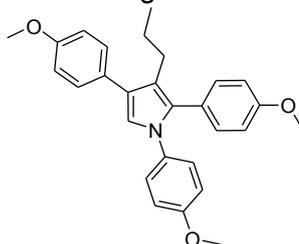




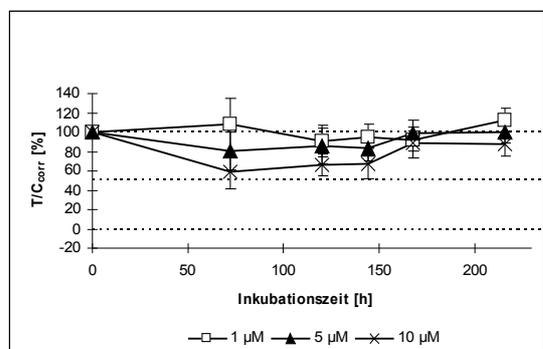
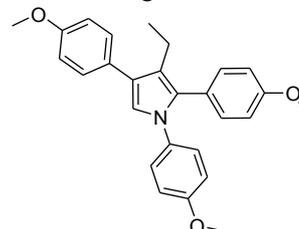
Verbindung 19



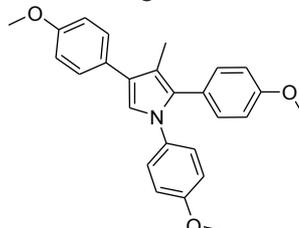
Verbindung 70

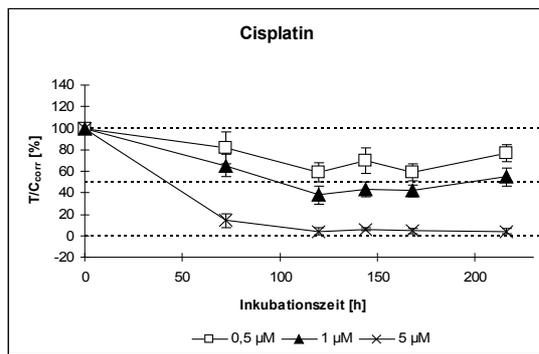


Verbindung 69



Verbindung 68





Cisplatin: Positivkontrolle

9.2 Abkürzungen

(D6)DMSO

4-OHT

ber.

CDCl₃

CHN

ctFCS

DBD

DC

DES

DMEM

DMF

DMSO

DNA

E2

EC₅₀

ER

ERE

FCS

gef.

H12

HPLC

HSP90

IA

IC₅₀

IR

KHMDS

Dimethylsulfoxid, deuteriert

4-Hydroxytamoxifen

berechnet

Chloroform, deuteriert

Elementaranalyse

charcoal treated fetal calf serum

DNA-Bindungsdomäne

Dünnschichtchromatographie

Diethylstilbestrol

Dulbecco's modified Eagle medium

Dimethylformamid

Dimethylsulfoxid

deoxyribonucleic acid

17 β-Estradiol

Halbmaximale effective concentration

Estrogenrezeptor

estrogen response element

fetal calf serum

gefunden

Helix 12 der LBD des ER

Hochleistungs-Flüssigchromatographie

heat shock protein 90

Intrinsische Aktivität

Halbmaximale inhibitory concentration

Infrarotspektroskopie

Kaliumhexamethyldisilylamid

LBD	Ligandenbindungsdomäne
LogP	Verteilungskoeffizient eines Stoffes zwischen 1-Oktanol und Wasser
luc	luciferase
MCF-7	M ichigan C ancer F oundation, hormonabhängige, humane Mammakarzinomzelllinie
MCF-7/2a	hormonabhängige, humane Mammakarzinomzelllinie, stabil transfiziert mit Plasmid ERE _{wtc} Luc
MDA-MB-231	M onroe D. Anderson (Hospital, Houston, Texas), metastatic breast cancer hormonunabhängige, humane Mammakarzinomzelllinie
MS	Massenspektrometrie
NMR	n uclear m agnetic resonance
NOE	n uclear O verhauser e ffect
PPT	P ropylpyrazoltriol
RAL	Raloxifen
RBA	Rezeptorbindungsaffinität
RLU	r elative l ight u nits
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
SERD	s elective e strogen r eceptor d own regulator
SERM	s elective e strogen r eceptor m odulator
TAM	Tamoxifen
TF	Transkriptionsfaktor
THF	T etrahydrofuran
UV	Ultraviolett
wtc	w ild t ype c onsensus

Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

9.4 Wissenschaftliche Beiträge

Posterpräsentationen

Schäfer, A.; Gust, R.: *Novel triarylpyrroles as potential receptor subtype selective ligands for the estrogen receptor* Young Pharmaceutical Scientists meet in Amsterdam, **2007**, Amsterdam, NL.

Schäfer, A.; Gust, R.: *Estrogenic properties of triarylpyrroles: Influence of the nitrogen atom position*, Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, **2007**, Sankt Petersburg, RU.

Schäfer, A.; Gust, R.: *Influence of nitrogen atom position and substitution pattern on the estrogenic and cytotoxic properties of two series of triarylpyrroles*, 28. Deutscher Krebskongress, **2008**, Berlin.

Schäfer, A.; Gust, R.: *Structure-activity relationships of four series of triarylpyrroles concerning their estrogenic and cytotoxic properties*, 18th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, **2008**, Seefeld, Austria.

Schäfer, A.; Gust, R.: *Estrogenic activity of two series of triarylpyrroles*, Tagung der DPhG-Landesgruppe Berlin-Brandenburg "Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor", **2008**, Berlin.

Schäfer, A.; Gust, R.: *Stability and autoxidation of estrogenically active triarylpyrroles*, Young Pharmaceutical Scientists meet in Nice, **2009**, Nizza, FR.

Vorträge

Schäfer, A.; Gust, R.: *Triarylpyrroles stable towards decomposition by oxygen as agonists for the estrogen receptor – a possibility against breast cancer?*, DPhG Jahrestagung, **2009**, Jena.

9.5 Quellen

1. *Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends*. 6. überarbeitete Auflage ed.; Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.: Berlin, 2008.
2. Ketcham, A. S.; Sindelar, W. F., Risk factors in breast cancer. *Prog Clin Cancer* **1975**, 6, 99-114.
3. Shapiro, S.; Strax, P.; Venet, L.; Fink, R., The search for risk factors in breast cancer. *Am J Public Health Nations Health* **1968**, 58, (5), 820-35.
4. Choi, N. W.; Howe, G. R.; Miller, A. B.; Matthews, V.; Morgan, R. W.; Munan, L.; Burch, J. D.; Feather, J.; Jain, M.; Kelly, A., An epidemiologic study of breast cancer. *Am J Epidemiol* **1978**, 107, (6), 510-21.
5. Tarone, R. E., Breast cancer trends among young women in the United States. *Epidemiology* **2006**, 17, (5), 588-90.
6. Brinton, L. A.; Sherman, M. E.; Carreon, J. D.; Anderson, W. F., Recent Trends in Breast Cancer Among Younger Women in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* **2008**, 100, (22), 1643-1648.
7. Foekens, J. A.; van Putten, W. L.; Portengen, H.; de Koning, H. Y.; Thirion, B.; Alexieva-Figusch, J.; Klijn, J. G., Prognostic value of PS2 and cathepsin D in 710 human primary breast tumors: multivariate analysis. *J Clin Oncol* **1993**, 11, (5), 899-908.
8. McGuire, W. L.; Chamness, G. C.; Costlow, M. E.; Richert, N. J., Steroids and human breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry* **1975**, 6, (5), 723-728.

9. Horwitz, K. B.; Wei, L. L.; Sedlacek, S. M.; d'Arville, C. N., Progesterone action and progesterone receptor structure in human breast cancer: a review. *Recent Prog Horm Res* **1985**, 41, 249-316.
10. Parker, M. G., Steroid and related receptors. *Current Opinion in Cell Biology* **1993**, 5, (3), 499-504.
11. Couse, J. F.; Korach, K. S., Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* **1999**, 20, (3), 358-417.
12. Qu, Q.; Perala-Heape, M.; Kapanen, A.; Dahllund, J.; Salo, J.; Vaananen, H. K.; Harkonen, P., Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone* **1998**, 22, (3), 201-9.
13. Lee, C. H.; Edwards, A. M., Stimulation of DNA synthesis and c-fos mRNA expression in primary rat hepatocytes by estrogens. *Carcinogenesis* **2001**, 22, (9), 1473-81.
14. Komesaroff, P. A.; Sudhir, K., Estrogens and human cardiovascular physiology. *Reprod Fertil Dev* **2001**, 13, (4), 261-72.
15. Guetta, V.; Cannon, R. O., III, Cardiovascular Effects of Estrogen and Lipid-Lowering Therapies in Postmenopausal Women. *Circulation* **1996**, 93, (10), 1928-1937.
16. Jensen, E. V.; Jacobson, H. I., Basic Guides to the Mechanism of Estrogen Action. *Recent Prog Horm Res* **1962**, 18, 387-414.
17. Green, S.; Walter, P.; Greene, G.; Krust, A.; Goffin, C.; Jensen, E.; Scrace, G.; Waterfield, M.; Chambon, P., Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *Journal of Steroid Biochemistry* **1986**, 24, (1), 77-83.
18. Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A., Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, (12), 5925-30.
19. Mosselman, S.; Polman, J.; Dijkema, R., ER[beta]: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* **1996**, 392, (1), 49-53.
20. Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G.; Nordenskjold, M.; Gustafsson, J.-A., Human Estrogen Receptor {beta}-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. *J Clin Endocrinol Metab* **1997**, 82, (12), 4258-4265.
21. Gosden, J. R.; Middleton, P. G.; Rout, D., Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24---q27 by in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* **1986**, 43, (3), 218-220.
22. Bhat, R. A.; Harnish, D. C.; Stevis, P. E.; Lyttle, C. R.; Komm, B. S., A novel human estrogen receptor [beta]: identification and functional analysis of additional N-terminal amino acids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1998**, 67, (3), 233-240.
23. Ogawa, S.; Inoue, S.; Watanabe, T.; Hiroi, H.; Orimo, A.; Hosoi, T.; Ouchi, Y.; Muramatsu, M., The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor [beta] (hER[beta]) and Its Heterodimerization with ER [alpha] in Vivo and in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, 243, (1), 122-126.
24. Klinge, C. M., Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* **2000**, 65, (5), 227-51.
25. Tsai, M.; O'Malley, B. W., Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. *Annual Review of Biochemistry* **1994**, 63, (1), 451-486.
26. Delaunay, F.; Pettersson, K.; Tujague, M.; Gustafsson, J.-Å. k., Functional Differences between the Amino-Terminal Domains of Estrogen Receptors $\hat{\pm}$ and $\hat{\text{I}}^2$. *Molecular Pharmacology* **2000**, 58, (3), 584-590.
27. Kumar, V.; Green, S.; Staub, A.; Chambon, P., Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *The EMBO journal* **1986**, 5, (9), 2231-2236.
28. Kumar, V.; Green, S.; Stack, G.; Berry, M.; Jin, J.-R.; Chambon, P., Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **1987**, 51, (6), 941-951.

29. Devin-Leclerc, J.; Meng, X.; Delahaye, F.; Leclerc, P.; Baulieu, E.-E.; Catelli, M.-G., Interaction and Dissociation by Ligands of Estrogen Receptor and Hsp90: The Antiestrogen RU 58668 Induces a Protein Synthesis-Dependent Clustering of the Receptor in the Cytoplasm. *Mol Endocrinol* **1998**, 12, (6), 842-854.
30. Montano, M. M.; Muller, V.; Trobaugh, A.; Katzenellenbogen, B. S., The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* **1995**, 9, (7), 814-825.
31. Katzenellenbogen, B. S.; Montano, M. M.; Ekena, K.; Herman, M. E.; McInerney, E. M., Antiestrogens: Mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **1997**, 44, (1), 23-38.
32. Pace, P.; Taylor, J.; Suntharalingam, S.; Coombes, R. C.; Ali, S., Human Estrogen Receptor beta Binds DNA in a Manner Similar to and Dimerizes with Estrogen Receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, (41), 25832-25838.
33. Greene, G. L.; Press, M. F., Structure and dynamics of the estrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry* **1986**, 24, (1), 1-7.
34. Klein-Hitpaß, L.; Schorpp, M.; Wagner, U.; Ryffel, G. U., An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* **1986**, 46, (7), 1053-1061.
35. Lee, S.; Hahn, S., Model for binding of transcription factor TFIIB to the TBP-DNA complex. *Nature* **1995**, 376, (6541), 609-612.
36. Vyhldal, C.; Samudio, I.; Kladde, M. P.; Safe, S., Transcriptional activation of transforming growth factor alpha by estradiol: requirement for both a GC-rich site and an estrogen response element half-site. *J Mol Endocrinol* **2000**, 24, (3), 329-338.
37. Webb, P.; Lopez, G. N.; Uht, R. M.; Kushner, P. J., Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* **1995**, 9, (4), 443-456.
38. Brzozowski, A. M.; Pike, A. C. W.; Dauter, Z.; Hubbard, R. E.; Bonn, T.; Engstrom, O.; Ohman, L.; Greene, G. L.; Gustafsson, J.-A.; Carlquist, M., Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **1997**, 389, (6652), 753-758.
39. Pink, J. J.; Jordan, V. C., Models of Estrogen Receptor Regulation by Estrogens and Antiestrogens in Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res* **1996**, 56, (10), 2321-2330.
40. Zhou, Y.; Chorich, L. P.; Mahesh, V. B.; Ogle, T. F., Regulation of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid by estradiol and progesterone in rat uterus. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1993**, 46, (6), 687-698.
41. Katzenellenbogen, J. A.; O'Malley, B. W.; Katzenellenbogen, B. S., Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol* **1996**, 10, (2), 119-131.
42. Hall, J. M.; McDonnell, D. P., Coregulators in Nuclear Estrogen Receptor Action: From Concept to Therapeutic Targeting. *Mol. Interv.* **2005**, 5, (6), 343-357.
43. Spencer, T. E.; Jenster, G., Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **1997**, 389, (6647), 194.
44. Voegel, J. J.; Heine, M. J.; Zechel, C.; Chambon, P.; Gronemeyer, H., TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* **1996**, 15, (14), 3667-3675.
45. Bates, S. E.; Davidson, N. E.; Valverius, E. M.; Freter, C. E.; Dickson, R. B.; Tam, J. P.; Kudlow, J. E.; Lippman, M. E.; Salomon, D. S., Expression of Transforming Growth Factor {alpha} and its Messenger Ribonucleic Acid in Human Breast Cancer: Its Regulation by Estrogen and its Possible Functional Significance. *Mol Endocrinol* **1988**, 2, (6), 543-555.
46. Read, L. D.; Snider, C. E.; Miller, J. S.; Greene, G. L.; Katzenellenbogen, B. S., Ligand-Modulated Regulation of Progesterone Receptor Messenger Ribonucleic Acid and Protein in Human Breast Cancer Cell Lines. *Mol Endocrinol* **1988**, 2, (3), 263-271.

47. Nardulli, A. M.; Greene, G. L.; O'Malley, B. W.; Katzenellenbogen, B. S., Regulation of Progesterone Receptor Messenger Ribonucleic Acid and Protein Levels in MCF-7 Cells by Estradiol: Analysis of Estrogen's Effect on Progesterone Receptor Synthesis and Degradation. *Endocrinology* **1988**, 122, (3), 935-944.
48. Kuiper, G. G. J. M.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad, J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.-A., Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors {alpha} and {beta}. *Endocrinology* **1997**, 138, (3), 863-870.
49. Gustafsson, J. A., Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* **1999**, 163, (3), 379-83.
50. Lindberg, M. K.; Moverare, S.; Skrtic, S.; Gao, H.; Dahlman-Wright, K.; Gustafsson, J. A.; Ohlsson, C., Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* **2003**, 17, (2), 203-8.
51. Quarmby, V. E.; Korach, K. S., Differential regulation of protein synthesis by estradiol in uterine component tissues. *Endocrinology* **1984**, 115, (2), 687-97.
52. Roger, P.; Sahla, M. E.; Makela, S.; Gustafsson, J. A.; Baldet, P.; Rochefort, H., Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* **2001**, 61, (6), 2537-41.
53. Bardin, A.; Boulle, N.; Lazennec, G.; Vignon, F.; Pujol, P., Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* **2004**, 11, (3), 537-51.
54. Lazennec, G.; Bresson, D.; Lucas, A.; Chauveau, C.; Vignon, F., ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* **2001**, 142, (9), 4120-30.
55. Powell, C. E.; Soto, A. M.; Sonnenschein, C., Identification and characterization of membrane estrogen receptor from MCF7 estrogen-target cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2001**, 77, (2-3), 97-108.
56. Pourreau-Schneider, N.; Berthois, Y.; Gandilhon, P.; Cau, P.; Martin, P. M.; Passerel, M., Early alterations at the plasma membrane of breast cancer cell lines in response to estradiol and hydroxytamoxifen. *Molecular and Cellular Endocrinology* **1986**, 48, (1), 77-88.
57. Cole, M. P.; Jones, C. T.; Todd, I. D., A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br J Cancer* **1971**, 25, (2), 270-5.
58. Ward, H. W., Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. *Br Med J* **1973**, 1, (5844), 13-14.
59. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **2005**, 365, (9472), 1687-1717.
60. Jordan, V. C.; Koerner, S., Tamoxifen (ICI 46,474) and the human carcinoma 8S oestrogen receptor. *Eur J Cancer* **1975**, 11, (3), 205-206.
61. Lubczyk, V.; Bachmann, H.; Gust, R., Investigations on Estrogen Receptor Binding. The Estrogenic, Antiestrogenic, and Cytotoxic Properties of C2-Alkyl-Substituted 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylethenes. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, (24), 5358-5364.
62. Jordan, V. C.; Collins, M. M.; Rowsby, L.; Prestwich, G., A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J Endocrinol* **1977**, 75, (2), 305-16.
63. Killackey, M. A.; Hakes, T. B.; Pierce, V. K., Endometrial adenocarcinoma in breast cancer patients receiving antiestrogens. *Cancer Treat Rep* **1985**, 69, (2), 237-8.
64. Dorsers, L. C.; Van der Flier, S.; Brinkman, A.; van Agthoven, T.; Veldscholte, J.; Berns, E. M.; Klijn, J. G.; Beex, L. V.; Foekens, J. A., Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms. *Drugs* **2001**, 61, (12), 1721-33.
65. Jordan, V. C., Antiestrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators as Multifunctional Medicines. 2. Clinical Considerations and New Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, 46, (7), 1081-1111.

66. Williams, G. M.; Iatropoulos, M. J.; Djordjevic, M. V.; Kaltenberg, O. P., The triphenylethylene drug tamoxifen is a strong liver carcinogen in the rat. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, (2), 315-317.
67. Phillips, D. H.; Carmichael, P. L.; Hewer, A.; Cole, K. J.; Poon, G. K., {alpha}-Hydroxytamoxifen, a Metabolite of Tamoxifen with Exceptionally High DNA-binding Activity in Rat Hepatocytes. *Cancer Res* **1994**, *54*, (21), 5518-5522.
68. Dragan, Y. P.; Fahey, S.; Nuwaysir, E.; Sattler, C.; Babcock, K.; Vaughan, J.; McCague, R.; Jordan, V. C.; Pitot, H. C., The effect of tamoxifen and two of its non-isomerizable fixed-ring analogs on multistage rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, (3), 585-594.
69. Phillips, D. H.; Carmichael, P. L.; Hewer, A.; Cole, K. J.; Hardcastle, I. R.; Poon, G. K.; Keogh, A.; Strain, A. J., Activation of tamoxifen and its metabolite {alpha}-hydroxytamoxifen to DNA-binding products: comparisons between human, rat and mouse hepatocytes. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, (1), 89-94.
70. Black, L. J.; Jones, C. D.; Falcone, J. F., Antagonism of estrogen action with a new benzothiophene derived antiestrogen. *Life Sci* **1983**, *32*, (9), 1031-6.
71. Jones, C. D.; Jevnikar, M. G.; Pike, A. J.; Peters, M. K.; Black, L. J.; Thompson, A. R.; Falcone, J. F.; Clemens, J. A., Antiestrogens. 2. Structure-activity studies in a series of 3-aryl-2-arylbenzo[b]thiophene derivatives leading to [6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)benzo[b]thien-3-yl] [4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]-phenyl]methanone hydrochloride (LY156758), a remarkably effective estrogen antagonist with only minimal intrinsic estrogenicity. *J Med Chem* **1984**, *27*, (8), 1057-66.
72. Delmas, P. D.; Bjarnason, N. H.; Mitlak, B. H.; Ravoux, A. C.; Shah, A. S.; Huster, W. J.; Draper, M.; Christiansen, C., Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* **1997**, *337*, (23), 1641-7.
73. Ettinger, B.; Black, D. M.; Mitlak, B. H.; Knickerbocker, R. K.; Nickelsen, T.; Genant, H. K.; Christiansen, C.; Delmas, P. D.; Zanchetta, J. R.; Stakkestad, J.; Gluer, C. C.; Krueger, K.; Cohen, F. J.; Eckert, S.; Ensrud, K. E.; Avioli, L. V.; Lips, P.; Cummings, S. R.; for the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation, I., Reduction of Vertebral Fracture Risk in Postmenopausal Women With Osteoporosis Treated With Raloxifene: Results From a 3-Year Randomized Clinical Trial. *JAMA* **1999**, *282*, (7), 637-645.
74. <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01698.html>
75. Fang, H.; Tong, W.; Shi, L. M.; Blair, R.; Perkins, R.; Branham, W.; Hass, B. S.; Xie, Q.; Dial, S. L.; Moland, C. L.; Sheehan, D. M., Structure-Activity Relationships for a Large Diverse Set of Natural, Synthetic, and Environmental Estrogens. *Chemical Research in Toxicology* **2001**, *14*, (3), 280-294.
76. Levenson, A. S.; Jordan, V. C., The Key to the Antiestrogenic Mechanism of Raloxifene Is Amino Acid 351 (Aspartate) in the Estrogen Receptor. *Cancer Res* **1998**, *58*, (9), 1872-1875.
77. Fisher, B.; Costantino, J. P.; Wickerham, D. L.; Redmond, C. K.; Kavanah, M.; Cronin, W. M.; Vogel, V.; Robidoux, A.; Dimitrov, N.; Atkins, J.; Daly, M.; Wieand, S.; Tan-Chiu, E.; Ford, L.; Wolmark, N., Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, (18), 1371-1388.
78. Wosikowski, K.; Küng, W.; Hasmann, M.; Löser, R.; Eppenberger, U., Inhibition of growth-factor-activated proliferation by anti-estrogens and effects on early gene expression of mcf-7 cells. *International Journal of Cancer* **1993**, *53*, (2), 290-297.
79. Haran, E. F.; Marezek, A. F.; Goldberg, I.; Horowitz, A.; Degani, H., Tamoxifen Enhances Cell Death in Implanted MCF7 Breast Cancer by Inhibiting Endothelium Growth. *Cancer Res* **1994**, *54*, (21), 5511-5514.
80. Osborne, C. K.; Jarman, M.; McCague, R.; Coronado, E. B.; Hilsenbeck, S. G.; Wakeling, A. E., The importance of tamoxifen metabolism in tamoxifen-stimulated breast tumor growth. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **1994**, *34*, (2), 89-95.
81. Lykkesfeldt, A. E.; Larsen, S. S.; Briand, P., Human breast cancer cell lines resistant to pure anti-estrogens are sensitive to tamoxifen treatment. *International Journal of Cancer* **1995**, *61*, (4), 529-534.

82. ATACTrialists'Group, Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* **2005**, 365, (9453), 69-62.
83. Gallagher, A.; Chambers, T. J.; Tobias, J. H., The estrogen antagonist ICI 182,780 reduces cancellous bone volume in female rats. *Endocrinology* **1993**, 133, (6), 2787-2791.
84. von Rauch, M.; Schlenk, M.; Gust, R., Effects of C2-Alkylation, N-Alkylation, and N,N'-Dialkylation on the Stability and Estrogen Receptor Interaction of (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolines. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 47, (4), 915-927.
85. Laïos, I.; Cleeren, A.; Leclercq, G.; Nonclercq, D.; Laurent, G.; Schlenk, M.; Wellner, A.; Gust, R., Effects of (R,S)/(S,R)-4,5-bis(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolines and (R,S)/(S,R)-2,3-bis(2-chloro-4-hydroxyphenyl)piperazines on estrogen receptor alpha level and transcriptional activity in MCF-7 cells. *Biochemical Pharmacology* **2007**, 74, (7), 1029-1038.
86. Gust, R.; Keilitz, R.; Schmidt, K., Synthesis, Structural Evaluation, and Estrogen Receptor Interaction of 2,3-Diarylpiperazines. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45, (11), 2325-2337.
87. Gust, R.; Keilitz, R.; Schmidt, K., Investigations of New Lead Structures for the Design of Selective Estrogen Receptor Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 44, (12), 1963-1970.
88. Gust, R.; Keilitz, R.; Schmidt, K.; Rauch, M. v., Synthesis, Structural Evaluation, and Estrogen Receptor Interaction of 4, 5-Bis(4-hydroxyphenyl)imidazoles. *Archiv der Pharmazie* **2002**, 335, (10), 463-471.
89. Kekenus-Huskey, P. M.; Muegge, I.; Rauch, M. v.; Gust, R.; Knapp, E.-W., A molecular docking study of estrogenically active compounds with 1,2-diarylethane and 1,2-diarylethene pharmacophores. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12, (24), 6527-6537.
90. Gust, R.; Keilitz, R.; Schmidt, K.; von Rauch, M., (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolines: Ligands for the Estrogen Receptor with a Novel Binding Mode. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45, (16), 3356-3365.
91. Gust, R.; Busch, S.; Keilitz, R.; Schmidt, K.; Rauch, M. v., Investigations on the Influence of Halide Substituents on the Estrogen Receptor Interaction of 2, 4, 5-Tris(4-hydroxyphenyl)imidazoles. *Archiv der Pharmazie* **2003**, 336, (10), 456-465.
92. Fink, B. E.; Mortensen, D. S.; Stauffer, S. R.; Aron, Z. D.; Katzenellenbogen, J. A., Novel structural templates for estrogen-receptor ligands and prospects for combinatorial synthesis of estrogens. *Chem Biol* **1999**, 6, (4), 205-19.
93. Wiglenda, T.; Gust, R., Structure-Activity Relationship Study To Understand the Estrogen Receptor-Dependent Gene Activation of Aryl- and Alkyl-Substituted 1H-Imidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, (7), 1475-1484.
94. Stauffer, S. R.; Coletta, C. J.; Tedesco, R.; Nishiguchi, G.; Carlson, K.; Sun, J.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A., Pyrazole Ligands: Structure-Affinity/Activity Relationships and Estrogen Receptor alpha Selective Agonists. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, (26), 4934-4947.
95. Stauffer, S. R.; Huang, Y.; Coletta, C. J.; Tedesco, R.; Katzenellenbogen, J. A., Estrogen pyrazoles: defining the pyrazole core structure and the orientation of substituents in the ligand binding pocket of the estrogen receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, 9, (1), 141-150.
96. Mortensen, D. S.; Rodriguez, A. L.; Carlson, K. E.; Sun, J.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A., Synthesis and Biological Evaluation of a Novel Series of Furans: Ligands Selective for Estrogen Receptor alpha. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, (23), 3838-3848.
97. Mortensen, D. S.; Rodriguez, A. L.; Sun, J.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A., Furans with basic side chains: synthesis and biological evaluation of a novel series of antagonists with selectivity for the estrogen receptor alpha. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, 11, (18), 2521-2524.
98. Hoffmann, R. Synthese und pharmakologische Untersuchung neuer Triaryl-1H-pyrrole mit estrogenen, zytotoxischen und COX-inhibitorischen Eigenschaften. Freie Universität Berlin, Berlin, 2007.

99. Friedel, C.; Crafts, J. M., Sur une nouvelle méthode générale de synthèse d'hydrocarbures, d'acétones, etc. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* **1877**, 84, 1450-1454.
100. Paal, C., Synthese von Thiophen- und Pyrrolderivaten. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1885**, 18, (1), 367-371.
101. Knorr, L., Einwirkung des Diacetbernsteinsäureesters auf Ammoniak und primäre Aminbasen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1885**, 18, (1), 299-311.
102. Borsche, W.; Fels, A., Ueber die Einwirkung von Ammoniak auf alpha, beta-Diacylcarbonsäureester, ein Beitrag zur Kenntniss der Pyrrolbildung aus 1,4-Diketonen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1906**, 39, 3877-3886.
103. Katritzky, A. R.; Yousaf, T. I.; Chen, B. C.; Guang-Zhi, Z., An h-1, c-13 and n-15 nmr study of the paal-knorr condensation of acetonylacetone with primary amines. *Tetrahedron* **1986**, 42, (2), 623-628.
104. Amarnath, V.; Anthony, D. C.; Amarnath, K.; Valentine, W. M.; Wetterau, L. A.; Graham, D. G., Intermediates in the Paal-Knorr synthesis of pyrroles. *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56, (24), 6924-6931.
105. Benton, F. L.; Dillon, T. E., The Cleavage of Ethers with Boron Bromide. I. Some Common Ethers. *Journal of the American Chemical Society* **1942**, 64, (5), 1128-1129.
106. Underwood, H. W.; Toone, G. C., Catalysis in Organic Chemistry. II. Mechanism of the Reactions of Ethers with Acid Chlorides, Acids and Anhydrides. *Journal of the American Chemical Society* **1930**, 52, (1), 391-394.
107. Meerwein, H.; Maier-Hüser, H., Untersuchungen über Eigenschaftsänderungen chemischer Verbindungen durch Komplexbildung, VII. Über den Mechanismus der Ätherspaltungen durch Säurechloride und Säureanhydride in Gegenwart von Katalysatoren. *Journal für Praktische Chemie* **1932**, 134, (1-3), 51-81.
108. Claisen, L., Introduction of acid radicals into ketones. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1887**, 20, 655-657.
109. Anselme, J. P., Convenient and practical preparation of dibenzoylmethane. *J. Org. Chem.* **1967**, 32, (11), 3716-3716.
110. Gibson, D.; Binyamin, I.; Haj, M.; Ringel, I.; Ramu, A.; Katzhendler, J., Anthraquinone intercalators as carrier molecules for second-generation platinum anticancer drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, 32, (10), 823-831.
111. Fischer, H.; Fink, E., A new pyrrole synthesis. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie* **1944**, 280, 123-126.
112. Knorr, L.; Lange, H., Ueber die Bildung von Pyrrolderivaten aus Isonitrosoketonen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1902**, 35, (3), 2998-3008.
113. Bobbitt, J. M.; Dutta, C. P., An intramolecular, aldehyde-enamine condensation. *Chem. Commun. (London)* **1968**, (22), 1429.
114. Hendrickson, J. B.; Rees, R.; Templeton, J. F., A New General Heterocycle Synthesis; Use of Acetylenedicarboxylic Esters. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, 86, (1), 107-111.
115. Kleinspehn, G. G., A Novel Route to Certain 2-Pyrrolicarboxylic Esters and Nitriles^{1,2}. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77, (6), 1546-1548.
116. Gossauer, A., *Die Chemie der Pyrrole*. Bredereck, H.; Hafner, K.; Müller, E.: Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1974; Vol. 15.
117. Paine, J. B.; Dolphin, D., Pyrrole chemistry. An improved synthesis of ethyl pyrrole-2-carboxylate esters from diethyl aminomalonate. *The Journal of Organic Chemistry* **1985**, 50, (26), 5598-5604.
118. Paine, J. B.; Brough, J. R.; Buller, K. K.; Erikson, E. E., Regioselectivity of pyrrole synthesis from diethyl aminomalonate and 1,3-diketones: further observations. *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, 52, (18), 3986-3993.

119. Zaitseva, S. V.; Zdanovich, S. A.; Semeikin, A. S.; Golubchikov, O. A., Regularities of Extra Coordination of Nitrogen-containing Ligands with an Anthracenyl-capped Zinc Porphyrin. *Russian Journal of General Chemistry* **2003**, 73, (3), 467-472.
120. Dunn, G. E., Kinetics and mechanism of the decarboxylation of pyrrole-2-carboxylic acid in aqueous solution. *Can. J. Chem.* **1971**, 49, (7), 1032-1035.
121. Ma, D.; Cai, Q., I-Proline Promoted Ullmann-Type Coupling Reactions of Aryl Iodides with Indoles, Pyrroles, Imidazoles or Pyrazoles. *Synlett* **2004**, 2004, (01), 128-130.
122. Zhang, H.; Cai, Q.; Ma, D., Amino Acid Promoted CuI-Catalyzed C-N Bond Formation between Aryl Halides and Amines or N-Containing Heterocycles. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, (13), 5164-5173.
123. Deng, W.; Wang, Y. F.; Zhang, C.; Liu, L.; Guo, Q. X., CuI / proline-catalyzed N-arylation of nitrogen heterocycles. *Chinese Chemical Letters* **2006**, 17, (3), 313-316.
124. Cohen, T.; Wood, J.; Dietz, A. G., Organocopper intermediates in the exchange reaction of aryl halides with salts of copper(I). The possible role of copper(III). *Tetrahedron Letters* **1974**, 15, (40), 3555-3558.
125. Paine, A. J., Mechanisms and models for copper mediated nucleophilic aromatic substitution. 2. Single catalytic species from three different oxidation states of copper in an Ullmann synthesis of triarylamines. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, 109, (5), 1496-1502.
126. Aalten, H. L.; van Koten, G.; Grove, D. M.; Kuilman, T.; Piekstra, O. G.; Hulshof, L. A.; Sheldon, R. A., The copper catalysed reaction of sodium methoxide with aryl bromides. A mechanistic study leading to a facile synthesis of anisole derivatives. *Tetrahedron* **1989**, 45, (17), 5565-5578.
127. Ghosh, U.; Ganessunker, D.; Sattigeri, V. J.; Carlson, K. E.; Mortensen, D. J.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A., Estrogenic diazenes: heterocyclic non-steroidal estrogens of unusual structure with selectivity for estrogen receptor subtypes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, 11, (4), 629-657.
128. Nahm, S.; Weinreb, S. M., N-methoxy-n-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Letters* **1981**, 22, (39), 3815-3818.
129. Kim, S.; Son, S.; Kang, H., Efficient syntheses of 2-carbomethoxy-3,4-disubstituted pyrroles by the condensation of vinylogous amides with aminomalonate. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2001**, 22, (12), 1403-1406.
130. Guy, R. W.; Jones, R. A., Pyrrole studies. X. The preparation and electronic spectra of phenyldipyrromethenes. *Australian Journal of Chemistry* **1966**, 19, (10), 1871-1885.
131. Anderson, T., Ueber die Producte der trocknen Destillation thierischer Materien. *Annalen der Chemie und Pharmacie* **1855**, 94, (3), 358-365.
132. Jones, R.; Bean, G., *The Chemistry of Pyrroles*. Academic press: NY, San Francisco, London, , 1977; Vol. 34.
133. Potts, H. A.; Smith, G. F., Structure of pyrrole trimer. *Journal of the Chemical Society* **1957**, 4018-22.
134. Linnell, R. H.; Umar, S., Aging effects in pyrrole. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1955**, 57, (1), 264-266.
135. Gollnick, K.; Schenck, G. O., Oxygen as a Dienophile. In *Organic Chemistry, A series of monographs: 1,4-Cycloaddition reactions* Hamer, J., Ed. Academic press: NY and London, 1967; Vol. 8.
136. Hamer, J., Systems capable of 1,4-Cycloadditions. In *Organic Chemistry, A series of monographs: 1,4-Cycloaddition reactions*, Hamer, J., Ed. Academic Press: NY and London, 1967; Vol. 8.
137. Schenck, G. O., Furanperoxyd, ein Autoxydationsprodukt des Furans. *Naturwissenschaften* **1943**, 31, (33), 387-387.

138. Koch, E.; Schenck, G. O., Zur photosensibilisierten O₂-Übertragung auf Furan: Isolierung und Eigenschaften des ozonidartigen Furanperoxids bei -100°. *Chemische Berichte* **1966**, 99, (6), 1984-1990.
139. Foote, C. S.; Wuesthoff, M. T.; Wexler, S.; Burstain, I. G.; Denny, R.; Schenck, G. O.; Schulte-Elte, K. H., Photosensitized oxygenation of alkyl-substituted furans. *Tetrahedron* **1967**, 23, (6), 2583-2599.
140. Lightner, D. A.; Kirk, D. I.; Norris, R. D., Dye-sensitized photooxygenation of N-phenylpyrrole. *Journal of heterocyclic chemistry* **1974**, 11, 1097-1098.
141. Lightner, D. A.; Pak, C.-S., Dye-sensitized photooxygenation of tert-butylpyrroles. *The Journal of Organic Chemistry* **1975**, 40, (19), 2724-2728.
142. Beaver, B. D.; Cooney, J. V.; Watkins, J. M., Jr., Autoxidation of nitrogen heterocycles. 3. Solvent effects in the autoxidation of 2,5-dimethylpyrrole. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1986**, 23, (4), 1095-1097.
143. Lightner, D. A.; Low, L. K., Photosensitized oxygenation of 2,4-dimethylpyrrole and 2-methylpyrrole. *Journal of heterocyclic chemistry* **1972**, 9, (1), 167-168.
144. Hoft, E.; Katritzky, A. R.; Nesbit, M. R., The autoxidation of alkylpyrroles. *Tetrahedron Letters* **1967**, 8, (32), 3041-3044.
145. Katritzky, A. R.; Nesbit, M. R.; Hoft, E., Erratum. *Tetrahedron Letters* **1968**, 9, (16), 2028-2028.
146. Foote, C. S., Photosensitized oxygenations and the role of singlet oxygen. *Accounts of Chemical Research* **1968**, 1, (4), 104-110.
147. Cooney, J. V.; Hazlett, R. N., Autoxidation of nitrogen heterocycles. 1. Ultraviolet spectra of alkylpyrroles. Evidence for a molecular association complex between oxygen and 2,5-dimethylpyrrole in nonpolar media. *Heterocycles* **1984**, 22, (7), 1513-18.
148. Beaver, B. D.; Cooney, J. V.; Watkins, J. M., Jr., Autoxidation of Nitrogen Heterocycles. 2. Kinetic Measurements of the Autoxidation of 2,5-Dimethylpyrrole. *Heterocycles* **1985**, 23, (11), 2847-2851
149. Constantino, M. G.; Júnior, V. L.; da Silva, G. V., Niobium Pentachloride Activation of Enone Derivatives: Diels-Alder and Conjugate Addition Products. *Molecules* **2002**, 7, (5), 456-464.
150. Adams, D. R.; Wilkinson, F., Lifetime of singlet oxygen in liquid solution. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1972**, 68, 586 - 593.
151. Foote, C. S., Quenching of Singlet Oxygen. In *Organic chemistry, A Series of Monographs, Singlet Oxygen*, Wasserman, H.; Murray, R., Eds. Academic press: NY, San Francisco, London, 1979; Vol. 40.
152. Foote, C. S., Definition of Type I and Type II Photosensitized Oxidation. *Photochemistry and Photobiology* **1991**, 54, (5), 659-659.
153. Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Liu, K.-C.; Krebs, A.; Kemper, R., Reaction of strained acetylenes with molecular oxygen. A novel chemiluminescent reaction, evidence for a dioxetene, and a mechanism for thermal generation of singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, 98, (21), 6758-6761.
154. Quistad, G. B.; Lightner, D. A., Pyrrole photo-oxidation. The direct formation of maleimides. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications* **1971**, 1099 - 1100.
155. Quistad, G. B.; Lightner, D. A., On the photo-oxidation of 3,4-diethyl-2-methylpyrrole. *Tetrahedron Letters* **1971**, 12, (46), 4417-4420.
156. Lightner, D. A.; Bisacchi, G. S.; Norris, R. D., On the mechanism of the sensitized photooxygenation of pyrroles. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, 98, (3), 802-807.
157. Lightner, D. A.; Crandall, D. C., The dye sensitized photooxygenation of kryptopyrrole. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **1973**, 29, (3), 262-264.
158. Martel, J.; Dufraisse, C., Photooxydations de dienes monoheterocycliques pentagonaux, polyphenyles, en series furannique, thiophenique et pyrrolique. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* **1957**, 244, 626-629.

159. Rio, G.; Ranjon, A.; Pouchot, O., Tetraphenyl-2,3,4,5 pyrrole: transformations de l'hydroperoxyde obtenu par photoxydation; autoxydation. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* **1966**, 263, 634-636.
160. Dufraisse, C.; Rio, G.; Ranjon, A., L'union labile de l'oxygene au carbone en series heterocycliques pentagonales. Une photooxydation fugace, celle du pentaphenylpyrrole. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* **1967**, 265, 310-315.
161. Wasserman, H. H.; Miller, A. H., Photosensitized oxygenation of N-substituted pyrroles. *Chemical Communications* **1969**, (5), 199-200.
162. Wasserman, H. H.; Liberles, A., Formation of Epoxides in the Pyrrole and Furan Series by Photooxidation. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, 82, (8), 2086-2086.
163. Ramasseul, R.; Rassat, A., Photoxydation des di-butyl-2,5 et tri-butyl-2,3,5 pyrrole isolement des hydroperoxydes correspondants. *Tetrahedron Letters* **1972**, 13, (14), 1337-1340.
164. Matthias Ziehe, Technische Universität Berlin.
165. Smith, E. B.; Jensen, H. B., Autoxidation of three 1-alkylpyrroles. *The Journal of Organic Chemistry* **1967**, 32, (11), 3330-3334.
166. Gardini, G. P., The Oxidation of Monocyclic Pyrroles. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 1973; Vol. 15, pp 67-98.
167. Lightner, D. A.; Quistad, G. B., Dye-sensitized photooxygenation of pyrrole alpha-aldehydes. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1973**, 10, (2), 273-4.
168. Bocchi, V.; Chierici, L.; Gardini, G. P., The structure of the oxidation product of pyrrole, C₁₂H₁₇N₃O₃. *Tetrahedron* **1967**, 23, (2), 737-740.
169. Higgins, R.; Foote, C. S.; Cheng, H., Chemistry of Singlet Oxygen Oxidation of Organic Compounds, Vol III. In Gould, R. F., Ed. American Chemical Society: Washington, D.C., 1968; pp 102-117.
170. Ohloff, G., Singlett Oxygen: A Reagent in Organic Synthesis. *Pure and Applied Chemistry* **1975**, 43, (3-4), 481-502.
171. Walter, W.; Francke, W., In *Beyer Walter: Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag: Stuttgart Leipzig, 1998; p 644.
172. Helmchen, G.; Prelog, V., Über atropisomere Biphenyl-Derivate mit einer Pseudoasymmetrieachse. *Helvetica Chimica Acta* **1972**, 55, (7), 2599-2611.
173. Cailleau, R.; Young, R.; Olivé, M.; Reeves, W. J. j., Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions. *Journal of the National Cancer Institute* **1974**, 53, (3), 661-674.
174. Cailleau, R.; Olivé, M.; Cruciger, Q. V. J., Long-Term Human Breast Carcinoma Cell Lines of Metastatic Origin: Preliminary Characterization. *In Vitro* **1978**, 14, (11), 911-915.
175. Treeck, O.; Pfeiler, G.; Horn, F.; Federhofer, B.; Houlihan, H.; Vollmer, A.; Ortmann, O., Novel estrogen receptor beta transcript variants identified in human breast cancer cells affect cell growth and apoptosis of COS-1 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2007**, 264, (1-2), 50-60.
176. Girault, I.; Andrieu, C.; Tozlu, S.; Spyrtos, F.; Bieche, I.; Lidereau, R., Altered expression pattern of alternatively spliced estrogen receptor beta transcripts in breast carcinoma. *Cancer Lett* **2004**, 215, (1), 101-12.
177. Mukhopadhyay, R.; Theriault, R. L.; Price, J. E., Increased levels of $\alpha 6$ integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Clinical and Experimental Metastasis* **1999**, 17, (4), 323-330.
178. Gilhooly, E. M.; Rose, D. P., The association between a mutated ras gene and cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cell lines. *Int J Oncol* **1999**, 15, (2), 267-270.
179. Liu, X.-H.; Rose, D. P., Differential Expression and Regulation of Cyclooxygenase-1 and -2 in Two Human Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res* **1996**, 56, (22), 5125-5127.
180. Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M., A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **1973**, 51, (5), 1409-16.

181. Treack, O.; Juhasz-Boess, I.; Latrarch, C.; Horn, F.; Goerse, R.; Ortmann, O., Effects of exon-deleted estrogen receptor β transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* **2008**, 110, (3), 507-520.
182. Horwitz, K. B.; Costlow, M. E.; McGuire, W. L., MCF-7: A human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids* **1975**, 26, (6), 785-795.
183. Osborne, C. K.; Hobbs, K.; Trent, J. M., Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Research and Treatment* **1987**, 9, (2), 111-121.
184. Meyer, T.; Koop, R.; von Angerer, E.; Schönenberger, H.; Holler, E., A rapid luciferase transfection assay for transcription activation effects and stability control of estrogenic drugs in cell cultures. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **1994**, 120, (6), 359-364.
185. Hafner, F.; Holler, E.; von Angerer, E., Effect of growth factors on estrogen receptor mediated gene expression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1996**, 58, (4), 385-393.
186. Berthois, Y.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S., Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, 83, (8), 2496-2500.
187. Darbre, P.; Yates, J.; Curtis, S.; King, R. J. B., Effect of Estradiol on Human Breast Cancer Cells in Culture. *Cancer Res* **1983**, 43, (1), 349-354.
188. de Wet, J. R.; Wood, K. V.; DeLuca, M.; Helinski, D. R.; Subramani, S., Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **1987**, 7, (2), 725-737.
189. Biberger, C.; von Angerer, E., 1-Benzyl-2-phenylindole- and 1,2-Diphenylindole-based Antiestrogens. Estimation of Agonist and Antagonist Activities in Transfection Assays. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1998**, 64, (5-6), 277-285.
190. Hafner, F. Wirkungen von Estrogenen, Antiestrogenen und Wachstumsfaktoren auf Funktionen des Estrogenrezeptors Untersuchungen mit transient und stabil transfizierten Reporterplasmiden. Universität Regensburg, Regensburg, 1996.
191. Hoffmann, K. H., Leuchtende Tiere: Chemie und biologische Bedeutung. *Biologie in unserer Zeit* **1981**, 11, (4), 97-106.
192. persönliche Mitteilung Prof. Gust.
193. Wilkerson, W. W.; Copeland, R. A.; Covington, M.; Trzaskos, J. M., Antiinflammatory 4,5-Diarylpyrroles. 2. Activity as a Function of Cyclooxygenase-2 Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, (20), 3895-3901.
194. Khanna, I. K.; Weier, R. M.; Yu, Y.; Collins, P. W.; Miyashiro, J. M.; Koboldt, C. M.; Veenhuizen, A. W.; Currie, J. L.; Seibert, K.; Isakson, P. C., 1,2-Diarylpyrroles as Potent and Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, 40, (11), 1619-1633.
195. Andrews, P. R.; Craik, D. J.; Martin, J. L., Functional group contributions to drug-receptor interactions. *Journal of Medicinal Chemistry* **1984**, 27, (12), 1648-1657.
196. Anstead, G. M.; Carlson, K. E.; Katzenellenbogen, J. A., The estradiol pharmacophore: Ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* **1997**, 62, (3), 268-303.
197. Stauffer, S. R.; Huang, Y. R.; Aron, Z. D.; Coletta, C. J.; Sun, J.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A., Triarylpyrazoles with basic side chains: development of pyrazole-based estrogen receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, 9, (1), 151-161.
198. Busch, S. V. Struktur-Wirkungs-Studien an estrogen wirksamen Verbindungen mit 1,2-Diarylethan-Strukturelement: Untersuchungen von Typ-I- und Typ-II-Estrogenen an ER α und ER β . FU Berlin, Berlin, 2006.
199. Jackson, A. H., Pyrroles. In *Heterocyclic Compounds* Sammes, P., Ed. Pergamon Press: Oxford, NY, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 1979; Vol. 4.

200. Duax, W. L.; Griffin, J. F.; Weeks, C. M.; Korach, K. S., Molecular Conformation, Receptor Binding, and Hormone Action of Natural and Synthetic Estrogens and Antiestrogens. *Environmental Health Perspectives* **1985**, 61, 111-121.
201. Cumper, C. W. N.; Wood, J. W. M., Dielectric Relaxation and Dipole Moments of Substituted Pyrroles. *J Chem Soc (B) Phys Org* **1971**, 1811-1817.
202. Wellner, A. unpublished results.
203. Pike, A. C. W.; Brzozowski, A. M.; Hubbard, R. E.; Bonn, T.; Thorsell, A.-G.; Engstrom, O.; Ljunggren, J.; Gustafsson, J.-A.; Carlquist, M., Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J* **1999**, 18, (17), 4608-4618.
204. Manas, E. S.; Xu, Z. B.; Unwalla, R. J.; Somers, W. S., Understanding the Selectivity of Genistein for Human Estrogen Receptor-[beta] Using X-Ray Crystallography and Computational Methods. *Structure* **2004**, 12, (12), 2197-2207.
205. Gyling, M.; Leclercq, G., Estrogen and antiestrogen interaction with estrogen receptor of MCF-7 cells--Relationship between processing and estrogenicity. *Journal of Steroid Biochemistry* **1988**, 29, (1), 1-8.
206. Soule, H. D.; Maloney, T. M.; Wolman, S. R.; Peterson, W. D., Jr.; Brenz, R.; McGrath, C. M.; Russo, J.; Pauley, R. J.; Jones, R. F.; Brooks, S. C., Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer Res* **1990**, 50, (18), 6075-6086.
207. Meegan, M. J.; Hughes, R. B.; Lloyd, D. G.; Williams, D. C.; Zisterer, D. M., Flexible Estrogen Receptor Modulators: Design, Synthesis, and Antagonistic Effects in Human MCF-7 Breast Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 44, (7), 1072-1084.
208. persönliche Mitteilung Ricarda Hoffmann.
209. Fulton, A. M.; Heppner, G. H., Relationships of Prostaglandin E and Natural Killer Sensitivity to Metastatic Potential in Murine Mammary Adenocarcinomas. *Cancer Res* **1985**, 45, (10), 4779-4784.
210. Herman, M. E.; Katzenellenbogen, B. S., Response-specific antiestrogen resistance in a newly characterized MCF-7 human breast cancer cell line resulting from long-term exposure to trans-hydroxytamoxifen. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1996**, 59, (2), 121-134.
211. Osborne, C. K.; Bardou, V.; Hopp, T. A.; Chamness, G. C.; Hilsenbeck, S. G.; Fuqua, S. A. W.; Wong, J.; Allred, D. C.; Clark, G. M.; Schiff, R., Role of the Estrogen Receptor Coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, 95, (5), 353-361.
212. Hurtado, A.; Holmes, K. A.; Geistlinger, T. R.; Hutcheson, I. R.; Nicholson, R. I.; Brown, M.; Jiang, J.; Howat, W. J.; Ali, S.; Carroll, J. S., Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature* **2008**, 456, (7222), 663-666.