

## Testergebnisse und Diskussion

## 5 Testergebnisse

### 5.1 Allgemeines

Die in dieser Arbeit synthetisierten und getesteten Verbindungen leiten sich in ihrer Struktur vom selektiven ER Modulator Tamoxifen (TAM) ab. Seine pharmakologischen Eigenschaften sind das Resultat der Fähigkeit, in Zielgeweben mit E2 um die Bindungsstelle in der LBD des ER zu konkurrieren. TAM selbst verhält sich als Prodrug, welches durch Hydroxylierung in *para*-Position des 1-Phenylrings zum 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) aktiviert wird<sup>[233]</sup>.

Die in dieser Arbeit präsentierten Triarylkene und die Leitstrukturen wurden zunächst auf ihre Affinität zum ER untersucht. Zur Charakterisierung der agonistischen bzw. antagonistischen Eigenschaften wurden die Substanzen einem Luciferase-Assay unterworfen. Abweichungen in den Werten von bis zu  $\pm 5\%$  relativer Aktivierung sind aufgrund der Testbedingungen tolerierbar.

Für die agonistische Wirkung ist die prozentuale Aktivierung in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  angegeben. Bei Verbindungen, die in dieser Konzentration aktiv sind, wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve über einen Bereich von 0.01 nM - 1  $\mu\text{M}$  aufgenommen.

Zum Vergleich der antagonistischen Wirkungen wird die  $\text{IC}_{50}$  [nM], d.h. die Konzentration, bei der eine Substanz die Wirkung von 1 nM Estradiol zu 50% hemmt, herangezogen. Bei Verbindungen, welche die Wirkung von Estradiol zu einem geringeren Maß inhibieren, wird auf die verbleibende prozentuale Aktivierung bei 1  $\mu\text{M}$  zurückgegriffen. Der erhaltene Wert stellt die verbleibende E2-induzierte Aktivierung dar (d. h. bei einer Aktivierung von 100% wird keine antagonistische Wirkung ausgeübt). Die antagonistische Wirkung würde erhalten, würde verbleibende E2 induzierte Aktivierung [%] von 100 subtrahiert. Die Konzentrations-Aktivierungs-Kurven aller untersuchten Substanzen sind im Anhang aufgeführt.

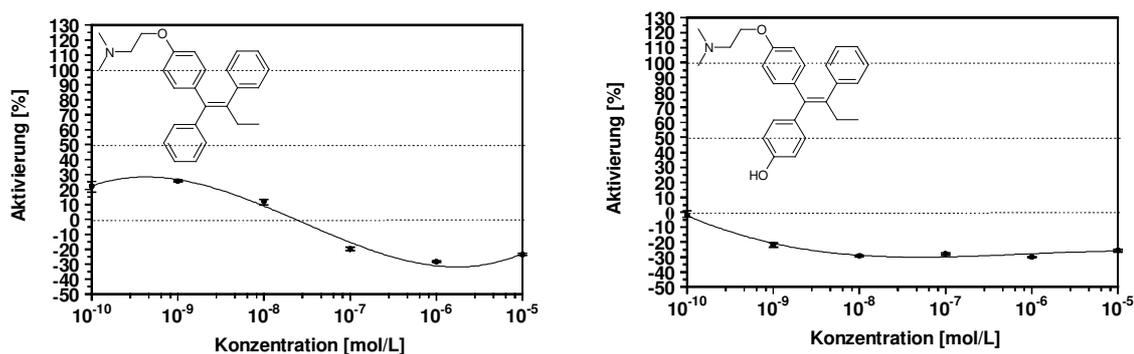
Da TAM und 4-OHT das Zellwachstum von MCF-7-Zellen hemmen, wird auch ein Teil der Verbindungen auf Proliferationsinhibition an MCF-7-Zellen untersucht, ausgewählte Verbindungen auch an MDA-MB-231-Zellen. Die maximale Hemmung  $T/C_{\text{korr}}$  [%] der jeweiligen Verbindung wird zur Diskussion herangezogen. Die Zeit-Wirkungs-Kurven aller untersuchten Substanzen sind im Anhang der Arbeit dargestellt.

## 5.2 Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen

### 5.2.1 Pharmakologische Eigenschaften der Leitstrukturen

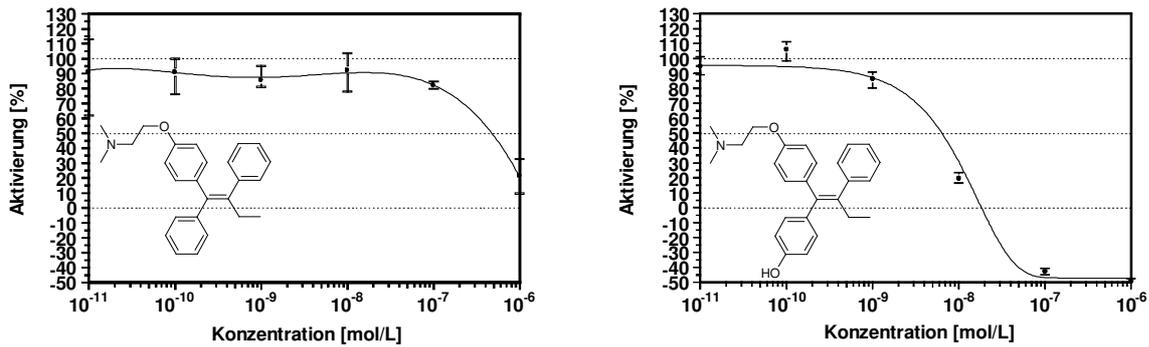
Im Konkurrenzexperiment mit  $^3\text{H}$ -Estradiol besitzt TAM einen RBA-Wert von 1.8%. Sein aktiver Metabolit 4-OHT weist eine 8-fach höhere Bindungsaffinität zum ER (RBA-Wert = 15.6%) auf.

An der humanen MCF-7-2a-Brustkrebszelllinie zeigten sowohl TAM als auch 4-OHT in diesem Assay kein agonistisches Potential (vgl. Abbildung 5.1). Die Menge exprimierter Luciferase scheint geringer zu sein als nach Zugabe des reinen Lösungsmittels, wodurch Werte unter Null zustande kommen. Solche Messwerte sind schon ein erster Hinweis auf eine potentielle zytotoxische Wirkung der jeweiligen Substanz, zumal die Ergebnisse der Proteinbestimmung auch abhängig von der Gesamtzahl der Zellen sind. Allerdings muss dieser Hinweis durch Untersuchungen an MCF-7-Zellen bestätigt werden.



**Abbildung 5.1** Agonistische Wirkung, Konzentrations-Aktivierungs-Kurven von TAM (links) und 4-OHT (rechts)

TAM und 4-OHT verhalten sich an der MCF-7-2a-Brustkrebszelllinie als reine Antiestrogene (Abbildung 5.2), wobei 4-OHT ( $\text{IC}_{50} = 7 \text{ nM}$ ) wiederum eine stärkere Wirkung entfaltet als TAM ( $\text{IC}_{50} = 500 \text{ nM}$ ). Von einem reinen Antiestrogen spricht man, wenn die untersuchte Verbindung neben ihrer antagonistischen Wirkung keine agonistische Wirkung aufweist.



**Abbildung 5.2** Antagonistische Wirkung, Konzentrations-Aktivierungs-Kurven von TAM (links) und 4-OHT (rechts)

Aufgrund dieser antagonistischen Wirkung von TAM und 4-OHT in MCF-7-2a-Zellen und der negativen Aktivierung im Test auf agonistische Wirkung, sollte auch das Wachstum von Brustkrebszellen durch Gabe von TAM oder 4-OHT beeinflusst werden. Bursch et al. <sup>[234]</sup> untersuchten den apoptotischen Einfluss von TAM auf Brustkrebszellen und kamen zu dem Ergebnis, dass Tamoxifen in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  innerhalb von 24 h zytotoxisch wirkt. Aus diesem Grund wurde die Wirkung auf die Proliferation von MCF-7 Zellen nur in den Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 0.5  $\mu\text{M}$  untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Leitstrukturen TAM und 4-OHT wachstumshemmend auf MCF-7-Zellen wirken (Abbildung 5.3). In der höchsten Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  hat TAM einen  $T/C_{\text{korrr}}$ -Wert von 12.1%, es übt also einen zytostatischen Effekt auf MCF-7-Zellen aus, 4-OHT ist etwas schwächer aktiv mit einer  $T/C_{\text{korrr}}$ -Wert von 26%, was einer starken antiproliferativen Wirkung gleichkommt. Die Wirkung von 4-OHT nimmt nicht im gleichen Maß bei den geringeren Konzentrationen ab, wie bei TAM.

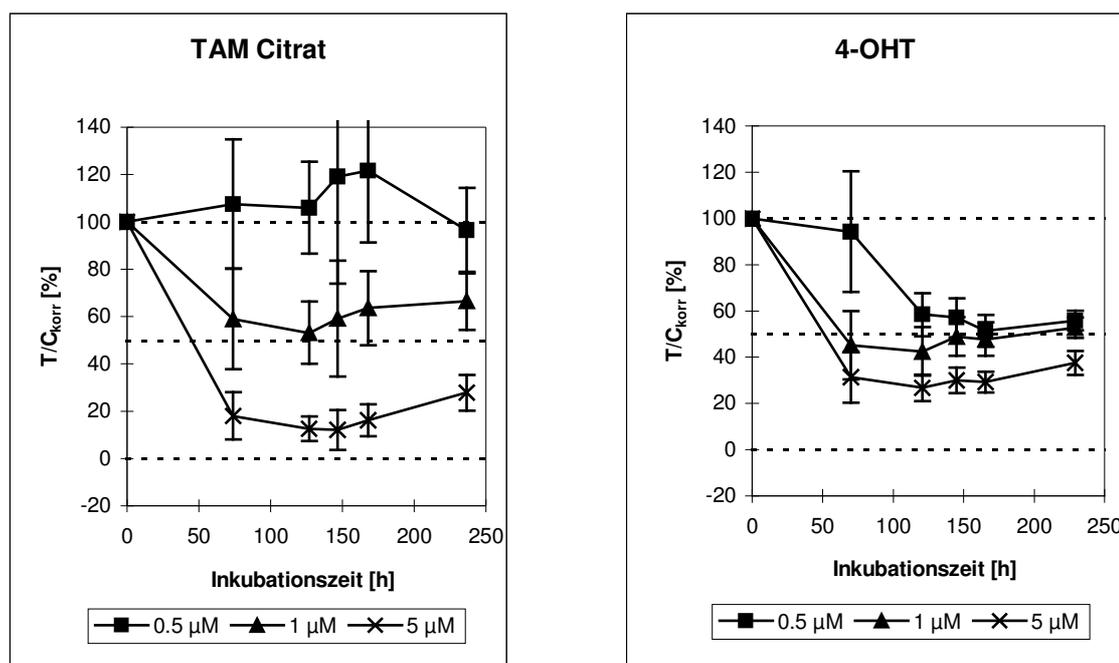


Abbildung 5.3 Konzentrations-Zeit-Kurven der Zytotoxizitätstests von TAM und 4-OHT

## 5.2.2 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkene und deren O-Methylether

### 5.2.2.1 Relative Bindungsaffinität zum ER

Bei den 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkenen besitzen **13a** (BisOHH) und **13b** (BisOHMe) mit 35.2% und 32.1% einen hohen RBA-Wert, der in Abhängigkeit von der C2-Alkylseitenkettenlänge in der Reihenfolge **13c** (BisOHEt) (5.3%) > **13d** (BisOHPr) (2.1%) > **13f** (BisOHHe) (1.5%) > **13e** (BisOHBu) (0.6%) fällt.

Die O-Methylderivate besitzen generell einen wesentlich geringeren RBA-Wert als die Hydroxyderivate. Der RBA-Wert steigt von **10a** (BisOMeH) (0.05%) über **10b** (BisOMeMe) (0.43%) bis zu **10c** (BisOMeEt) (0.55%), wo er ein Maximum erreicht, an und fällt dann wieder ab. **10d** (BisOMePr) besitzt einen RBA-Wert von 0.33%, die Butylverbindung **10e** (BisOMeBu) ist nur noch zu 0.02% in der Lage, E2 vom Rezeptor zu verdrängen und **10f** (BisOMeHe) besitzt keinen RBA-Wert.

**Tabelle 5.1** RBA-Werte der 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylethene und ihrer O-Methylether

Verbindung		RBA [%]	Verbindung		RBA [%]
<b>13</b>	BisOHH	35.20 <sup>a</sup>	<b>10a</b>	BisOMeH	0.05
<b>13b</b>	BisOHMe	32.10 <sup>a</sup>	<b>10b</b>	BisOMeMe	0.43
<b>13c</b>	BisOHEt	5.30 <sup>b</sup>	<b>10c</b>	BisOMeEt	0.55
<b>13d</b>	BisOHPr	2.10 <sup>a</sup>	<b>10d</b>	BisOMePr	0.33
<b>13e</b>	BisOHBu	0.62	<b>10e</b>	BisOMeBu	0.02
<b>13f</b>	BisOHHex	1.50	<b>10f</b>	BisOMeHex	0.00

Die gekennzeichneten Werte wurden von <sup>a</sup> Bachmann <sup>[149]</sup>, <sup>b</sup> Ball <sup>[235]</sup> bestimmt.

### 5.2.2.2 Agonistische Wirkung

Bei den 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkenen besitzt nur die Verbindung **13a** (BisOHH) mit 25.3% schwache agonistische Eigenschaften. In der Reihe der 1,1-Bis(4-methoxyphenyl)-2-phenylalkene besitzt ebenfalls nur die C2-H substituierte Verbindung **10a** eine geringe agonistische Aktivität mit 23.9%. Alle weiteren O-methylierten Verbindungen weisen keine agonistische Wirkung auf, die negativen Werte beruhen auf einer sehr geringen Zellzahl, was Anlass dazu gibt, auch die antiproliferativen Eigenschaften der 1,1-Bis(4-methoxyphenyl)-2-phenylalkene zu untersuchen.

**Tabelle 5.2** Agonistische Wirkung der 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylethene und ihrer O-Methylether

Verbindung		Agonistische Wirkung bei 1 $\mu$ M [%]	Verbindung		Agonistische Wirkung bei 1 $\mu$ M [%]
<b>13</b>	BisOHH	25.3 <sup>a</sup>	<b>10a</b>	BisOMeH	23.9
<b>13b</b>	BisOHMe	12.1 <sup>a</sup>	<b>10b</b>	BisOMeMe	-35.1
<b>13c</b>	BisOHEt	-9.6 <sup>a</sup>	<b>10c</b>	BisOMeEt	-66.1
<b>13d</b>	BisOHPr	13.3 <sup>a</sup>	<b>10d</b>	BisOMePr	-67.9
<b>13e</b>	BisOHBu	-16.0	<b>10e</b>	BisOMeBu	-68.6
<b>13f</b>	BisOHHe	-2.8	<b>10f</b>	BisOMeHe	-19.8

<sup>a</sup> Die gekennzeichneten Werte wurden von Bachmann <sup>[149]</sup> bestimmt.

### 5.2.2.3 Antagonistische Wirkung

Innerhalb der Reihe der C2-alkylsubstituierten BisOH-Verbindungen steigt die antagonistische Wirkung, ausgedrückt als IC<sub>50</sub>, von **13a** (BisOHH) (150 nM) zu **13b**

(BisOHMe) (30 nM) bis zu **13c** (BisOHEt) (15 nM). Eine weitere Verlängerung der Seitenkette führt zu einer Abnahme der antagonistischen Wirkung. Die propylsubstituierte Verbindung **13d** hat noch eine  $IC_{50}$  von 50 nM, die hexylsubstituierte Verbindung **13f** hat eine  $IC_{50}$  von 133 nM und die butylsubstituierte Verbindung **13e** besitzt die geringste antagonistische Wirkung mit einer  $IC_{50}$  von 500 nM.

Die O-methylierten Verbindungen sind auch im Luciferase-Assay weitaus weniger wirksam als die korrespondierenden BisOH-Verbindungen (siehe Tabelle 5.3). Keine der getesteten O-methylierten Verbindungen ist in der Lage, die E2-vermittelte Aktivierung zu 50% zu inhibieren.

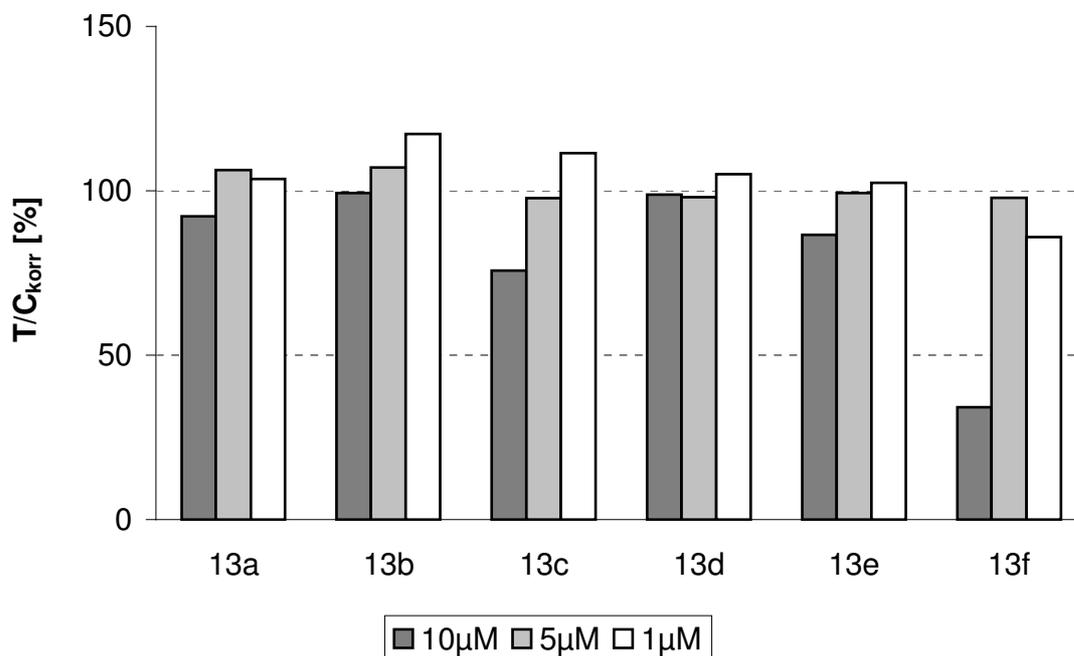
**Tabelle 5.3** Antagonistische Wirkung der 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylethene und ihrer O-Methylether

Verbindung		Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]	$IC_{50}$ [nM]	Verbindung		Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]
<b>13</b>	BisOHH	39.7	150 <sup>a</sup>	<b>10a</b>	BisOMeH	70.6
<b>13b</b>	BisOHMe	32.4	30 <sup>a</sup>	<b>10b</b>	BisOMeMe	87.3
<b>13c</b>	BisOHEt	8.7	15 <sup>a</sup>	<b>10c</b>	BisOMeEt	60.4
<b>13d</b>	BisOHPr	6.7	50	<b>10d</b>	BisOMePr	81.5
<b>13e</b>	BisOHBu	21.4	500	<b>10e</b>	BisOMeBu	56.0
<b>13f</b>	BisOHHe	30.8	133	<b>10f</b>	BisOMeHe	105.0

<sup>a</sup> Die gekennzeichneten Werte wurden von Bachmann <sup>[149]</sup> bestimmt.

#### 5.2.2.4 Ergebnisse der Zytotoxizitätstest an der MCF-7-Zelllinie

Von den hydroxysubstituierten Verbindungen besitzt nur **13f** (BisOHHe) in der höchsten Testkonzentration von 10  $\mu$ M eine antiproliferative Wirkung, mit einem  $T/C_{\text{korr}}$ -Wert von 34.1%. Die übrigen Verbindungen zeigen keine proliferationshemmende Wirkung (Abbildung 5.4).

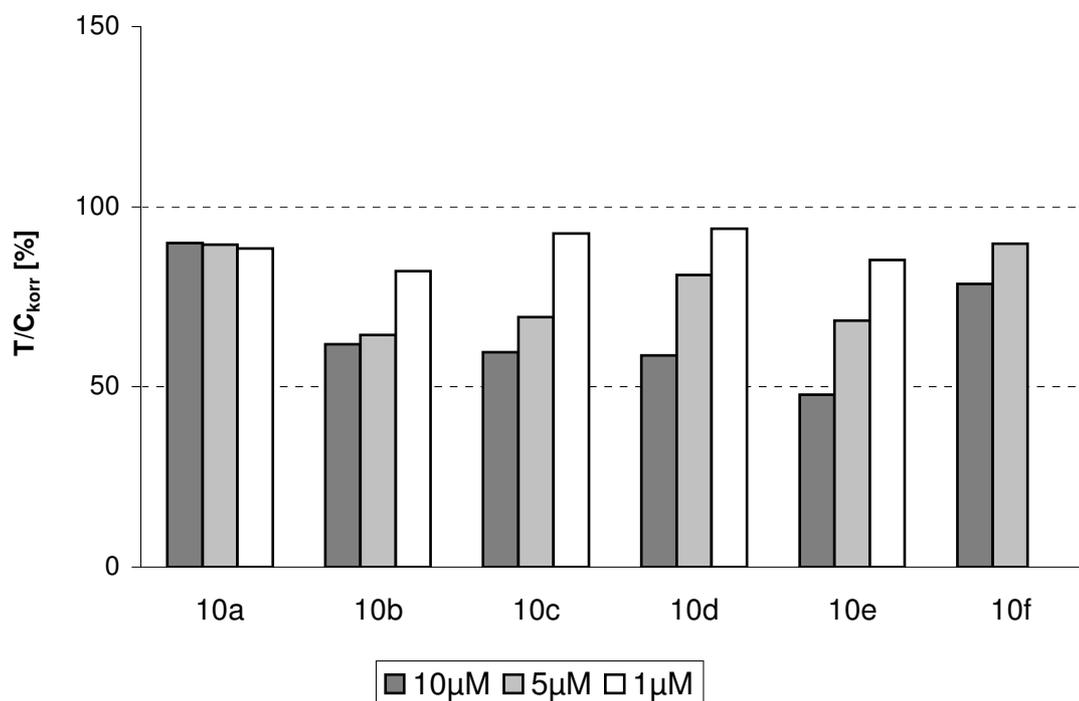


Verbindung	Minimale T/C <sub>korr</sub> -Werte [%]					
	10 μM	t <sub>min</sub> [h]	5 μM	t <sub>min</sub> [h]	1 μM	t <sub>min</sub> [h]
<b>13</b> BisOHH	92.2	72.8	106.3	166.5	103.5	166.5
<b>13b</b> BisOHMe	99.4	166.5	107.1	190.9	117.3	190.9
<b>13c<sup>a</sup></b> BisOHEt	75.8	142.8	97.7	142.8	111.5	69.0
<b>13d</b> BisOHPr	98.8	142.8	98.0	72.8	105.0	190.9
<b>13e</b> BisOHBu	86.5	142.8	99.4	72.8	102.4	190.9
<b>13f</b> BisOHHe	34.1	142.8	97.9	166.5	86.0	72.8

**Abbildung 5.4** Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkene,

<sup>a</sup> die gekennzeichneten Werte wurden von Bachmann <sup>[149]</sup> bestimmt.

Auch die 1,1-Bis(4-methoxyphenyl)-2-phenylalkene wurden auf ihre proliferationshemmenden Eigenschaften untersucht, die Ergebnisse sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Im Vergleich zu den Hydroxyverbindungen kann eine leichte Steigerung der antiproliferativen Potenz außer für das Hexylderivat **10f** festgestellt werden. Die höchste antiproliferative Wirkung dieser Reihe wird von **10e** (BisOMeBu) mit einem T/C<sub>korr</sub>-Wert von 47.8% erreicht.



Verbindung	Minimale T/C <sub>kor</sub> r-Werte [%]					
	10 μM	t <sub>min</sub> [h]	5 μM	t <sub>min</sub> [h]	1 μM	t <sub>min</sub> [h]
<b>10a</b> BisOMeH	89.9	141.6	89.4	73.4	88.4	73.4
<b>10b</b> BisOMeMe	61.8	72.8	64.4	72.8	82.1	72.8
<b>10c</b> BisOMeEt	59.6	72.8	69.4	72.8	92.5	166.5
<b>10d</b> BisOMePr	58.8	73.4	81.1	175.6	93.9	175.6
<b>10e</b> BisOMeBu	47.8	121.5	68.4	121.5	85.2	73.4
<b>10f</b> BisOMeHe	78.6	73.4	89.7	73.4	-	-

Abbildung 5.5 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der 1,1-Bis(4-methoxyphenyl)-2-phenylalkene

## 5.2.3 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene und deren O-Methylether

### 5.2.3.1 Relative Bindungsaffinität zum ER

Die RBA-Werte der 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene verhalten sich ähnlich den RBA-Werten der 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkene, wie in Tabelle 5.4 aufgeführt. Die Affinität sinkt in der Reihenfolge: **14a** TrisOHH  $\approx$  **14b** TrisOHMe (45.5% bzw. 52.1%) > **14c** TrisOHEt (29.6%) > **14d** TrisOHPr (4.03%) > **14e** TrisOHBu (0.95%) > **14f** TrisOHHe (0.83%). Die O-methylierten Verbindung weisen erneut

wesentlich geringere RBA-Werte und ein unregelmäßiges Verhalten auf. Die hexyl-substituierte Verbindung besitzt keine Rezeptoraffinität.

**Tabelle 5.4** RBA-Werte der 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)ethene und ihrer O-Methylether

Verbindung	RBA [%]	Verbindung	RBA [%]
<b>14a</b> TrisOHH	45.50 <sup>a</sup>	<b>11a</b> TrisOMeH	0.06
<b>14b</b> TrisOHMe	52.10 <sup>a</sup>	<b>11b</b> TrisOMeMe	1.05
<b>14c</b> TrisOHEt	29.60 <sup>a</sup>	<b>11c</b> TrisOMeEt	0.26
<b>14d</b> TrisOHPr	4.03	<b>11d</b> TrisOMePr	0.34
<b>14e</b> TrisOHBu	0.95	<b>11e</b> TrisOMeBu	0.09
<b>14f</b> TrisOHHe	0.83	<b>11f</b> TrisOMeHe	0.00

<sup>a</sup> Die gekennzeichneten Werte wurden von Bachmann <sup>[149]</sup> bestimmt

### 5.2.3.2 Agonistische Wirkung

In der Reihe der 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene weist die Verbindung **14a** (TrisOHH) die höchste agonistische Aktivität mit 60.0% auf. Die Verbindung **14b** (TrisOHMe) besitzt noch eine Aktivität von 35.0%, alle längerkettigen Verbindungen wirken nicht mehr agonistisch. Die 1,1,2-Tris(4-methoxyphenyl)alkene **11a - 11f** besitzen keine agonistische Wirkung.

**Tabelle 5.5** Agonistische Wirkung der 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)ethene und ihrer O-Methylether

Verbindung	Agonistische Wirkung bei 1 $\mu$ M [%]	Verbindung	Agonistische Wirkung bei 1 $\mu$ M [%]
<b>14a</b> TrisOHH	60.0 <sup>a</sup>	<b>11a</b> TrisOMeH	13.1
<b>14b</b> TrisOHMe	35.0 <sup>a</sup>	<b>11b</b> TrisOMeMe	14.0
<b>14c</b> TrisOHEt	0.0 <sup>a</sup>	<b>11c</b> TrisOMeEt	9.9
<b>14d</b> TrisOHPr	-4.0	<b>11d</b> TrisOMePr	12.4
<b>14e</b> TrisOHBu	-27.8	<b>11e</b> TrisOMeBu	10.4
<b>14f</b> TrisOHHe	-3.9	<b>11f</b> TrisOMeHe	1.4

<sup>a</sup> Die gekennzeichneten Werte wurden von Bachmann <sup>[149]</sup> bestimmt.

### 5.2.3.3 Antagonistische Wirkung

In der Reihe der 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene steigt die antagonistische Wirkung von TrisOHH ( $IC_{50} = 200$  nM) < TrisOHMe ( $IC_{50} = 15$  nM) = TrisOHEt ( $IC_{50} = 10$  nM) und nimmt dann in der Reihenfolge TrisOHPr ( $IC_{50} = 70$  nM) > TrisOHHe ( $IC_{50} = 60$  nM) > TrisOHBu ( $IC_{50} = 240$  nM) wieder ab (siehe Tabelle 5.6). In der Reihe der 1,1,2-Tris(4-methoxyphenyl)alkene ist eine leichte Wirkungssteigerung gegenüber den korrespondierenden BisOMe-Verbindungen (siehe Abschnitt 5.2.2.3) zu beobachten. Die antagonistische Wirkung nimmt zunächst mit steigender C2-Seitenkettenlänge von **11a** bis **11d** (TrisOMePr) (43.8% bei 1  $\mu$ M;  $IC_{50} = 500$  nM) zu; bei weiterer Kettenverlängerung nimmt die Wirkung wieder ab, TrisOMeHe besitzt keine antagonistische Wirkung mehr.

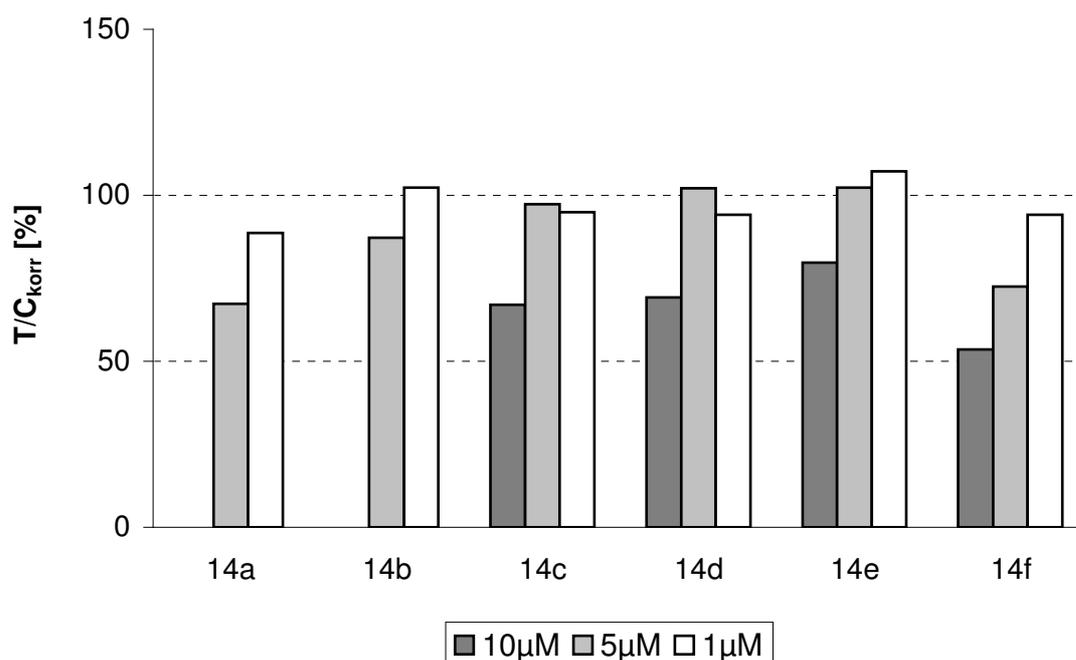
**Tabelle 5.6** Antagonistische Wirkung der 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)ethene und ihrer O-Methylether

Verbindung		Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]	$IC_{50}$ [nM]	Verbindung		Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]	$IC_{50}$ [nM]
<b>14a</b>	TrisOHH	48.8	200	<b>11a</b>	TrisOMeH	88.5	-
<b>14b</b>	TrisOHMe	29.3	15	<b>11b</b>	TrisOMeMe	92.7	-
<b>14c</b>	TrisOHEt	1.5	10 <sup>a</sup>	<b>11c</b>	TrisOMeEt	51.0	-
<b>14d</b>	TrisOHPr	1.5	70	<b>11d</b>	TrisOMePr	43.8	500
<b>14e</b>	TrisOHBu	-0.3	240	<b>11e</b>	TrisOMeBu	61.2	-
<b>14f</b>	TrisOHHe	-5.8	60	<b>11f</b>	TrisOMeHe	110.0	-

<sup>a</sup> Die gekennzeichneten Werte wurden von Bachmann <sup>[149]</sup> bestimmt.

### 5.2.3.4 Ergebnisse der Zytotoxizitätstest an der MCF-7-Zelllinie

In der höchsten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  liegt die Hemmung des Zellwachstums bei den 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkenen, wie aus Abbildung 5.6 hervorgeht, zwischen 53.5% und 80%. Die stärkste proliferationshemmende Wirkung wird von **14f** TrisOH-He mit einen  $T/C_{\text{korr}}$  Wert von 58.7% ausgeübt.

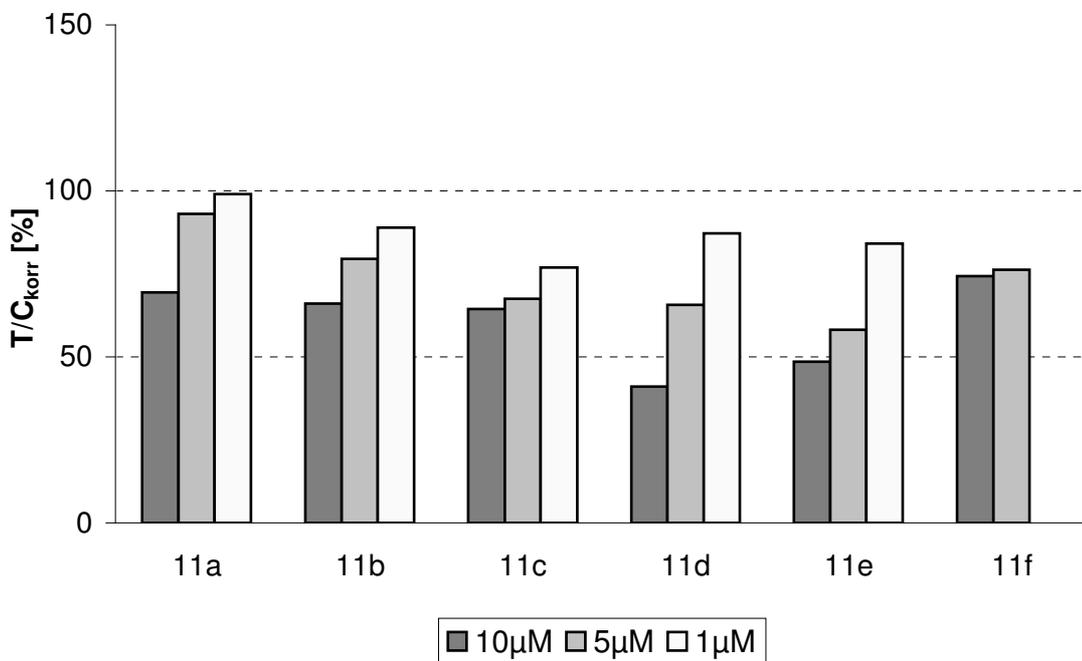


Verbindung	Minimale $T/C_{\text{korr}}$ -Werte [%]					
	10 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]	5 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]	1 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]
<b>14a</b> TrisOHH	-		67.3	69.0	88.6	143.0
<b>14b</b> TrisOHMe	-		87.2	119.0	102.3	167.0
<b>14c</b> TrisOHEt	67.0	167.7	97.2	119.6	94.8	146.0
<b>14d</b> TrisOHPr	69.3	70.1	102.1	70.1	94.1	70.1
<b>14e</b> TrisOHBu	79.7	70.1	102.2	165.5	107.2	70.1
<b>14f</b> TrisOHHe	53.5	165.5	72.5	165.5	94.1	120.8

**Abbildung 5.6** Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene

Die zytotoxische Wirkung der 1,1,2-Tris(4-methoxyphenyl)alkene ist stärker ausgeprägt als die der vergleichbaren TrisOH-Verbindungen. **11d**, das auch die stärkste antagonistische Wirkung in dieser Reihe besitzt, übt den stärksten Einfluss auf das

Zellwachstum mit einem  $T/C_{\text{korr}}$ -Wert von 41.1% in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  aus.



Verbindung	Minimale $T/C_{\text{korr}}$ -Werte [%]					
	10 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]	5 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]	1 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]
<b>11a</b> TrisOMeH	69.4	72.8	93.2	142.8	99.1	142.8
<b>11b</b> TrisOMeMe	66.1	72.8	79.5	72.8	88.9	72.8
<b>11c</b> TrisOMeEt	64.6	72.8	67.4	72.8	77.0	72.8
<b>11d</b> TrisOMePr	41.1	121.5	65.7	141.6	87.1	73.4
<b>11e</b> TrisOMeBu	48.5	121.5	58.2	121.5	84.2	141.6
<b>11f</b> TrisOMeHe	74.4	72.8	76.3	72.8	-	-

**Abbildung 5.7** Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der 1,1,2-Tris(4-methoxyphenyl)alkene

## 5.2.4 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-(3-fluor-4-hydroxyphenyl)alkene und deren O-Methylether

### 5.2.4.1 Relative Bindungsaffinität zum ER

Der RBA-Wert der 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-(3-fluor-4-hydroxyphenyl)alkene sinkt in der Reihenfolge: **12a** (FTrisOHH) (44.1%) > **12b** (FTrisOHMe) (25.1%) > **12c** (FTrisOHEt) (6.85%) > **12d** (FTrisOHPr) (2.07%) > **12e** FTrisOHBu (1.00%) (siehe Tabelle 5.7). Die O-methylierten Verbindungen weisen geringere RBA-Werte auf.

**Tabelle 5.7** RBA-Werte der fluorierten Verbindungen

Verbindung	RBA [%]	Verbindung	RBA [%]
<b>15a</b> FTrisOHH	44.10	<b>12a</b> FTrisOMeH	0.00
<b>15b</b> FTrisOHMe	25.10	<b>12b</b> FTrisOMeMe	0.70
<b>15c</b> FTrisOHEt	6.85	<b>12c</b> FTrisOMeEt	0.42
<b>15d</b> FTrisOHPr	2.07	<b>12d</b> FTrisOMePr	0.34
<b>15e</b> FTrisOHBu	1.00	<b>12e</b> FTrisOMeBu	0.07

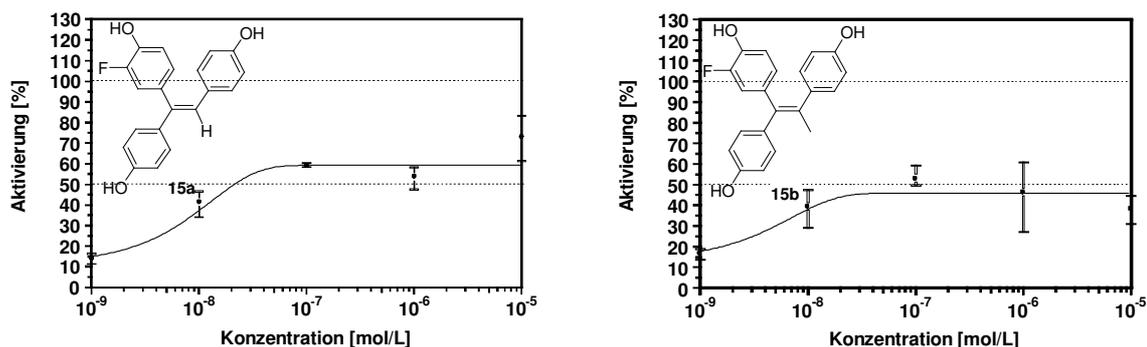
### 5.2.4.2 Agonistische Wirkung

Bei den 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-(3-fluor-4-hydroxyphenyl)ethenen (siehe Tabelle 5.8) kann dieselbe Tendenz beobachtet werden, wie bei den 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkenen. Die agonistische Wirkung nimmt mit steigender Kettenlänge an C2 von 53.7% für **15a** (FTrisOHH) < 46.4% für **15b** (FTrisOHMe) < 25.9% für **15c** (FTrisOHEt) < 0.2% für **15d** (FTrisOHPr) = -1.9% für **15e** (FTrisOHBu).

Die agonistische Wirkung der O-methylierten Verbindungen ist äußerst gering bis nicht vorhanden; nur die C2-H substituierte Verbindung **12a** ist mit 16% schwach agonistisch wirksam.

**Tabelle 5.8** Agonistische Wirkung der fluorierten Verbindungen

Verbindung	Agonistische Wirkung bei 1 $\mu$ M [%]	Verbindung	Agonistische Wirkung bei 1 $\mu$ M [%]
<b>15a</b> FTrisOHH	53.7	<b>12a</b> FTrisOMeH	16.0
<b>15b</b> FTrisOHMe	46.4	<b>12b</b> FTrisOMeMe	-2.0
<b>15c</b> FTrisOHEt	25.9	<b>12c</b> FTrisOMeEt	-17.7
<b>15d</b> FTrisOHPr	0.2	<b>12d</b> FTrisOMePr	-16.9
<b>15e</b> FTrisOHBu	-1.9	<b>12e</b> FTrisOMeBu	-18.1

**Abbildung 5.8** Agonistische Wirkung; links: **15a**, rechts: **15b**, Konzentrations-Wirkungskurven

### 5.2.4.3 Antagonistische Wirkung

Die antagonistische Wirkung der 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-(3-fluor-4-hydroxyphenyl)alkene steigt von **15a** (FTrisOHH) (62.1% bei 1  $\mu$ M) = **15b** (FTrisOHMe) (72.6% bei 1  $\mu$ M) < **15c** FTrisOHEt (29.0% bei 1  $\mu$ M, IC<sub>50</sub> = 60 nM) < **15d** FTrisOHPr (8.9% bei 1  $\mu$ M, IC<sub>50</sub> = 20 nM) < **15e** FTrisOHBu (18.9% bei 1  $\mu$ M, IC<sub>50</sub> = 11 nM) an (siehe Tabelle 5.9). Die Verbindungen **15a** - **15c** wirken als partielle Antiestrogene. Die Verbindungen **15d** FTrisOHPr und **15e** FTrisOHBu, die beide keine agonistische Wirkung besitzen (siehe Tabelle 5.9), erreichen im Test auf antagonistische Wirkung eine nahezu vollständige Hemmung der E2-induzierten Aktivierung mit verbleibenden 8.9% bzw. 18.9% Aktivierung nach Zugabe von 1  $\mu$ M der Testsubstanz.

Die antagonistische Wirkung der 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)-1-(3-fluor-4-methoxyphenyl)alkene steigt von **12a** (FTrisOMeH) (71.9% bei 1  $\mu$ M) zu **12b** FTrisOMeMe (55.6% bei 1  $\mu$ M) = **12c** (FTrisOMeEt) (55.7% bei 1  $\mu$ M) = **12d** FTrisOMePr (55.2% bei 1  $\mu$ M). Erst die Verbindung **12e** FTrisOMeBu (70.9% bei 1  $\mu$ M) weist wieder eine schwächere Wirkung auf. Damit ist die O-methylierte Verbindung **12b** sogar etwas stärker antagonistisch wirksam als die vergleichbare hydroxylierte Verbindung **15b**, was eventuell durch die bei **15b** gemessene partielle agonistische Aktivität hervorgerufen wird.

**Tabelle 5.9** Antagonistische Wirkung der fluorierten Verbindungen

Verbindung	Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [nM]	Verbindung	Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]
<b>15a</b> FTrisOHH	62.1	-	<b>12a</b> FTrisOMeH	71.9
<b>15b</b> FTrisOHMe	72.6	-	<b>12b</b> FTrisOMeMe	55.6
<b>15c</b> FTrisOHEt	29.0	60	<b>12c</b> FTrisOMeEt	55.7
<b>15d</b> FTrisOHPr	8.9	20	<b>12d</b> FTrisOMePr	55.2
<b>15e</b> FTrisOHBu	18.9	11	<b>12e</b> FTrisOMeBu	70.9

## 5.2.5 Seitenkettensubstituierte Triarylalkene

### 5.2.5.1 Relative Bindungsaffinität zum ER

Die Einführung von Substituenten an der Seitenkette führt zu einem Wirkungsverlust der Verbindungen. Einzig **13g** (BisOHPrCN) besitzt einen RBA von 1.5%, das Amin **13h**, und die Amide **18a** und **18b** besitzen einen RBA-Wert < 0.1%

**Tabelle 5.10** RBA-Werte der substituierten 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)alkene, ihrer O-Methylether und Ester

Verbindung	RBA [%]	Verbindung	RBA [%]
<b>13g</b> BisOHPrCN	1.50	<b>10g</b> BisOMeEtCN	0.05
<b>13h</b> BisOHPrNH <sub>2</sub>	0.07	<b>10h</b> BisOMePrCN	0.01
<b>18a</b> BisOHPrNHAc	0.03	<b>10i</b> BisOMePrSre	0.01
<b>18b</b> BisOHPrNHP	0.03	<b>10j</b> BisOMePrNH <sub>2</sub>	0.05
		<b>16a</b>	0.05
		<b>16b</b>	0.05

Auch bei den 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkenen mit substituierter Seitenkette zeigt sich eine Abschwächung des RBA-Werts. Hier sinkt der RBA in der Reihenfolge **14g** (TrisOHPrCN) (0.67%) > **14h** TrisOHPrNH<sub>2</sub> (0.24%) = **19a** TrisOHPrNHAc (0.24%) > **19b** (TrisOHPrNHP) (0.13%). Die beiden veresterten Verbindungen **17a** und **17b** liegen mit Werten von 0.06% bzw. 0.03% in selben Bereich wie die korrespondierenden nur zweifach veresterten Verbindungen. Die Nitrile **11g** und **11h** besitzen RBA-Werte von 0.62% und 0.33%. Die Derivatisierung zum jeweiligen Amin **11j**

TrisOMePrNH<sub>2</sub> und **11k** TrisOMeBuNH<sub>2</sub> führt zu einem Wirkungsverlust RBA-Wert < 0.1%, ebenso wie die Hydrolyse des Nitrils zur Säure **11i** TrisOMePrSre.

**Tabelle 5.11** RBA-Werte der substituierten 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene, ihrer O-Methylether und Ester

Verbindung	RBA [%]	Verbindung	RBA [%]
<b>14g</b> TrisOHPrCN	0.67	<b>11g</b> TrisOMeEtCN	0.62
<b>14h</b> TrisOHPrNH <sub>2</sub>	0.24	<b>11h</b> TrisOMePrCN	0.33
<b>14i</b> TrisOHBuNH <sub>2</sub>	0.2	<b>11i</b> TrisOMePrSre	0.01
<b>19a</b> TrisOHPrNHAc	0.24	<b>11j</b> TrisOMePrNH <sub>2</sub>	0.01
<b>19b</b> TrisOHPrNHP	0.13	<b>11k</b> TrisOMeBuNH <sub>2</sub>	0.06
		<b>17a</b>	0.06
		<b>17b</b>	0.03

### 5.2.5.2 Agonistische Wirkung

Bei den substituierten 1,1-Bis(4-methoxyphenyl)-2-phenylalkenen konnte nur für **10i** eine leichte agonistische Wirkung mit 27.9% bestimmt werden. Alle weiteren O-methyl-Verbindungen besitzen keine agonistische Wirkung. Die substituierten 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkene weisen keine agonistische Wirkung auf. Das Propionsäureamid **16b** zeigt eine schwache agonistische Wirkung mit 21.3%.

**Tabelle 5.12** Agonistische Wirkung der substituierten 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkene, ihrer O-Methylether und Ester

Verbindung	Agonistische Wirkung bei 1 µM [%]	Verbindung	Agonistische Wirkung bei 1 µM [%]
<b>13g</b> BisOHPrCN	-1.3	<b>10g</b> BisOMeEtCN	-10.5
<b>13h</b> BisOHPrNH <sub>2</sub>	8.6	<b>10h</b> BisOMePrCN	-12.7
<b>18a</b> BisOHPrNHAc	5.0	<b>10i</b> BisOMePrSre	27.9
<b>18b</b> BisOHPrNHP	11.0	<b>10j</b> BisOMePrNH <sub>2</sub>	13.6
		<b>16a</b>	7.9
		<b>16b</b>	21.3

In der Reihe der korrespondierenden TrisOH-Verbindungen besitzt **14h** (TrisOHPrNH<sub>2</sub>) als einzige eine agonistische Wirkung mit 34.2%. Weder bei den substituierten TrisOMe-Verbindungen konnte eine agonistische Aktivität ermittelt werden, noch bei **17a** und **17b**.

**Tabelle 5.13** Agonistische Wirkung der substituierten 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene, ihrer O-Methylether und Ester

Verbindung	Agonistische Wirkung bei 1 $\mu$ M [%]	Verbindung	Agonistische Wirkung bei 1 $\mu$ M [%]
<b>14g</b> TrisOHPrCN	0.5	<b>11g</b> TrisOMeEtCN	-19.9
<b>14h</b> TrisOHPrNH <sub>2</sub>	34.2	<b>11h</b> TrisOMePrCN	-11.9
<b>14i</b> TrisOHBuNH <sub>2</sub>	-2.8	<b>11i</b> TrisOMePrSre	-5.6
<b>19a</b> TrisOHPrNHAc	4.5	<b>11j</b> TrisOMePrNH <sub>2</sub>	5.7
<b>19b</b> TrisOHPrNHP	-11.1	<b>11k</b> TrisOMeBuNH <sub>2</sub>	1.8
		<b>17a</b>	9.0
		<b>17b</b>	12.9

### 5.2.5.3 Antagonistische Wirkung

Die hydroxylierten Verbindungen sind auch in dieser Reihe wirksamer als die O-methylierten, wie in der Tabelle 5.14 zu erkennen ist. Die antagonistische Wirkung sinkt in der Reihe: **13g** (BisOHPrCN) (17.7% bei 1  $\mu$ M, IC<sub>50</sub> = 330 nM) > **13h** (BisOHPrNH<sub>2</sub>) (63.8% bei 1  $\mu$ M) = **18a** (BisOHPrNHAc) (61.9% bei 1  $\mu$ M) > **18b** (BisOHPrNHP) (68.5% bei 1  $\mu$ M). Die substituierten 1,1-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-phenylalkene besitzen keine, beziehungsweise nur eine schwache antagonistische Wirkung. In einer Konzentration von 1  $\mu$ M konnten für **10g** (95.8%) und **10i** (92.1%) keine antagonistische Wirkung gemessen werden, für **10h** (BisOMePrCN) und **10j** (BisOMePrNH<sub>2</sub>) wurde eine Aktivierung von 71.5% bzw. 73.7% bestimmt. **16a** besitzt eine IC<sub>50</sub> von 450 nM, sein um eine CH<sub>2</sub>-Einheit höheres homologes **16b** ist fast nicht mehr antagonistisch wirksam (80.2%).

**Tabelle 5.14** Antagonistische Wirkung der substituierten 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylalkene und ihrer O-Methylether

Verbindung	Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [nM]	Verbindung	Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [nM]
<b>13g</b> BisOHPrCN	17.7	330	<b>10g</b> BisOMeEtCN	95.8	-
<b>13h</b> BisOHPrNH <sub>2</sub>	63.8	-	<b>10h</b> BisOMePrCN	71.5	-
<b>18a</b> BisOHPrNHAc	61.9	1500	<b>10i</b> BisOMePrSre	92.1	-
<b>18b</b> BisOHPrNHP	68.5	6950	<b>10j</b> BisOMePrNH <sub>2</sub>	73.7	-
			<b>16a</b>	37.1	450
			<b>16b</b>	80.2	-

Bei den 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkenen (siehe Tabelle 5.15) ist **14g** (TrisOHPrCN) die aktivste Verbindung (30.6% bei 1  $\mu$ M,  $IC_{50}$  = 270 nM) gefolgt von **19a** (TrisOHPrNHAc) (41.5% bei 1  $\mu$ M;  $IC_{50}$  = 670 nM), **19b** (TrisOHPrNHP) (50.0% bei 1  $\mu$ M;  $IC_{50}$  = 1000 nM). Schwach wirksam sind die Amine **14h** (72.1%) und **14i** (69.1%).

In der Reihe der TrisOMe-Verbindungen sind die **11g** (TrisOMeEtCN) und **11h** (TrisOMePrCN) am wirksamsten ( $IC_{50}$  = 1000 nM). Die beiden Amine **11j** und **11k** sind schwächer antagonistisch wirksam mit einer Aktivierung von 67.7% bzw. 65.8%, die Säure **11i** (86.3%) wirkt fast nicht antagonistisch.

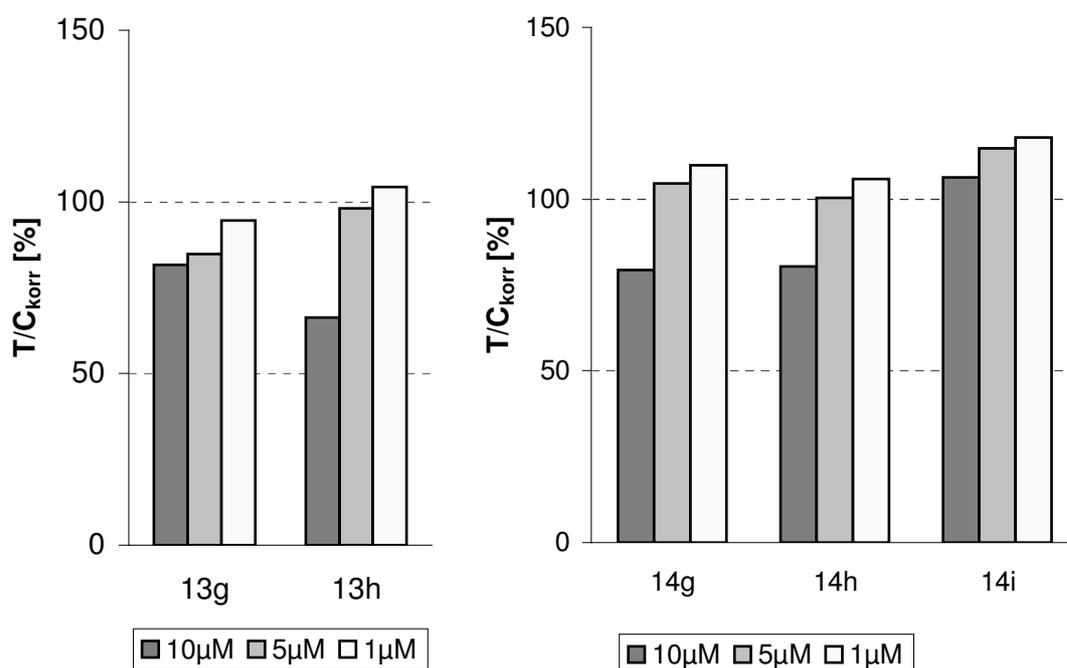
**17a** weist eine  $IC_{50}$  von 970 nM auf, das homologe **17b** besitzt eine wesentlich schwächere antagonistische Wirkung mit einer Aktivierung von 85.1%.

**Tabelle 5.15** Antagonistische Wirkung der substituierten 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene, ihrer O-Methylether und Ester

Verbindung	Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]	$IC_{50}$ [nM]	Verbindung	Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]	$IC_{50}$ [nM]
<b>14g</b> TrisOHPrCN	30.6	270	<b>11g</b> TrisOMeEtCN	50.7	1000
<b>14h</b> TrisOHPrNH <sub>2</sub>	72.1	3200	<b>11h</b> TrisOMePrCN	49.8	1000
<b>14i</b> TrisOHBuNH <sub>2</sub>	69.1	-	<b>11i</b> TrisOMePrSre	86.3	-
<b>19a</b> TrisOHPrNHAc	41.5	670	<b>11j</b> TrisOMePrNH <sub>2</sub>	67.7	-
<b>19b</b> TrisOHPrNHP	50	1000	<b>11k</b> TrisOMeBuNH <sub>2</sub>	65.8	-
			<b>17a</b>	49.3	970
			<b>17b</b>	85.1	-

#### 5.2.5.4 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests an der MCF-7-Zelllinie

Die 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)alkene **13g** und **13h** sind mit  $T/C_{\text{kor}}$ -Werten von 81.6% bzw. 66.3% in einer Konzentration von 10  $\mu$ M nicht in der Lage die Zellproliferation von MCF-7-Zellen nennenswert zu beeinflussen (Abbildung 5.9, links oben). Auch die 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene **14g** - **14i** können in der höchsten Konzentration, wie in der Abbildung 5.9, rechts oben zu erkennen, kaum Einfluss auf das Wachstum der MCF-7-Zellen ausüben.

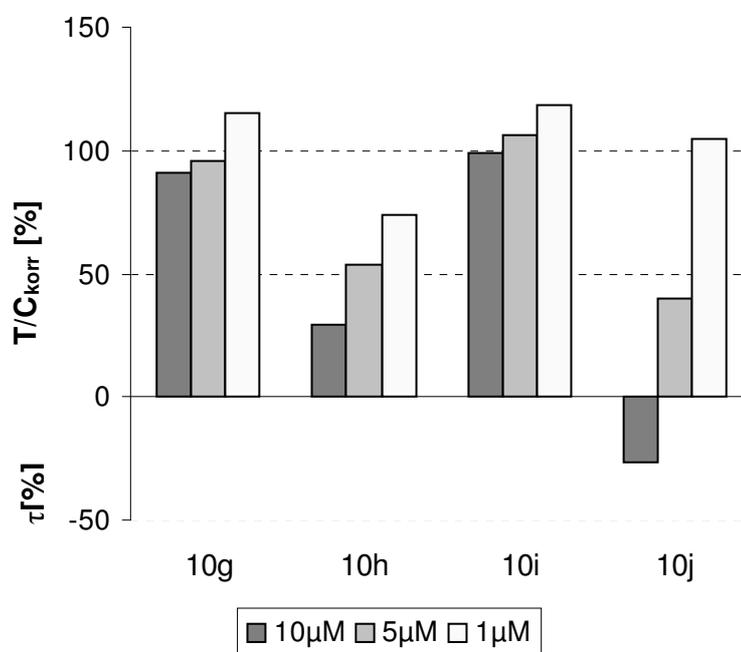


Verbindung	Minimale T/C <sub>korr</sub> -Werte [%]					
	10 μM	t <sub>min</sub> [h]	5 μM	t <sub>min</sub> [h]	1 μM	t <sub>min</sub> [h]
<b>13g</b> BisOHPrCN	81.6	117.2	84.7	117.2	94.6	117.2
<b>13h</b> BisOHPrNH <sub>2</sub>	66.3	117.2	98.14	117.2	104.3	138.9
<b>14g</b> TrisOHPrCN	79.3	163.5	104.63	138.9	109.81	163.5
<b>14h</b> TrisOHPrNH <sub>2</sub>	80.5	73.7	100.39	73.7	105.8	213.8
<b>14i</b> TrisOHBuNH <sub>2</sub>	106.3	73.7	114.9	145.0	118.0	115.0

**Abbildung 5.9** Ergebnisse der Zytotoxizitätstests links oben: substituierte 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-phenylethene; rechts oben: substituierte 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)alkene

Untersucht man das proliferationshemmende Verhalten der O-methylierten Verbindungen (Abbildung 5.10), lassen sich für **10j** (BisOMePrNH<sub>2</sub>) in der höchsten Konzentration zytozide Eigenschaften ermitteln (T/C<sub>korr</sub> = -26.6%); in einer Konzentration von 5 μM besitzt es antiproliferative Eigenschaften (T/C<sub>korr</sub> = 39.8%), die in der geringsten Konzentration (T/C<sub>korr</sub> = 98%) nicht mehr vorhanden sind. **10h** (BisOMePrCN) besitzt in der höchsten Konzentration von 10 μM schwächere zytotoxische Eigenschaften (T/C<sub>korr</sub> = 29.5%), jedoch wird das Zellwachstum in allen Testkonzentrationen beeinflusst. **10g** (BisOMeEtCN) ist nicht wirksam (T/C<sub>korr</sub> = 98.8% bei 10 μM),

auch **10i** (BisOMePrSre) hat keinen Einfluss auf die Zellproliferation ( $T/C_{\text{korr}} = 90.7\%$  bei  $10 \mu\text{M}$ ).

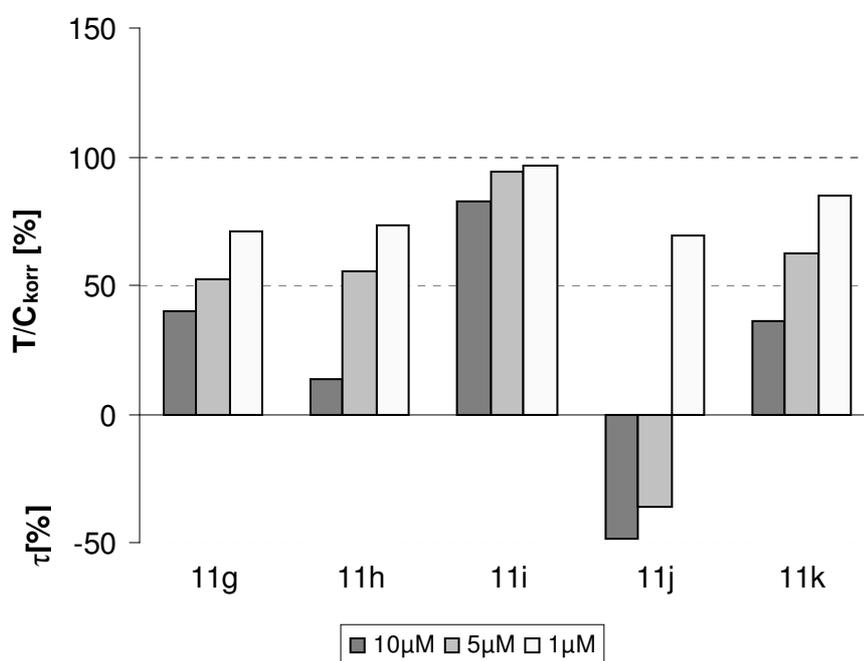


Verbindung	Minimale $T/C_{\text{korr}}$ - Werte [%]					
	10 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]	5 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]	1 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]
<b>10g</b> BisOMeEtCN	98.8	146.0	106.1	146.0	106.7	167.7
<b>10h</b> BisOMePrCN	29.5	73.9	53.9	73.9	73.6	123.1
<b>10i</b> BisOMePrSre	90.7	73.0	95.4	119.6	95.3	119.6
<b>10j</b> BisOMePrNH <sub>2</sub>	-26.6	73.0	39.8	73.0	98.0	167.7

**Abbildung 5.10** Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der substituierten 1,1-Bis(4-methoxyphenyl)-2-phenylalkene

In der Reihe der substituierten 1,1,2-Tris(4-methoxyphenyl)alkene entfaltet das zu **10j** (BisOMePrNH<sub>2</sub>) korrespondierende Amin **11j** (TrisOMePrNH<sub>2</sub>) die stärkste Wirkung. Als einzige Verbindung dieser Reihe weist es zytozide Eigenschaften auf. Diese werden in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  ( $T/C_{\text{korr}} = -48.8\%$ ) und  $5 \mu\text{M}$  ( $T/C_{\text{korr}} = -36.1\%$ ) beobachtet, in einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  zeigt diese Verbindung nur noch eine leichte antiproliferative Wirkung ( $T/C_{\text{korr}} = 69.3\%$ ). Das um eine CH<sub>2</sub>-Einheit höher homologe Amin **11k** (TrisOMeBuNH<sub>2</sub>) besitzt einen schwächeren Einfluss auf das Zellwachstum ( $T/C_{\text{korr}} = 36.2\%$  bei  $10 \mu\text{M}$ ), in geringeren Konzentrationen hat

es nur einen geringen Einfluss auf das Zellwachstum. Bei den Nitrilen ist **11h** (TrisOMePrCN) die aktivere Verbindung. In einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigt es zyto-statische Wirkung ( $T/C_{\text{korr}} = 13.5\%$ ) in den beiden geringeren Konzentrationen hat es nur einen schwachen Einfluss auf das Zellwachstum. Bei **11g** (TrisOMeEtCN) ist die maximale Wirkung geringer als bei **11h** (TrisOMePrCN) ( $T/C_{\text{korr}} = 39.9\%$ ), in höheren Konzentrationen ist die Wirkung vergleichbar mit **11h** (TrisOMePrCN). **11i** (TrisOMePrSre) zeigt keine antiproliferativen Eigenschaften ( $T/C_{\text{korr}} = 82.7\%$  bei 10  $\mu\text{M}$ ).

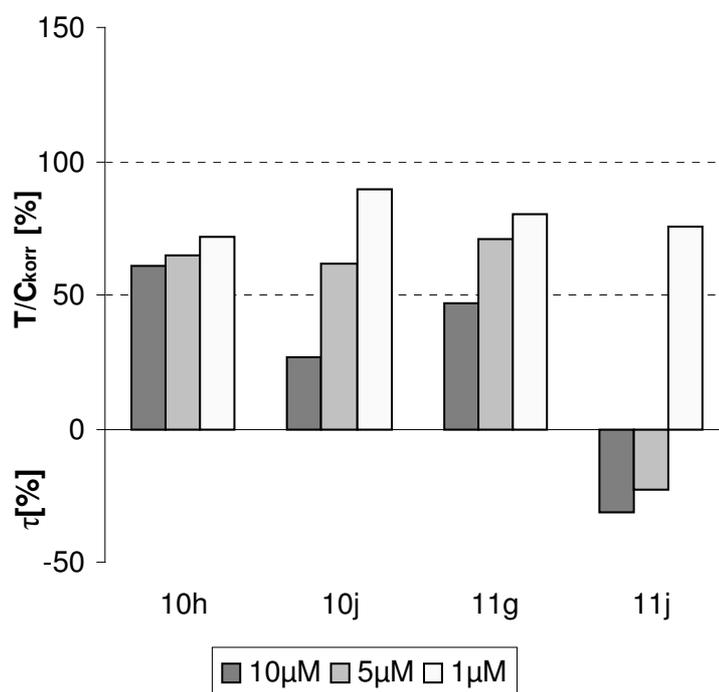


Verbindung	Minimale $T/C_{\text{korr}}$ -Werte [%]					
	10 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]	5 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]	1 $\mu\text{M}$	$t_{\text{min}}$ [h]
<b>11g</b> TrisOMeEtCN	39.9	146.8	52.1	146.8	71.1	73.9
<b>11h</b> TrisOMePrCN	13.5	168.2	55.5	117.2	73.0	117.2
<b>11i</b> TrisOMePrSre	82.7	146.8	94.3	123.1	96.8	146.8
<b>11j</b> TrisOMePrNH <sub>2</sub>	-48.8	123.1	-36.1	146.8	69.3	73.9
<b>11k</b> TrisOMeBuNH <sub>2</sub>	36.2	73.7	62.6	73.7	85.1	213.8

**Abbildung 5.11** Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der substituierten 1,1,2-Tris(4-methoxyphenyl)-alkene

### 5.2.5.5 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests an der MDA-MB-231-Zelllinie

Zusätzlich zu ihrer Wirkung an der MCF-7-Zelllinie wurden die Verbindungen **10h**, **10j**, **11g** und **11j** an der hormonunabhängigen MDA-MB-231-Zelllinie untersucht, da diese Verbindungen zwar einen Einfluss auf das Zellwachstum von MCF-7-Zellen ausübten, aber kaum endokrine Wirkung zeigten.



Verbindung	Minimale T/C <sub>korr</sub> - Werte [%]					
	10 μM	t <sub>min</sub> [h]	5 μM	t <sub>min</sub> [h]	1 μM	t <sub>min</sub> [h]
<b>10h</b> BisOMePrCN	60.7	120.0	64.7	70.1	71.8	70.1
<b>10j</b> BisOMePrNH <sub>2</sub>	26.7	70.1	61.5	70.1	89.5	70.1
<b>11g</b> TrisOMeEtCN	46.7	146.1	71.3	70.1	80.4	70.1
<b>11j</b> TrisOMePrNH <sub>2</sub>	-31.1	120.0	-22.5	167.5	75.4	97.2

**Abbildung 5.12** Ergebnisse der Zytotoxizitätstests von **10h**, **10j**, **11g**, und **11j** an der MDA-MB-231-Zelllinie

In diesem Test konnte nur **11j** (TrisOMePrNH<sub>2</sub>) eine ähnliche Wirkung wie an der MCF-7-Zelllinie zeigen, in den beiden höchsten Konzentrationen wirkt es auch zytozid auf MDA-MB-231-Zellen. Auch **11g** (TrisOMeEtCN), weist eine ähnliche Wirkung auf, wie an der MCF-7-Zelllinie, die beiden BisOMe-Verbindungen haben im Vergleich zu den MCF-7-Zellen eine schwächere Wirkung.

## 5.2.6 Fluoreszenzmarkierte Verbindungen und ihre Vorstufen

### 5.2.6.1 Relative Bindungsaffinität zum ER

Wie aus Tabelle 5.16 ersichtlich ergab die Fluoreszenzmarkierung der Seitenkette mit Rho Verbindung **27** mit einem RBA-Wert von 0.04%. Seine Vorstufe **23** besitzt einen RBA-Wert von 0.12%. Die Fluoreszenzmarkierung am Triarylalken-Grundgerüst führt zu einer Verbindung mit noch geringerer Rezeptoraffinität. Der RBA-Wert nimmt für diese Verbindung und ihre Derivate in der Reihe **29Z** (1.90%) > **28Z** (0.62%) > **32Z** (0.50%) > **31Z** (0.04%) > **33Z** (0.02%) > **30Z** (0.0%) ab. Rho selbst hat keine Affinität zum ER.

**Tabelle 5.16** RBA-Werte der fluoreszenzmarkierten Verbindungen und ihrer Vorstufen

Verbindung	RBA [%]	Verbindung	RBA [%]
<b>23</b> TrisOHPrNHPth	0.12	<b>29Z</b> 1OHEt	1.90
<b>27</b> TrisOHPrNHRho	0.04	<b>28Z</b> 1OMeEt	0.62
Rho Rhodamin B	0.00	<b>30Z</b> 1OHeBrEt	0.00
		<b>31Z</b> 1OHePhthEt	0.04
		<b>32Z</b> 1OHeNH <sub>2</sub> Et	0.50
		<b>33Z</b> 1OHeRhoEt	0.02

### 5.2.6.2 Agonistische Wirkung

Die an der Seitenkette phthalimid-substituierte Verbindung **23** weist eine agonistische Wirkung mit 44.4% auf, die korrespondierende fluoreszenzmarkierte Verbindung **27** ist nur zu 22.9% agonistisch aktiv.

Auch die Vorstufen der am Gerüst fluoreszenzmarkierten Verbindung **33Z** wurden auf ihre agonistische Wirkung untersucht. Nur die hydroxylierte Verbindung **29Z** besitzt mit 45.1% eine agonistische Aktivität. Alle weiteren Verbindungen sind nicht agonistisch wirksam.

**Tabelle 5.17** Agonistische Wirkung der fluoreszenzmarkierten Verbindungen und ihrer Vorstufen

Verbindung		Agonistische Wirkung bei 1 $\mu$ M [%]	Verbindung		Agonistische Wirkung bei 1 $\mu$ M [%]
<b>23</b>	TrisOHPrNHPht	44.4	<b>29Z</b>	1OHEt	45.1
<b>27</b>	TrisOHPrNHRho	22.9	<b>28Z</b>	1OMeEt	-18.7
			<b>30Z</b>	1OHeBrEt	-35.3
			<b>31Z</b>	1OHePhthEt	3.3
			<b>32Z</b>	1OHeNH <sub>2</sub> Et	-18.8
			<b>33Z</b>	1OHeRhoEt	14.0

### 5.2.6.3 Antagonistische Wirkung

Die seitenkettensubstituierte Verbindung **23** wirkt als partielles Antiestrogen mit einer IC<sub>50</sub> von 1000 nM (Aktivierung bei 1  $\mu$ M = 50.0%), die fluoreszenzmarkierte Verbindung jedoch weist keine Hemmung der E2-bedingten Aktivierung auf, sie scheint diese eher schwach zu steigern (Aktivierung bei 1  $\mu$ M 120.9%).

In der Reihe der am Triarylalken-Grundgerüst substituierten Verbindungen erweist sich **29Z** (1OHEt) ebenfalls als partielles Antiestrogen mit einer IC<sub>50</sub> von 1000 nM (Aktivierung bei 1  $\mu$ M = 49.5%). Die antagonistische Wirkung nimmt in der Reihenfolge **29Z** (49.5%) > **32Z** (64.3%) > **31Z** (68.3%) > **30Z** (72.8%) > **33Z** (79.6%) > **28Z** (84.6%) ab.

**Tabelle 5.18** Antagonistische Wirkung der fluoreszenzmarkierten Verbindungen und ihrer Vorstufen

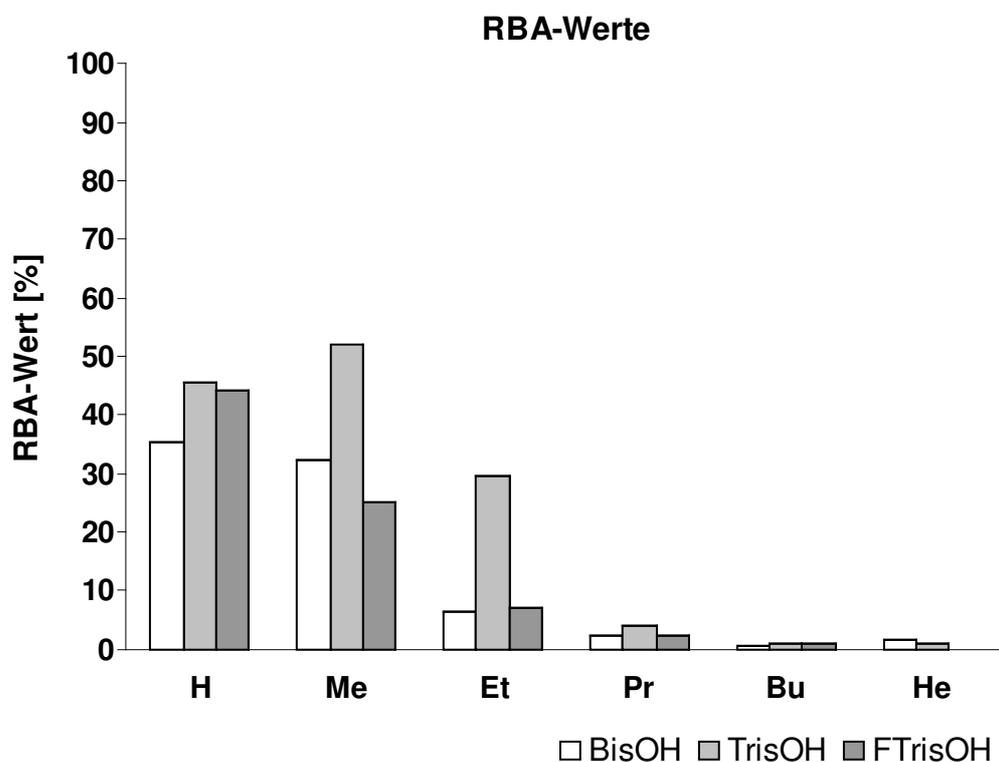
Verbindung		Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [nM]	Verbindung		Aktivierung bei 1 $\mu$ M [%]	IC <sub>50</sub> [nM]
<b>23</b>	TrisOHPrNHPht	50.0	1000	<b>29Z</b>	1OHEt	49.5	1000
<b>27</b>	TrisOHPrNHRho	120.9		<b>28Z</b>	1OMeEt	84.6	
				<b>30Z</b>	1OHeBrEt	72.8	
				<b>31Z</b>	1OHePhthEt	68.3	
				<b>32Z</b>	1OHeNH <sub>2</sub> Et	64.3	
				<b>33Z</b>	1OHeRhoEt	79.6	

### 5.3 Zusammenfassung der Testergebnisse

Die O-methylierten Verbindungen sind mit Ausnahme der Zytotoxizitätstest schwächer wirksam als die hydroxylierten Verbindungen. Die Bindungskurven bei der RBA-Wert Bestimmung verliefen parallel zu der von E2, so dass von einer kompetitiven Hemmung der Rezeptorbindung ausgegangen werden kann.

#### 5.3.1 C2-alkylsubstituierte Triarylkene

Die RBA-Werte der C2-alkylsubstituierten Verbindungen sind in der Abbildung 5.13 zusammengefasst.



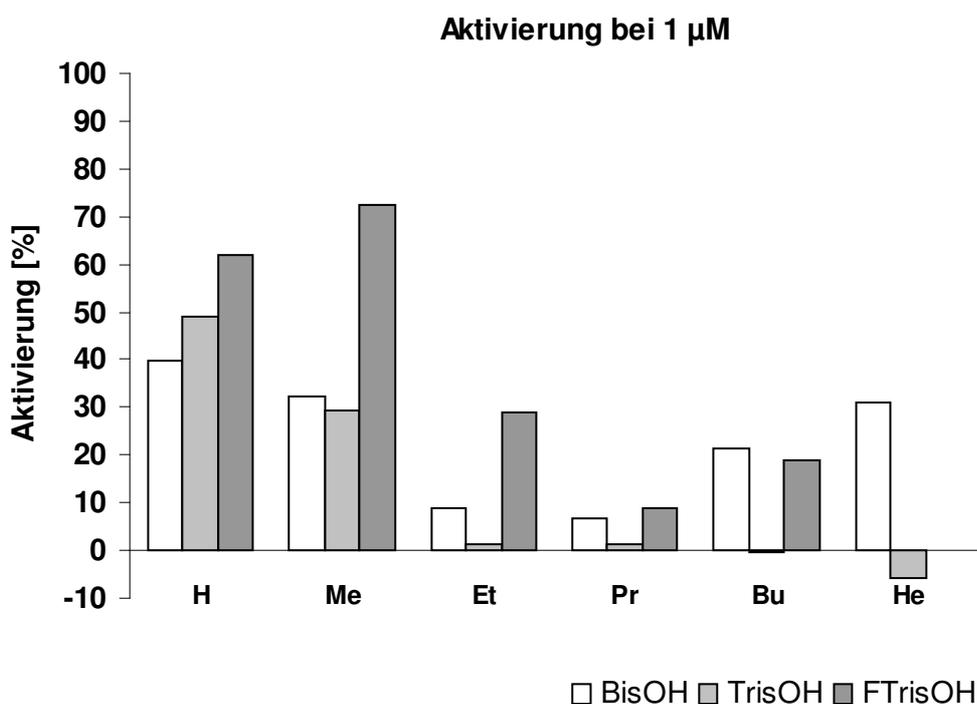
**Abbildung 5.13** RBA-Werte der C2-alkylsubstituierten Verbindungen

Für die RBA-Werte lässt sich eine Abhängigkeit von der Länge der Seitenkette an C2 beobachten. Ihr Optimum ist bei C2-H oder C2-Methyl erreicht. Bei Verlängerung der Seitenkette an C2 ist eine Abnahme der RBA-Werte zu verzeichnen. Ferner beeinflusst die Anzahl der Hydroxygruppen die RBA-Werte. Die BisOH-Verbindungen weisen geringere RBA-Werte als TrisOH- und FTrisOH-Verbindungen auf. Die Ein-

führung eines Fluoratoms in das Triarylalken-Grundgerüst kann die RBA-Werte gegenüber den TrisOH-Verbindungen nicht steigern.

Auch für die agonistische Wirkung ist eine Abhängigkeit von der Länge der Seitenkette an C2 zu beobachten. Mit steigender Länge der C2-Alkylseitenkette nimmt die agonistische Wirkung ab, bei Seitenketten länger als C2-Ethyl ist keine agonistische Wirkung mehr festzustellen. Auch für die agonistische Wirkung ist die Einführung einer dritten Hydroxygruppe von Vorteil, so wird die agonistische Wirkung von 25.3% bei **13a** (BisOHH) auf 60% bei **14a** (TrisOHH) gesteigert. Die Einführung eines zusätzlichen Fluoratoms bei **15a** (FTrisOHH) kann die agonistische Wirkung nicht beeinflussen (53.7%). Allerdings besitzen die methylierte Verbindung (**15b**) mit 46.4% und auch die ethylierte Verbindung (**15c**) mit 25.9% noch eine agonistische Wirkung. Insgesamt jedoch kann keine direkte Korrelation zwischen der Höhe des RBA-Werts und der agonistischen Wirkung beobachtet werden, so weisen die Verbindungen **14c** (TrisOHEt) und **15b** (FTrisOHMe) ähnliche RBA-Werte mit 29.6% und 25.1% auf, ihre agonistische Wirkung unterscheidet sich jedoch beträchtlich (**14c** = 0.0%, **15b** = 46.6%)

Die Ergebnisse der Untersuchung der antagonistischen Wirkung sind in der Abbildung 5.14 zusammengestellt.



R	IC <sub>50</sub> [nM]		
	BisOH	TrisOH	FTrisOH
H	150	200	-
Me	30	15	-
Et	15	10	60
Pr	50	70	20
Bu	500	240	11
He	133	60	-

**Abbildung 5.14** Antagonistische Wirkung der hydroxylierten Triarylalkene mit C2-Alkylseitenkette

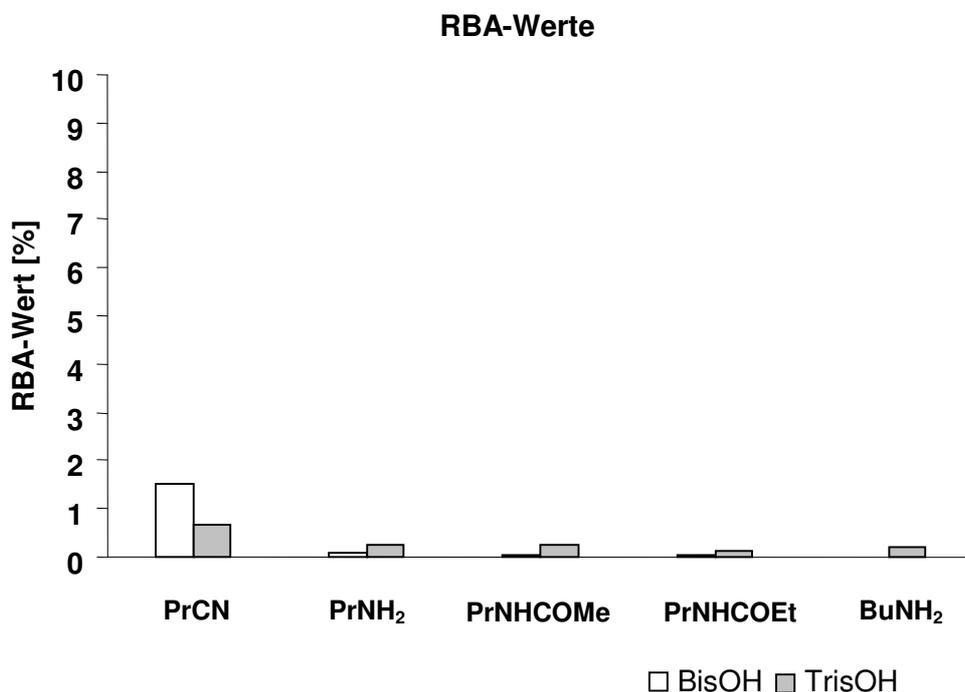
Antagonistische Wirkung und agonistische Wirkung verhalten sich gegenläufig. Die antagonistische Wirkung steigt mit der Verlängerung der Seitenkette an C2 und erreicht die höchsten IC<sub>50</sub>-Werte für BisOH- und TrisOH-Verbindungen bei C2-Ethylsubstitution bzw. bei C2-Butylsubstitution bei den FTrisOH-Derivaten.

Durch die agonistische Wirkung kann bei den C2-H und C2-Methylsubstituierten (bei den FTrisOH-Verbindungen auch nach C2-Ethylsubstitution) nur eine partiell antagonistische Wirkung erzielt werden, die E2-induzierte Luciferase-Aktivierung kann auch in einer Konzentration von 1 µM nicht vollständig inhibiert werden.

Die Wirkung steigt durch Einführung der dritten Hydroxygruppe nicht im gleichen Maße wie der RBA-Wert. Die potentesten Verbindungen entfalten eine ähnliche Wirkung wie 4-OHT.

Keines der C2-alkylsubstituierten Triarylalkene kommt an die zytotoxische Wirkung von TAM oder 4-OHT heran, wobei die O-methylierten Verbindungen aktiver sind als die Hydroxyverbindungen.

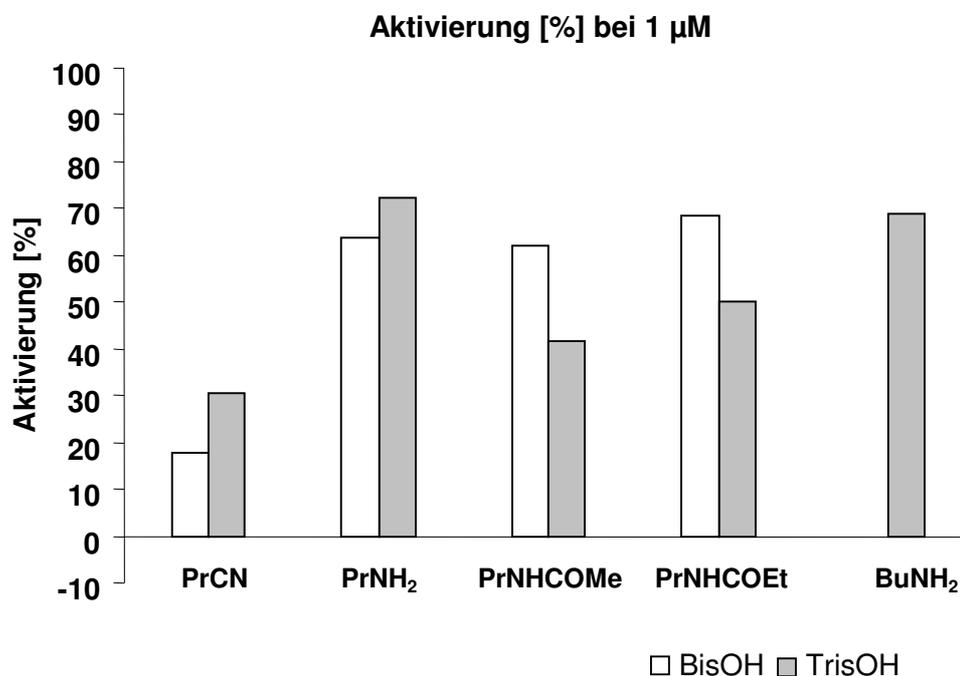
### 5.3.2 Seitenkettensubstituierte Triarylalkene



**Abbildung 5.15** RBA-Werte der seitenkettensubstituierten Triarylalkene

Der RBA-Wert der C2-seitenkettensubstituierten Verbindungen ist generell geringer als bei den jeweiligen korrespondierenden Verbindungen mit unsubstituierter C2-Alkylseitenkette. Die wirksamste Verbindung dieser Reihe ist **13g** (BisOHPrCN), die einen RBA-Wert von 1.5% besitzt. **13d** (BisOHPr), die korrespondierende Verbindung hat einen RBA-Wert von 2.1%. Auch bei den substituierten Verbindungen kann eine leichte Steigerung des RBA-Werts durch Einführen einer dritten Hydroxygruppe erreicht werden, mit Ausnahme des Nitrils **14g**, das nur einen RBA-Wert von 0.67% besitzt. Die Wirkung des Amins **14h** kann um den Faktor 3.5 auf 0.24% gesteigert werden, ein höher homologes Amin **14i** besitzt einen ähnlich hohen RBA-Wert mit 0.2%. Das Acetamid **19a** besitzt ebenfalls einen RBA-Wert von 0.24% das Propionsäureamid **19b** war nur halb so wirksam mit 0.13%. Die potentesten Verbindungen sind die Nitrile. Derivatisierung zum Amin, Amid oder bei den O-methylierten Verbindungen auch zur Säure führt zu drastischen Wirkungsverlusten. Die bishydroxylierten Verbindungen zeigen keine agonistische Wirkung. Durch die Einführung einer dritten Hydroxygruppe kann die agonistische Wirkung leicht gesteigert werden, **14h** entfaltet mit 34.2% die höchste Wirkung.

Die Ergebnisse der Untersuchungen auf antagonistische Wirkung sind in Abbildung 5.16 zusammengefasst.



R	IC <sub>50</sub> [nM]	
	BisOH	TrisOH
PrCN	330	270
PrNH <sub>2</sub>	-	3200
PrNHCOMe	1500	670
PrNHCOEt	6950	1500
BuNH <sub>2</sub>	-	-

**Abbildung 5.16** Antagonistische Wirkung der seitenkettensubstituierten Triaryllalkene

Die antagonistische Wirkung der BisOHPrR-Verbindungen ist wie auch der RBA-Wert wesentlich schwächer ausgeprägt, als bei den rein alkylsubstituierten Verbindungen. BisOHPrCN **13g** stellt auch im Luciferase-Assay die potenteste Verbindung dar ( $IC_{50} = 330$  nM; Aktivierung bei 1  $\mu$ M = 17.8%), jedoch ist die Wirkung um den Faktor 6 geringer als die Wirkung der vergleichbaren BisOHPr **13d**. Das BisOHPrNH<sub>2</sub> **13h** weist in einer Konzentration von 1  $\mu$ M lediglich eine Aktivierung von 63.8% auf, die Amide **18a** und **18b** liegen im gleichen Bereich. Nach Einführung einer dritten Hydroxygruppe ist das Nitril **14g** auch hier die aktivste Verbindung ( $IC_{50} = 270$  nM,

Aktivierung bei 1  $\mu\text{M}$  = 30.6%). Die Amide weisen wiederum eine etwas schwächere Wirkung auf (Acetamid **19a** ( $\text{IC}_{50}$  = 670 nM, Aktivierung bei 1  $\mu\text{M}$  = 41.5%) (Propionamid **19b**:  $\text{IC}_{50}$  = 1500 nM, Aktivierung bei 1  $\mu\text{M}$  62%). Insgesamt konnte nur eine moderate Steigerung  $\text{IC}_{50}$ -Werte für TrisOH-Derivate gemessen werden, die Wirkung in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ist bei TrisOHPrCN **14g** und TrisOHPrNH<sub>2</sub> **14h** ist sogar schwächer als die der korrespondierenden BisOH-Derivate.

Die hydroxylierten Verbindungen sind ebenso wie die unsubstituierten Hydroxyverbindungen nicht zytotoxisch wirksam. Die O-methylsubstituierten Verbindungen sind wesentlich stärker zytotoxisch wirksam als die hydroxylierten Verbindungen. Die Amine **10j** (BisOMePrNH<sub>2</sub>) und **11j** (TrisOMePrNH<sub>2</sub>) sind wesentlich aktiver als TAM und 4-OHT. Sie sind in der höchsten Konzentration sogar zytozide wirksam.

### 5.3.3 Fluoreszenzmarkierte Verbindungen und ihre Vorstufen

Die beiden fluoreszenzmarkierten Verbindungen konnten E2 nur in geringem Ausmaß von seiner Bindungsstelle verdrängen. **27** (0.04%) ist dabei noch etwas stärker aktiv als **33Z** (0.02%). Die jeweiligen Ausgangsverbindungen besitzen einen deutlich höheren RBA-Wert (TrisOHPrNH<sub>2</sub> **14h** = 0.24%, 1OHEt **29Z** = 1.9%). Die Umwandlung von TrisOHPrNH<sub>2</sub> **14h** zum Phthalimid **23** ging mit einem Verlust der Affinität um 50% einher (RBA-Wert: 0.12%). Die Bildung des Phthalimids **31Z** führte zu einem fast vollständigen Verlust der Rezeptoraffinität (RBA-Wert: 0.04%).

Auch die agonistische Wirkung ist sehr gering 1OHeRhoEt **33Z** = 14% und **27** = 22.9%. Die Vorstufen von **27**, das Amin **14h** und das Phthalimid **23**, sind etwas aktiver (**14h** = 34.2%, **23** = 44.4%). Unter den Vorstufen von 1OHeRhoEt **33Z** ist nur 1OHEt **29Z** (45.1%) leicht agonistisch wirksam, das Phthalimid **31Z** ist nicht agonistisch aktiv (3.3%). Die fluoreszenzmarkierten Verbindungen sind nicht antagonistisch wirksam (**33Z** = 79.6%; **27** = 120.9%). Die Vorstufen von **27**, das Phthalimid **23** ( $\text{IC}_{50}$  = 1000 nM; Aktivierung bei 1  $\mu\text{M}$  = 50%) und das Amin **14h** ( $\text{IC}_{50}$  = 3200 nM; Aktivierung bei 1  $\mu\text{M}$  = 72.1%) zeigen eine schwache antagonistische Wirkung. Das Phthalimid **23** ist ein partielles Antiestrogen, da es (siehe oben) auch eine agonistische Wirkung entfaltet.

Die Vorstufen von 1OHeRhoEt **33Z** weisen ebenfalls nur eine schwache antagonistische Wirkung auf. 1OHEt **29Z** ( $\text{IC}_{50}$  = 1000 nM; Aktivierung bei 1  $\mu\text{M}$  = 49.5%)

scheint ebenfalls ein partielles Antiestrogen zu sein (siehe oben), 1OHePhthEt **31Z** zeigt nur eine schwache antagonistische Wirkung (Aktivierung bei 1  $\mu\text{M}$  = 68.3%).