

**Synthese und Testung
von COX-1-, COX-2- und 5-LOX-
Inhibitoren
zur topischen Anwendung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Annika Koppermann
geboren in Mainz

Mainz, 2010

Vom Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität Mainz als Dissertation angenommen.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2008 bis September 2010 am Institut für Pharmazie und Biochemie – Therapeutische Lebenswissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Datum der mündlichen Prüfung: 26.11.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung	1
1.2 Entzündungsprozesse	2
1.2.1 Verlauf	2
1.2.2 Entzündungsmediatoren.....	5
1.3 Arachidonsäure-Kaskade	6
1.3.1 Überblick.....	6
1.3.2 Phospholipase A ₂	7
1.3.3 Cyclooxygenaseweg.....	7
1.3.4 Lipoxygenaseweg.....	11
1.4 Cyclooxygenasen	14
1.4.1 Einführung	14
1.4.2 Aufbau der Cyclooxygenasen	14
1.4.3 Vorkommen der Cyclooxygenasen	15
1.4.4 Biologische Vorgänge mit COX-Beteiligung	16
1.5 Lipoxygenasen	17
1.5.1 Einführung	17
1.5.2 5-LOX	17
1.5.2.1 Aufbau.....	17
1.5.2.2 Vorkommen	18
1.6 Analgetika	19
1.6.1 Einteilung	19
1.6.2 Nicht steroidale Antiphlogistika (NSAID)	19
1.6.2.1 Indikationen	19
1.6.2.2 Wirkmechanismus.....	19
1.6.2.3 Nebenwirkungen	20
1.6.2.4 Eigenschaften	20
1.6.2.5 Einteilung.....	21
1.6.3 5-LOX-Inhibitoren	24
1.6.4 Duale COX/LOX-Hemmer	26
1.6.5 Weitere vielversprechende Targets	27
1.7 Die Haut als Applikationsort.....	29
1.7.1 Einführung	29
1.7.2 Aufbau der Haut	29

1.7.3	Entzündungsreaktionen der Haut	30
1.7.4	Aspekte der topischen Anwendung.....	31
2	Zielsetzung	33
3	Chemischer Teil.....	35
3.1	Einleitung	35
3.2	Imidazothiazole	35
3.2.1	Einführung	35
3.2.2	Entwicklung der Leitstruktur	35
3.2.3	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	37
3.2.3.1	Überblick.....	37
3.2.3.2	Substituentenvariation nach Topliss	39
3.2.4	Strukturvariationen der Leitsubstanz AK D19 nach dem Topliss-Schema	43
3.2.4.1	Linker Zweig des Topliss Decision Tree	44
3.2.4.2	Rechter Zweig des Topliss Decision Tree	44
3.2.4.3	Zusätzliche Substitutionsvariante	45
3.2.5	Synthesen	47
3.2.5.1	Syntheseentwicklung	47
3.2.5.2	Überblick Testsubstanzen	58
3.2.5.3	Syntheseüberblick	59
3.2.5.4	Synthese der Vorstufen	59
3.3	Chalcone.....	65
3.3.1	Einführung	65
3.3.2	Das Codrug-Prinzip.....	65
3.3.3	Entwicklung der Leitstruktur	65
3.3.4	Überblick Testsubstanzen	68
3.3.5	Auswahl der Substituenten.....	68
3.3.6	Syntheseentwicklung	69
3.3.6.1	Retrosynthetische Betrachtung	69
3.3.6.2	Darstellung eines Z11-A-Chalcons.....	70
3.3.6.3	Darstellung eines Z11-B-Chalcons	77
3.3.6.4	Aldolreaktion	82
3.3.7	Konfiguration und Konformation der Enon-Struktur	87
4	Pharmakologischer Teil.....	89
4.1	Einführung	89
4.2	COX-1	89
4.2.1	Einführung	89
4.2.2	12-HHT-Assay	90
4.2.2.1	Prinzip des 12-HHT-Assays	90
4.2.2.2	Durchführung des 12-HHT-Assays	91

4.2.3	MDA-Assay	92
4.2.3.1	Prinzip des MDA-Assays.....	92
4.2.3.2	Durchführung des MDA-Assays.....	93
4.3	COX-2	93
4.3.1	Einführung	93
4.3.2	Prinzip des Humanvollblutassays	93
4.3.3	Durchführung des Humanvollblutassays	94
4.4	5-LOX	95
4.4.1	Einführung	95
4.4.2	Prinzip des LTB ₄ -Assays	95
4.4.3	Durchführung des LTB ₄ -Assays	96
4.5	TNF- α	97
4.5.1	Einführung	97
4.5.2	Prinzip des TNF- α -Assays.....	98
4.5.3	Durchführung des TNF- α -Assays.....	98
4.6	Bestimmung der Cytotoxizität	98
4.6.1	Einführung	98
4.6.2	Prinzip des XTT-Viabilitätsassays.....	99
4.6.3	Kultivierung von Mono Mac 6- Zellen (MM6)	100
4.6.4	Durchführung des XTT-Viabilitätsassays.....	101
4.7	Log P-Wert-Bestimmung	101
4.7.1	Bedeutung des Verteilungskoeffizienten log P	101
4.7.2	Rechnerische Bestimmung der log P-Werte	102
4.7.3	Ermittlung der log P-Werte über HPLC	103
4.7.3.1	Theoretische Einführung.....	103
4.7.3.2	Durchführung der HPLC-Messung.....	104
4.8	Materialien und Geräte.....	106
4.8.1	Geräte	106
4.8.2	Materialien	107
4.8.3	Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien	108
5	Ergebnisse und Diskussion.....	115
5.1	Überblick.....	115
5.2	Testergebnisse und Diskussion der Imidazothiazole	115
5.2.1	Ergebnisse der COX-1-Assays.....	115
5.2.1.1	Überblick.....	115
5.2.1.2	Testergebnisse des 12-HHT-Assays	115
5.2.1.3	Testergebnis des MDA-Assays.....	119
5.2.2	Ergebnisse des COX-2-Assays	120
5.2.3	Ergebnisse des 5-LOX-Assays.....	122
5.2.4	Ergebnis des TNF- α -Assays	123
5.2.5	Ergebnisse des XTT-Assays	123

5.2.6	Ergebnisse der log P-Wert-Bestimmung.....	126
5.2.6.1	Einführung	126
5.2.6.2	Rechnerische Bestimmung der log P-Werte	126
5.2.6.3	Experimentelle Ermittlung der log P-Werte	127
5.2.7	Zusammenfassung und Diskussion der Testergebnisse der Imidazothiazole .	133
5.2.7.1	Einleitung	133
5.2.7.2	Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit Licofelon	133
5.2.7.3	Interpretation der Ergebnisse	136
5.3	Testergebnisse und Diskussion der Chalcone	138
5.3.1	Ergebnisse der COX-1-Assays.....	138
5.3.1.1	Überblick.....	138
5.3.1.2	Testergebnisse des 12-HHT-Assays	138
5.3.1.3	Testergebnis des MDA-Assays.....	140
5.3.2	Ergebnisse des COX-2-Assays	141
5.3.3	Ergebnisse des 5-LOX-Assays.....	142
5.3.4	Ergebnis des TNF- α -Assays	143
5.3.5	Ergebnisse des XTT-Assays	143
5.3.6	Ergebnisse der log P-Wert-Bestimmung.....	145
5.3.6.1	Einführung	145
5.3.6.2	Rechnerische Bestimmung der log P-Werte	145
5.3.6.3	Experimentelle Ermittlung der log P-Werte	146
5.3.7	Zusammenfassung und Diskussion der Testergebnisse der Chalcone.....	150
5.3.7.1	Einleitung	150
5.3.7.2	Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit D4 und Licochalcon A	151
5.3.7.3	Interpretation der Ergebnisse	153
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	155
7	Experimenteller Teil	157
7.1	Allgemeine Angaben.....	157
7.1.1	Chemikalien	157
7.1.2	Schmelztemperatur.....	157
7.1.3	Chromatographie.....	157
7.1.4	NMR-Spektroskopie	158
7.1.5	IR-Spektroskopie	158
7.1.6	Elementaranalyse	159
7.1.7	Massenspektrometrie	159
7.2	Allgemeine Synthesevorschriften	160
7.2.1	Erläuterung.....	160
7.2.2	Friedel-Crafts-Acylierung zur Darstellung <i>p</i> -substituierter Phenylacetophenone	
	160	

7.2.3	Bromierung substituierter Phenylacetophenone in α -Position	160
7.2.4	Kupplung eines Thiazols mit bromiertem Phenylacetophenon zur Darstellung von Imidazo[2,1- <i>b</i>]thiazolen	160
7.2.5	Hydrolyse	161
7.2.6	Nucleophile Substitution bromierter Carbonylverbindungen mit Thiolen	161
7.2.7	Aldolreaktion zur Darstellung von Chalconen.....	161
7.3	Synthese und Analytik	162
7.3.1	Imidazothiazole und Vorstufen	162
7.3.2	Chalcone und Vorstufen.....	198
8	Abkürzungsverzeichnis	217
9	Abbildungsverzeichnis.....	221
10	Tabellenverzeichnis.....	225
11	Formelverzeichnis	227
12	Formelübersicht	229
12.1	Imidazothiazole	229
12.2	Chalcone.....	230
13	Literaturverzeichnis.....	231

1 Einleitung

1.1 Einführung

Schon in der Antike wurde Weidenrinde (lat. salicis cortex) als Mittel gegen Fieber und Schmerzen eingesetzt. Mitte des 19. Jahrhunderts konnte aus der Weidenrinde Salicin isoliert werden. Wenig später gelang die Oxidation zur Salicylsäure, die bald breite klinische Anwendung fand. Die Acetylsalicylsäure (ASS) wurde 1899 in reiner Form erstmals von F. Hoffmann (Firma Bayer) synthetisiert und unter dem Namen Aspirin[®] als Medikament eingeführt. Noch immer ist Acetylsalicylsäure das am meisten verwendete Analgetikum weltweit [1, 2, 3].

In den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts konnte der Wirkmechanismus von ASS entschlüsselt werden, der auf einer Hemmung der Cyclooxygenase beruht [4]. Für diese Entdeckung wurde Vane 1982 der Nobelpreis in Medizin verliehen [5, 6, 7].

Heutzutage sind Schmerzen der häufigste Grund für einen Arztbesuch [8]. Fast jeder Mensch erleidet im Laufe seines Lebens in irgendeiner Form Schmerzen und behandelt diese in vielen Fällen mit Analgetika. Aufgrund dessen gehören Schmerzmittel zu den am häufigsten angewandten Arzneimitteln in der Selbstmedikation. So standen Analgetika 2008 mit einem Umsatz von 438 Millionen Euro an Platz 3 der umsatzstärksten Indikationsbereiche der Selbstmedikation in Deutschland [9, 10]. Die am häufigsten verschriebenen Arzneimittel mit analgetischer Wirkung sind nicht steroidale Antiphlogistika [11].

Es lassen sich drei wichtige Schmerztypen unterscheiden: der physiologische und der pathophysiologische Nozizeptorschmerz sowie der neuropathische Schmerz. Im Folgenden wird der pathophysiologische Nozizeptorschmerz näher erläutert. Er wird auch Entzündungsschmerz genannt und entsteht im Rahmen von Gewebeschädigungen oder Entzündungen [8].

In den folgenden Abschnitten wird zunächst ein Überblick über den Verlauf von Entzündungsreaktionen gegeben, wobei auf die Arachidonsäurekaskade näher eingegangen wird. Anschließend folgt eine Übersicht über die Wirkstoffgruppe der nicht steroidal Antiphlogistika. Zum Schluss werden der Aufbau der Haut und sich daraus ergebende Aspekte der topischen Applikation sowie entzündliche Dermatosen am Beispiel der Dermatitis solaris genauer beschrieben.

1.2 Entzündungsprozesse

1.2.1 Verlauf

Unter einer Entzündung versteht man eine vom Gewebe und den Blutgefäßen auf endogene oder exogene Reize hin ausgelöste Reaktion des Organismus mit dem Ziel die Noxe zu eliminieren oder zu inaktivieren und die reizbedingte Gewebeschädigung zu reparieren. Die klassischen lokalen Entzündungssymptome sind: Rubor (Rötung durch Gefäßerweiterung), Calor (Überwärmung infolge verstärkter Durchblutung), Dolor (Schmerz durch Erregung und Sensibilisierung der Nozizeptoren), Tumor (Gewebschwellung durch verstärkte Durchblutung und Ödembildung) und Functio laesa (Funktionsverlust im Entzündungsareal). Das Allgemeinsymptom einer Entzündung ist Fieber [1, 8, 12, 13]. In Abbildung 1 ist der Verlauf einer Entzündungsreaktion schematisch dargestellt.

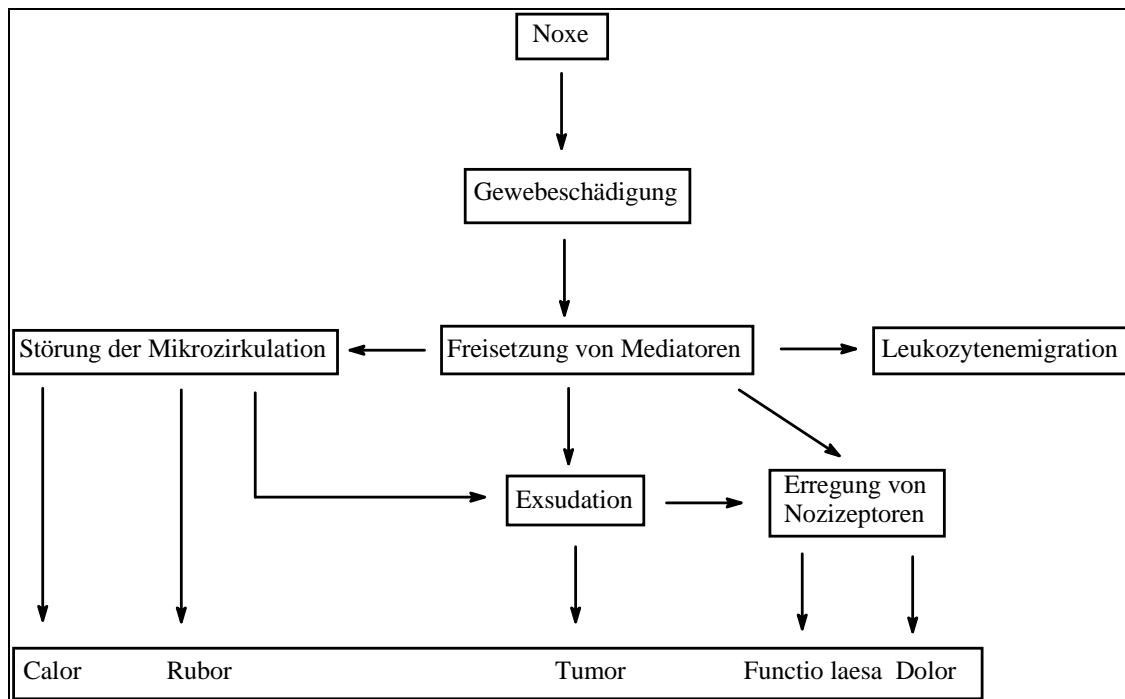


Abbildung 1: Pathogenese und Symptome einer Entzündung [13]

Noxen sind schädliche Einflüsse, die chemischer oder physikalischer Natur sein können. Es kann sich aber auch um Infektionen mit Mikroorganismen oder Parasiten handeln [1].

In Tabelle 1 sind einige Beispiele für exogene Noxen aufgeführt.

Tabelle 1: Exogene Noxen [13]

Chemische Noxen	Physikalische Noxen	Biologische Noxen
Anorganisch: <ul style="list-style-type: none"> - Gase (z.B. Chlor, Kohlenmonoxid, Ozon, Stickoxide, Schwefelwasserstoff) - Starke Basen und Säuren - Schwermetallverbindungen (u.a. Blei-, Quecksilbersalze) 	Thermisch (Hitze- und Kälteschäden) Strahlung Elektrischer Strom	Bakterien Pilze Protozoen Würmer
Organisch: <ul style="list-style-type: none"> - Aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe - Alkaloide - Herzwirksame Glykoside - Pilz-, Schlangen- und Insektengifte - Bakterientoxine - Chemische Kanzerogene 		

Durch die Noxe wird eine Durchblutungsstörung in der terminalen Strombahn ausgelöst und es kommt infolge der erhöhten Kapillarpermeabilität zu einem Austritt von Plasmabestandteilen ins Interstitium (Exsudation). Hinzu kommt eine Erregung und Sensibilisierung von Nozizeptoren durch freigesetzte Entzündungsmediatoren. Schon zu Beginn kann die Entzündung durch Beendigung der schädlichen Einwirkung abklingen. Vielfach schließt sich jedoch eine Emigration von Blutzellen in den extrazellulären Raum an [8].

In der Regel treten Entzündungsreaktionen nicht systemisch auf, sondern manifestieren sich in bestimmten Organen. Bei einer lokalen Entzündung verlassen die zirkulierenden Leukozyten die Blutbahn und infiltrieren das betroffene Gewebe. Dies geschieht in mehreren Schritten: Zunächst kommt es durch Vasodilatation und eine Viskositätszunahme des Blutes zu einer Verlangsamung der Leukozyten-Bewegung, dem sogenannten Rollen. Anschließend heften sich die Leukozyten an die Endotheloberfläche an und treten schließlich aus der Blutbahn aus, um zum geschädigten Gewebe zu wandern. Um die Leukozyten anzulocken, exprimieren Endothelzellen Adhäsionsmoleküle, die einen Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakt bewirken und die Wanderung der weißen Blutzellen durch die Gefäßwand (Transmigration, Diapedese) vermitteln [1, 13].

Einen weiteren Beitrag zur Entzündungsreaktion leisten die Endothelzellen durch die Sekretion verschiedener Cytokine und Wachstumsfaktoren, wodurch Makrophagen stimuliert werden. Durch Chemotaxis in das entzündete Gewebe gelockte neutrophile Granulozyten und Makrophagen nehmen eingedrungene Infektionserreger oder Schadstoffe sowie geschädigte und apoptotische Zellen auf und bauen sie durch lysosomale Enzyme ab. Durch die Freisetzung proteolytischer Enzyme aus den Lysosomen der Phagozyten wird jedoch teilweise auch das umliegende Gewebe geschädigt. Phagozyten sind in der Lage aktive Sauerstoffspezies (H_2O_2 , Hydroxylradikal, Superoxidaradikalanion, Singulett-Sauerstoff) sowie Stickstoffmonoxid (NO) zu erzeugen, die durch Schädigung der Bakterienmembran deren Abtötung erleichtern. Wie die lysosomalen Enzyme können die aktiven Sauerstoffspezies und NO jedoch auch cytotoxisch gegen eigene Zellen wirken und die Gewebematrix zerstören. Makrophagen setzen zudem verschiedene Entzündungsmediatoren wie Cytokine - insbesondere Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) -, nerve growth factor (NGF) und Leukotriene frei. Auch Mastzellen stellen eine wichtige Quelle für Schmerzmediatoren dar. Sie produzieren insbesondere NGF und Histamin [1, 13].

Durch die Freisetzung bestimmter Entzündungsmediatoren kommt es schließlich zu einer Erregungsauslösung in den Nozizeptoren. Die wiederholte Reizung der Nozizeptoren führt zu einer Sensibilisierung, da sich die Erregungsschwelle vermindert. Protonen, Kaliumionen, Serotonin, Histamin und Bradykinin sind einige der freigesetzten Substanzen, die eine Erregung der Nozizeptoren bewirken. An der Sensibilisierung der Rezeptoren sind unter anderem Prostaglandine und Leukotriene beteiligt [13].

Ist die Noxe eliminiert, entfällt der Entzündungsreiz, die Entzündung sistiert und geht in die Reparaturphase über. Zunächst wird ein Defekt durch Narbengewebe gedeckt, das später in einigen Fällen durch Funktionsgewebe ersetzt wird. Eine Elimination gelingt jedoch nicht immer. Es kann ein chronisch entzündlicher Prozess entstehen, der nur dann zur Ruhe kommt, wenn Reparaturmechanismen den Entzündungsherd abkapseln. Bei sich rasch vermehrenden Infektionserregern sind die oben geschilderten Abwehrmechanismen nicht effektiv genug und es kommt zu einer Immunreaktion. Fehlgesteuerte Entzündungsreaktionen können zu zahlreichen Erkrankungen führen und sind an der Entstehung einzelner Symptome verschiedener Erkrankungen beteiligt. Dazu gehören unter anderem rheumatische und neurodegenerative Erkrankungen, Asthma und Atherosklerose. Eine entzündliche Reaktion wird behandlungsbedürftig, wenn die Entzündung über den Anlass hinaus geht – vor allem bei Allergien – oder selbst Krankheitswert erhält. Dabei stehen die Symptome der Entzündung – Schmerz, Fieber, Schwellung – bei akuten Entzündungen im Vordergrund. Dennoch sind Entzündungsreaktionen lebensnotwendig zur Abwehr von Infektionen [1, 12, 14].

1.2.2 Entzündungsmediatoren

Auf molekularer Ebene werden Entzündungen über die erhöhte Bildung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren ausgelöst und gesteuert. In ihrer Gesamtheit erzeugen die Mediatoren die bekannten lokalen und systemischen Symptome einer Entzündung. Viele Entzündungsmediatoren, vor allem die Enzyme, sind in den Zellen gespeichert, manche als inaktive Vorstufen. Andere, wie die Eicosanoide und die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, werden während einer Entzündungsreaktion synthetisiert und freigesetzt [1, 12, 13]. In Tabelle 2 sind die wichtigsten Entzündungsmediatoren und deren Funktionen zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht Entzündungsmediatoren [1, 12, 13]

Entzündungsmediatoren	Funktionen
Aktive Sauerstoffspezies	Infektabwehr, Abtötung von Bakterien, Zerstörung der Gewebematrix, Rekrutierung von Leukozyten
Bradykinin	Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Stimulation der Phospholipase A ₂
Cytokine	Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und Entzündungszellen, bewirken Transkription inflammatorischer Gene durch Aktivierung von NFκB
Histamin	Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Sensibilisierung von Nozizeptoren
Komplementfaktoren (C3a, C4a, C5a)	Histaminfreisetzung, Chemotaxis, Erhöhung der Gefäßpermeabilität
Leukotriene	Chemotaxis, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Schmerzsensibilisierung (siehe auch Kapitel 1.3.4)
Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)	Aktivierung von Granulozyten und Thrombozyten, Chemotaxis, Erhöhung der Gefäßpermeabilität
Prostaglandine	u.a. Schmerzsensibilisierung (siehe auch Kapitel 1.3.3)
Stickstoffmonoxid	Vasodilatation, Hemmung des Wachstums mikrobieller Pathogene durch DNA-Schädigung und Hemmung metabolischer Enzyme

1.3 Arachidonsäure-Kaskade

1.3.1 Überblick

Die Arachidonsäure-Kaskade ist einer der Hauptsignalübertragungswege bei der Entstehung von Schmerzen und Entzündungen. Sie ist nach der vierfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure (engl. arachidonic acid, AA) benannt, die als Ausgangssubstanz der Eicosanoid-Biosynthese auftritt. Das Schlüsselenzym für die Freisetzung der Arachidonsäure ist die cytosolische Phospholipase A₂ (PLA₂). PLA₂ wird durch verschiedene Noxen aktiviert und setzt Arachidonsäure aus den Membran-Phospholipiden durch Esterhydrolyse frei. Über den Cyclooxygenaseweg mit den Isoenzymen COX-1 und COX-2 entstehen Prostaglandine, über den Lipoxxygenaseweg mit den Isoenzymen 5-LOX, 12-LOX und 15-LOX Leukotriene. Prostaglandine und Leukotriene werden auch als Eicosanoide bezeichnet. Bei der Esterhydrolyse entstehen neben der Arachidonsäure auch Lysophospholipide. Diese können teilweise zum Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) umgesetzt werden [15, 16, 17, 18]. In Abbildung 2 ist der Verlauf der Arachidonsäure-Kaskade dargestellt.

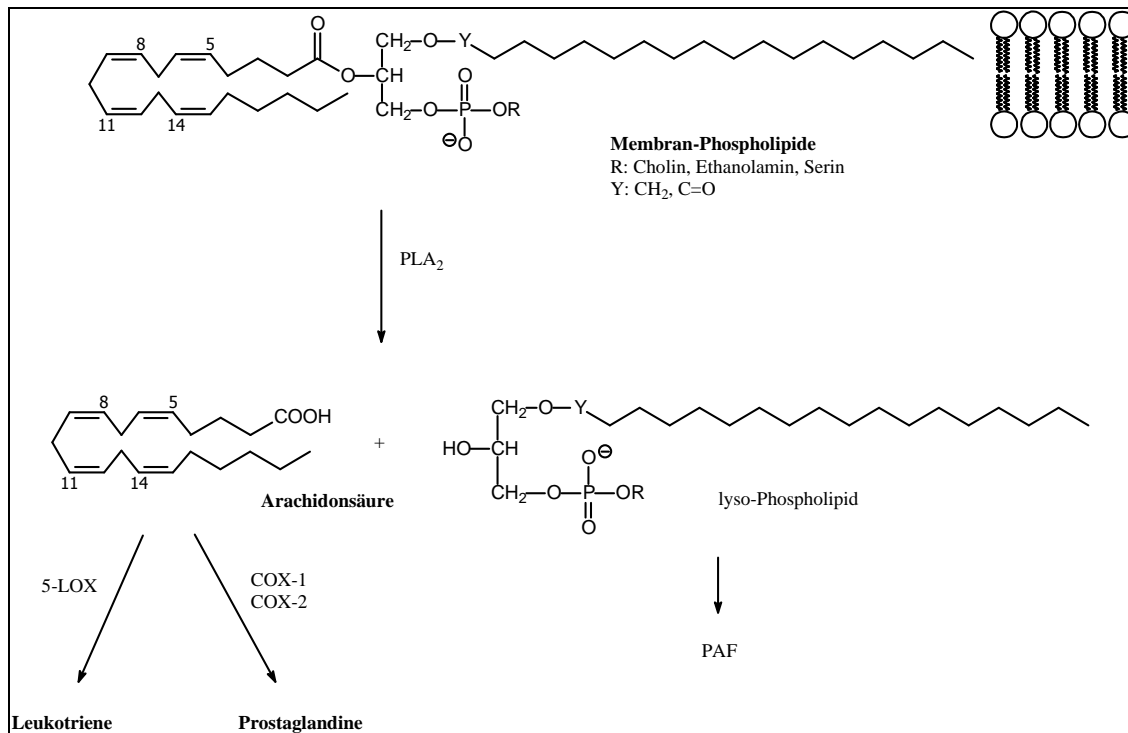


Abbildung 2: Arachidonsäure-Kaskade [16]

1.3.2 Phospholipase A₂

Die Gruppe der Phospholipasen A₂ stellt eine Superfamilie von Enzymen dar, die ubiquitär vorkommt und sich in fünfzehn Gruppen gliedert [19, 20]. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist die katalytisch wirksame Aminosäure im aktiven Zentrum, es handelt sich entweder um Histidin oder um Serin. Zur Histidingruppe gehört die sekretorische Phospholipase A₂ (sPLA₂), sie benötigt Ca²⁺ zur Aktivierung. Die Gruppe der Serin-PLA₂ ist Ca²⁺-unabhängig und besteht aus der Calcium-unabhängigen PLA₂ (iPLA₂, engl. calcium-independent PLA₂), der lipoproteinassoziierten PLA₂ (= PAF-Acetylhydrolase) und der cytosolischen PLA₂ (cPLA₂). An der Arachidonsäurekaskade ist die cPLA₂ beteiligt [16, 21, 22].

Phospholipasen A₂ werden durch verschiedene Noxen aktiviert, zum Beispiel Immunkomplexe, Antigene und proinflammatorische Cytokine (IL-1, IL-6, TNF- α). Da es sich bei cPLA₂ um das Schlüsselenzym der Arachidonsäure-Kaskade handelt, geht eine Überexpression des Enzyms mit einer erhöhten Eicosanoid-Biosynthese einher [23, 24].

1.3.3 Cyclooxygenaseweg

Die Cyclooxygenasen werden auch als Prostaglandin-H-Synthasen (PGHS) bezeichnet und sind bifunktionale Enzyme. Als Endoperoxid-Synthasen oxidieren und cyclisieren sie Arachidonsäure zum Endoperoxid-Prostaglandin G₂ (PGG₂). Als Peroxidasen bilden sie aus PGG₂ das Prostaglandin H₂ (PGH₂). Die Enzyme katalysieren an räumlich getrennten, aber mechanistisch miteinander gekoppelten aktiven Zentren zwei aufeinander folgende Reaktionen [16, 25]. In Abbildung 3 ist der Verlauf des Cyclooxygenasewegs aufgeführt.

Zunächst wird Arachidonsäure in das Hydroperoxid PGG₂ umgewandelt. Die Cyclooxygenasen enthalten als prosthetische Gruppe ein Häm, das durch ein Peroxid-Substrat zu einem Oxo-Ferryl-Radikalkation oxidiert wird [26]. Nach einem Elektronentransfer von Tyrosin 385 (COX-1) bzw. 371 (COX-2) im aktiven Zentrum auf Häm entsteht ein Tyrosylradikal. Durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms der Arachidonsäure in Position 13 durch das Tyrosylradikal bildet sich ein Arachidonylradikal. Unter Anlagerung eines Sauerstoffmoleküls kommt es zur Bildung eines Peroxylradikals, das nach Reaktion mit einem weiteren Sauerstoffmolekül in ein Hydroperoxid (PGG₂) übergeht. Diese Bildung von PGG₂ regeneriert das Tyrosylradikal. Dann reduziert die Peroxidase das Hydroperoxid PGG₂ zu PGH₂ [27, 28, 29].

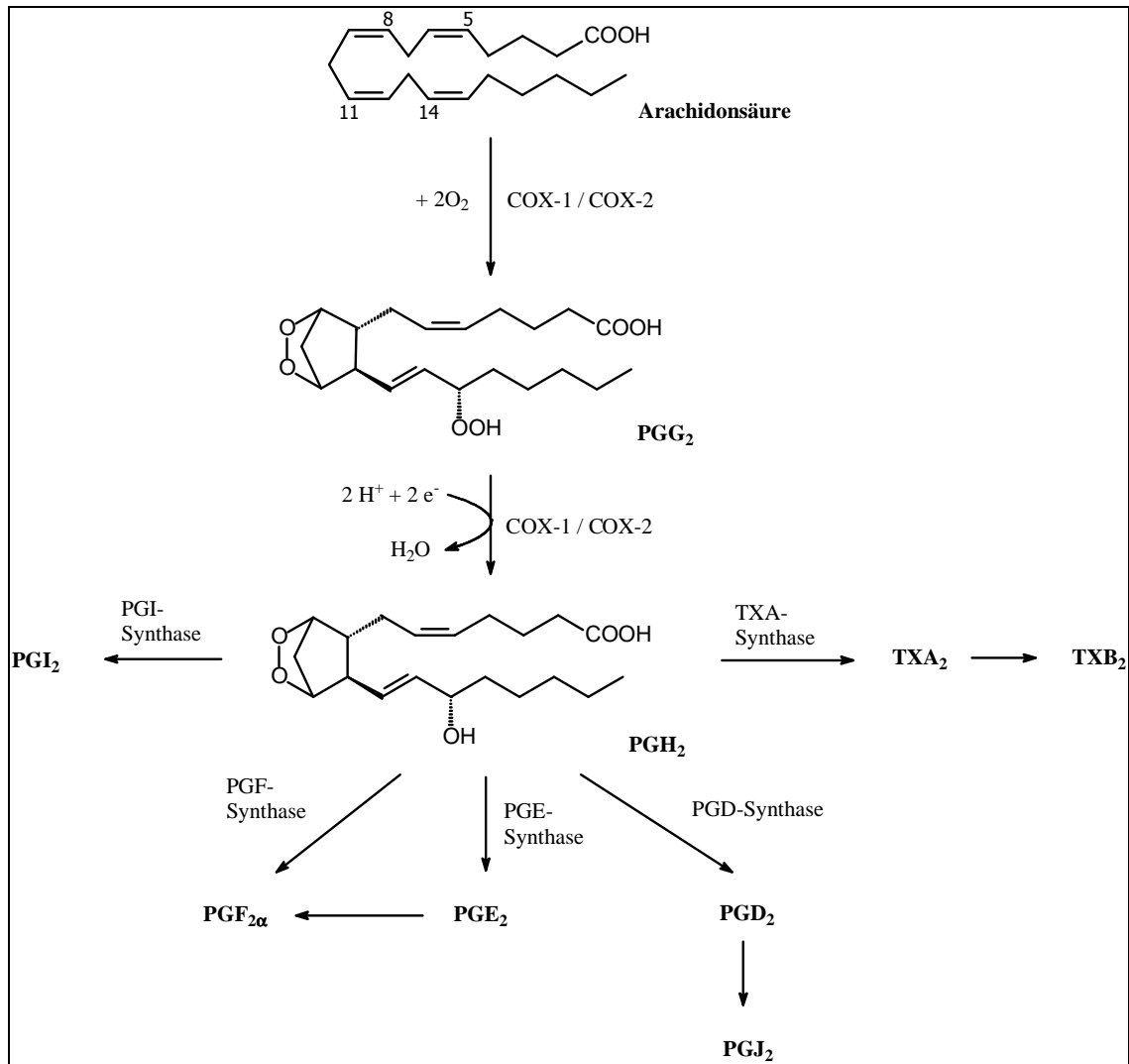


Abbildung 3: Cyclooxygenaseweg der Arachidonsäurekaskade [17]

PGG_2 und PGH_2 sind chemisch instabile Verbindungen, die enzymatisch in Prostacyclin (PGI_2), Thromboxane (TXA_2 , TXB_2), PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGD_2 umgewandelt werden. Prostaglandine, Prostacyclin und Thromboxane werden allgemein auch als Prostanoiden bezeichnet [16, 30]. In Abbildung 4 sind die Strukturformeln einiger Prostaglandine (PG), der Thromboxane (TX) und des Prostacyclins (PGI_2) aufgeführt, die im Verlauf der Arachidonsäure-Kaskade entstehen.

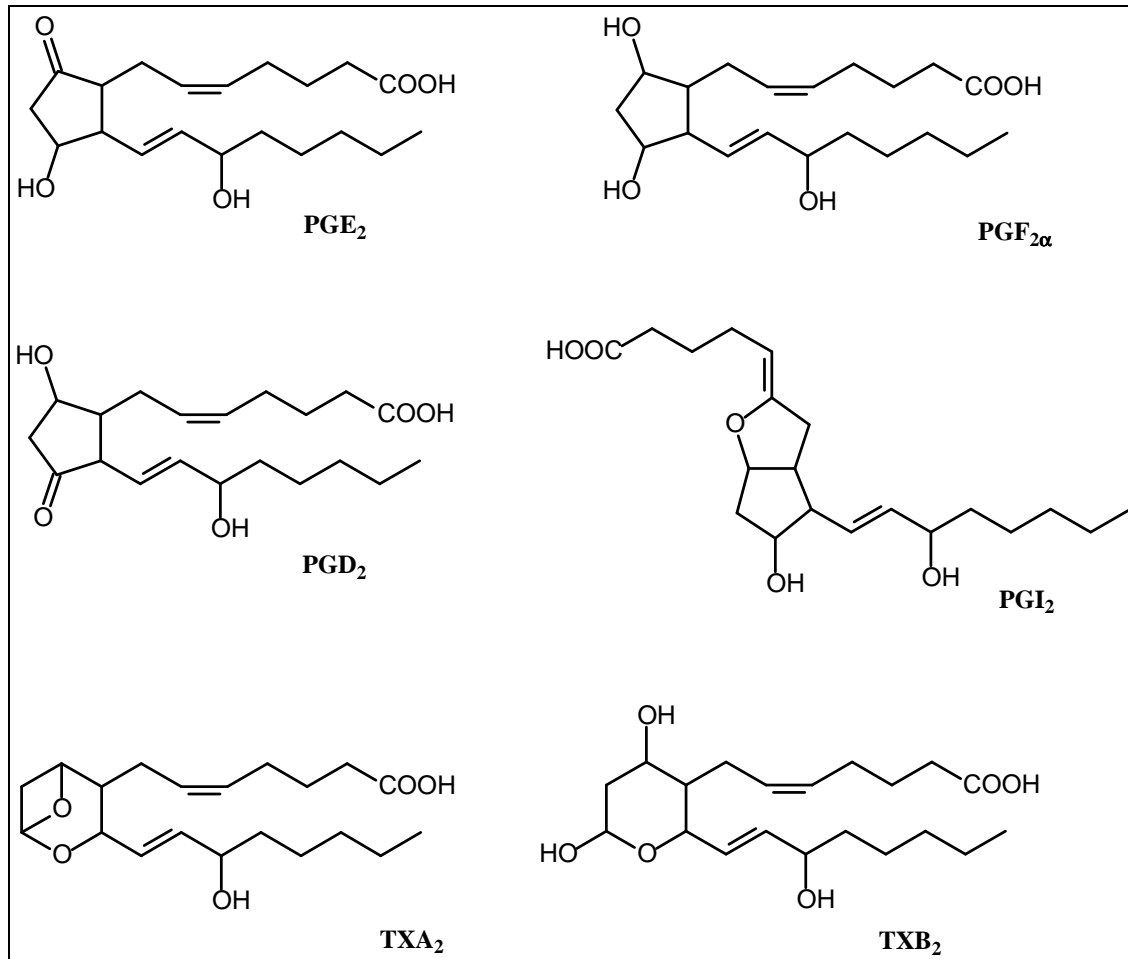


Abbildung 4: Strukturen der Prostaglandine (PG), des Prostacyclins (PGI₂) und der Thromboxane (TX) [1]

Alle Gewebe sind in der Lage, PGG₂ und PGH₂ aus freier Arachidonsäure zu synthetisieren. Der nächste Schritt verläuft gewebs- und zellspezifisch, je nach Expression und relativer Konzentration der vorhandenen Enzyme. Im Gefäßendothel wird durch die Prostacyclinsynthese hauptsächlich PGI₂ gebildet. Makrophagen bilden bevorzugt PGE₂, Mastzellen hingegen vor allem PGD₂. Thromboxan A₂ entsteht zum Großteil in Makrophagen und aktivierten Thrombozyten. Es wird durch die Thromboxan-Synthase gebildet und ist eine instabile Verbindung. TXA₂ zerfällt nichtenzymatisch zu dem stabilen, aber inaktiven TXB₂. Manche Gewebe, wie z.B. Lunge und Milz, sind in der Lage, sämtliche Produkte der Arachidonsäure-Kaskade zu produzieren [16, 31].

In Tabelle 3 sind die biologischen Wirkungen der Prostanoiden aufgeführt, die physiologische und/oder pathophysiologische Bedeutung haben können [16].

Tabelle 3: Biologische Wirkungen der Prostanoiden [8, 32]

Prostanoid	Physiologische/Pathophysiologische Wirkungen
PGE ₂	Kontraktion/Relaxation von Bronchien und Gastrointestinaltrakt, Relaxation von Gefäßen, Hemmung der Säuresekretion und vermehrte Schleimsekretion des Magens, verstärkte Uteruskontraktion in der Schwangerschaft, Offenhalten des Ductus Botalli
PGD ₂	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Relaxation der Muskulatur des Gastrointestinaltrakts und des Uterus
PGF _{2α}	Uteruskontraktion
PGI ₂	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation und der Reninfreisetzung
TXA ₂	Thrombozytenaggregation, Vaso- und Bronchokonstriktion

Prostaglandine

Strukturell sind Prostaglandine durch einen Cyclopentanring sowie eine Carboxyl- und eine Alkyl-Seitenkette charakterisiert. Ihre Nomenklatur ist historisch bedingt: Die Typenbezeichnung der Prostaglandine (PG) richtet sich nach Art und Position der Substituenten, chemischen Eigenschaften und Extraktionsmethoden. Der Index gibt die Zahl der Doppelbindungen im Molekül an. Die griechischen Buchstaben bezeichnen die räumliche Lage der Hydroxylgruppe, die sich ober- oder unterhalb der Ringebene befinden kann [12, 16].

Die Wirkungen der Prostaglandine werden durch Bindung an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Es gibt hierfür zwei zugehörige Second-Messenger-Systeme. Zum einen handelt es sich um die Adenylatcyclase-Aktivierung mit nachfolgender Konzentrationsänderung von cyclischem AMP (cAMP). Zum anderen wird die Phospholipase C aktiviert und es kommt zur Bildung von Diacylglycerol und Inositoltriphosphat, was wiederum einen Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration bedingt. Die Prostaglandin-Inaktivierung erfolgt durch verschiedene intrazelluläre Enzyme. Von Bedeutung sind vor allem die 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase und die Δ¹³-Reduktase, der weitere Abbau erfolgt durch β-Oxidation. Die Plasmahalbwertszeit beträgt weniger als eine Minute [8, 33].

1.3.4 Lipoxygenaseweg

Neben den Prostanoiden sind auch die Produkte des Lipoxygenaseweges, die Leukotriene (LT), an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen beteiligt [16]. Nach Freisetzung der Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden durch die PLA₂ wird die Arachidonsäure durch die 5-Lipoxygenase (5-LOX) weiter umgesetzt. 5-LOX ist eine Dioxygenase. Sie katalysiert zum Einen die Reaktion von Arachidonsäure mit molekularem Sauerstoff zu Hydroperoxyeicosatetraensäure (HPETE). Zum Anderen ist sie für die Dehydratisierung von HPETE zum instabilen Epoxid LTA₄ verantwortlich. Neben der Umsetzung zu LTA₄ kann HPETE auch zum korrespondierenden Alkohol Hydroxyeicosatetraensäure (HETE) reduziert werden. Hierfür fungiert 5-LOX als Pseudoperoxidase [34]. Einen Überblick über den Lipoxygenaseweg zeigt Abbildung 5.

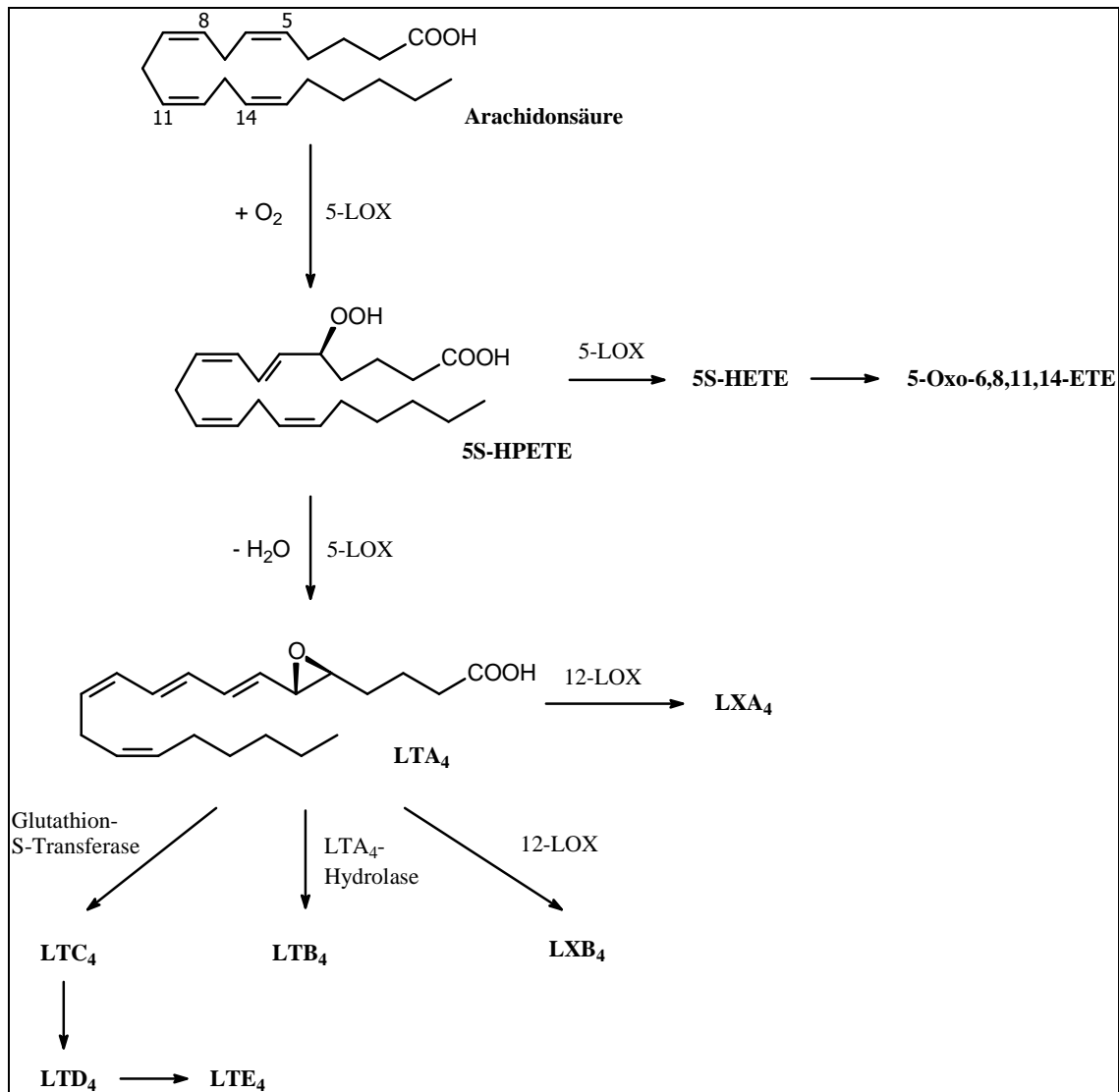


Abbildung 5: Lipoxygenaseweg der Arachidonsäurekaskade [34]

LTA₄ ist ein instabiles Epoxid, das weiter umgesetzt wird und als Ausgangssubstanz aller Leukotriene dient. Durch Einwirkung der LTA₄-Hydrolase entsteht LTB₄. Die LTC₄-Synthase konjugiert LTA₄ mit Glutathion zu LTC₄. Die Freisetzung von LTC₄ in den Extrazellularraum und die Abspaltung von Glutamat führt zu LTD₄ und die anschließende Abspaltung von Glycin zu LTE₄. LTC₄, D₄ und E₄ werden unter dem Begriff Cysteinyl-Leukotriene (Cys-LT) zusammengefasst, da sie alle die Aminosäure Cystein enthalten. Durch Einwirkung der 12-LOX entstehen die Lipoxine LXA₄ und LXB₄ [34, 35]. In Abbildung 6 sind die Strukturen der Produkte des Lipoxygenaseweges zu sehen.

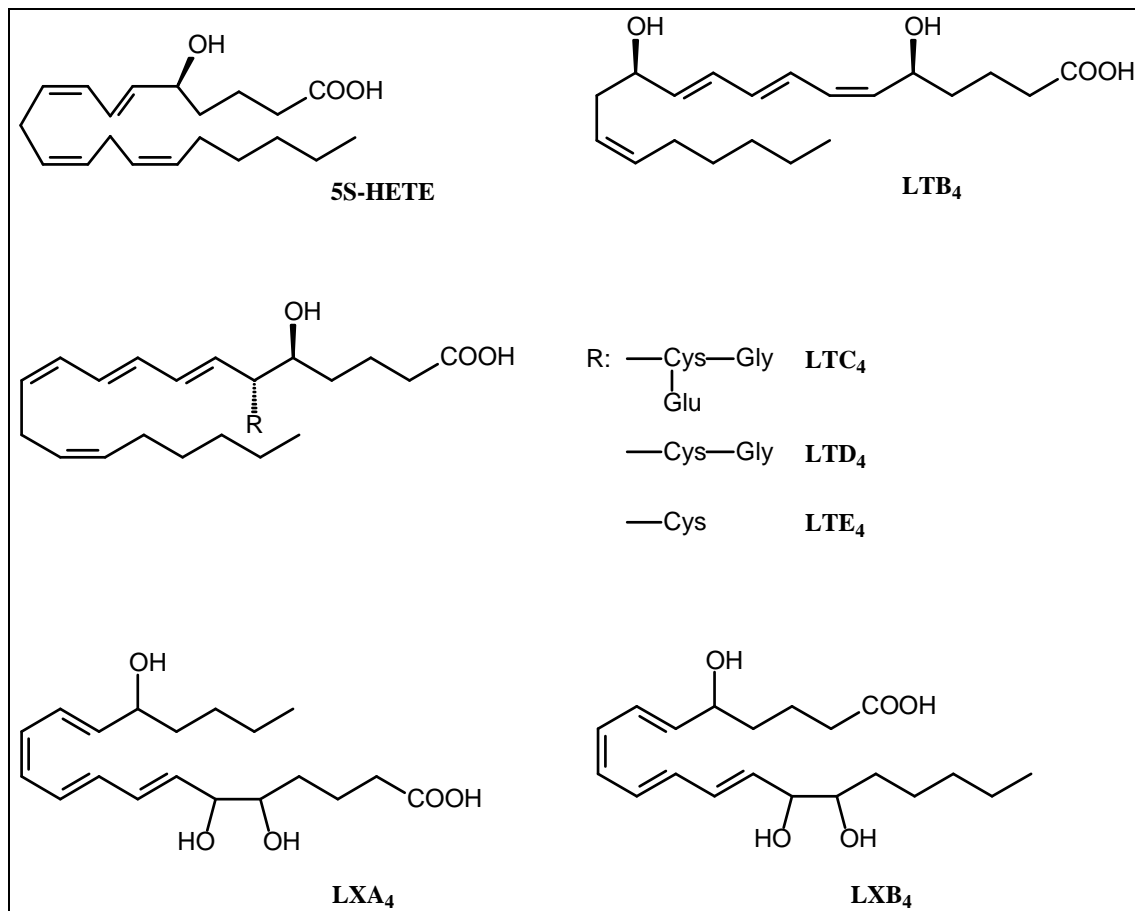


Abbildung 6: Strukturformeln der Produkte des Lipoxygenaseweges [34]

Cys: Cystein; Gly: Glycin; Glu: Glutaminsäure

Wie die Prostaglandine sind auch Leukotriene potente Entzündungsmediatoren. In Tabelle 4 sind die physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen der Leukotriene und Lipoxine aufgeführt.

Tabelle 4: Biologische Wirkungen der Leukotriene und der Lipoxine [1, 16, 34]

Leukotriene/Lipoxine	Physiologische/Pathophysiologische Wirkungen
LTB ₄	Chemotaxis, Aggregation von Neutrophilen und Eosinophilen, Granulozyten-Rekrutierung, -Migration, -Adhäsion, vermehrte Bildung und Freisetzung von Cytokinen, Hemmung von Transformation und Sekretion (T-Zellen), vermehrte Proliferation, Aktivierung und Immunglobulinbildung (B-Zellen), Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Hyperalgesie (afferente Nerven)
LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄	Kontraktion der glatten Muskulatur, Bronchien, GIT-Muskulatur und Koronararterien, Schleimsekretion und Ödembildung in den Bronchien, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Umbau der Atemwege bei chronisch allergischer Entzündung
LXA ₄	Hemmung der Chemotaxis und Adhäsion der Neutrophilen, Vasodilatation, Förderung der Monocyten-Phagocytose
LXB ₄	Hemmung der Emigration, Transmission und Chemotaxis der Neutrophilen, Vasodilatation, schlaffördernd

Leukotriene

Leukotriene sind an der Pathogenese vieler entzündlicher Erkrankungen beteiligt. Dazu gehören unter anderem rheumatoide Arthritis, Arthrose, Gicht, Psoriasis, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sowie Asthma bronchiale [16].

Die biologische Aktivität aller Leukotriene sowie der Lipoxine wird über G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Dies führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C und somit zu einer vermehrten Bildung von Inositoltriphosphat sowie zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration [8, 36].

1.4 Cyclooxygenasen

1.4.1 Einführung

Cyclooxygenasen (COX) katalysieren die Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandine. In Säugerzellen existieren mindestens zwei Isoformen der COX: COX-1 und COX-2. Sie ähneln sich in ihrer Struktur und enthalten jeweils zwei aktive Zentren (Peroxidase und Cyclooxygenase). Die beiden Isoformen katalysieren die gleichen Reaktionen [16]. Die Existenz der COX-2 wurde erst in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt, während die COX-1 schon 1971 entdeckt wurde. Des Weiteren wurde 2002 von einer dritten Isoform, der COX-3, berichtet [37]. Hierbei handelt es sich um eine Splicing-Variante der COX-1. Ihre physiologische/pathophysiologische Bedeutung ist vermutlich gering [38, 39, 40].

Für die Aktivierung der beiden Isoenzyme sind unterschiedlich hohe Konzentrationen an Arachidonsäure erforderlich. COX-2 besitzt eine höhere Affinität zum Substrat und ist somit bei geringeren Arachidonsäure-Konzentrationen aktiv, während COX-1 noch unwirksam ist. Um Arachidonsäure in PGG₂ umwandeln zu können, müssen beide Isoenzyme durch eine Lipidperoxidase aktiviert werden. Das Häm der Peroxidase wird Lipidperoxid-abhängig oxidiert und anschließend bei der Oxidation von Tyrosin im aktiven Zentrum der Cyclooxygenase reduziert. Erst dann kann ein Wasserstoffatom der Arachidonsäure durch das Tyrosinradikal abstrahiert werden. So kann die Aktivität von COX-1 und COX-2 durch die relative Konzentration an Arachidonsäure und/oder Lipidperoxid reguliert werden [41, 42].

Die bevorzugten Substrate der Cyclooxygenasen enthalten mindestens drei Doppelbindungen an genau definierten Positionen, es handelt sich neben Arachidonsäure um Dihomogammalinolen- und Eicosapentaensäuren (EPA). Andere Fettsäuren ohne diese Doppelbindungen können durch COX zwar zu Hydroxyfettsäuren oxidiert, aber nicht in Prostaglandine umgewandelt werden [16].

1.4.2 Aufbau der Cyclooxygenasen

Cyclooxygenasen sind glykosylierte, homodimere Proteine, die aus einer katalytischen Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne (engl. epidermal growth factor), einer Membranbindungsdomäne und Häm bestehen [12, 43]. Die Enzyme sind membranständig und enthalten keine transmembranären Domänen. Das Membranmotiv besteht aus einer amphipathischen Helixstruktur mit einem hydrophoben Bereich, durch den die Enzyme in der Membran verankert sind. Substrate und Inhibitoren erreichen das aktive Zentrum der COX über den in der Lipiddoppelmembran eingebetteten Kanal. Durch diese Enzymstruktur kann die Arachidonsäure nach ihrer Freisetzung aus den Membranphospholipiden direkt in die Öffnung des hydrophoben Enzymkanals

gelangen. Das Molekül wird am Ende des Kanals haarnadelförmig umgeknickt und zwei Sauerstoffmoleküle werden eingefügt [16, 44]. In Abbildung 7 sind die Molekülstrukturen von COX-1 und -2 zu sehen.

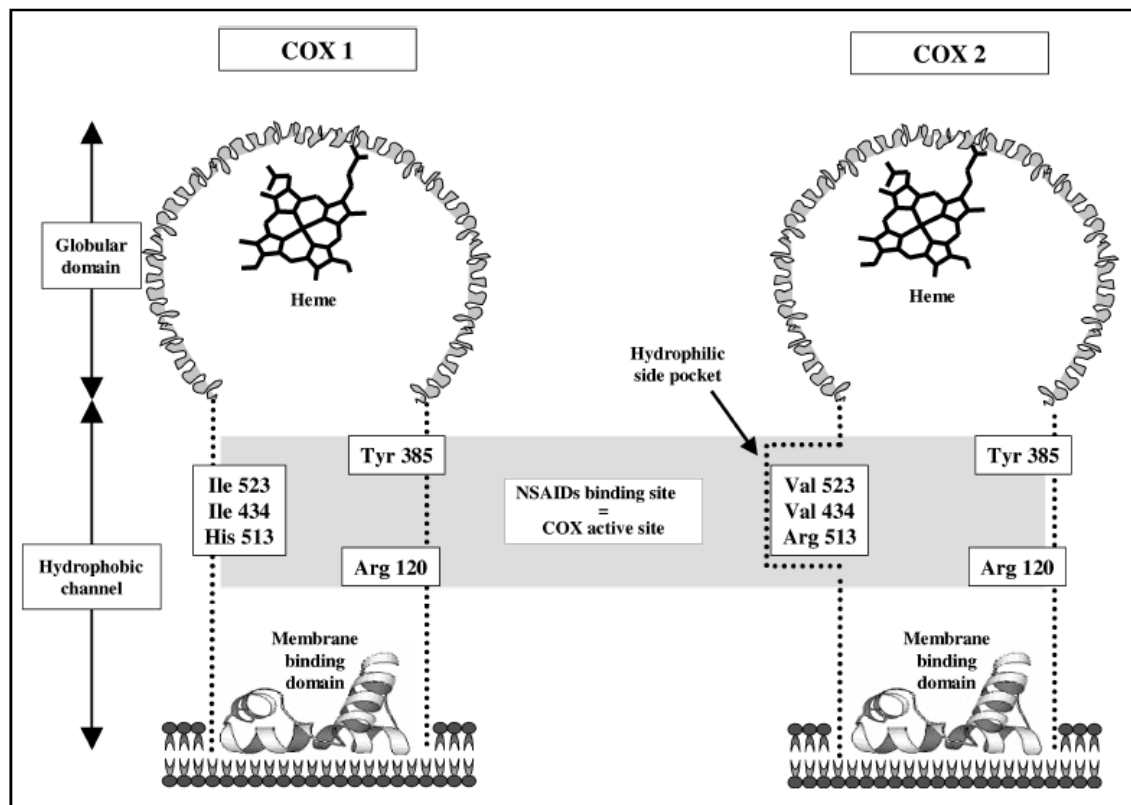


Abbildung 7: Schematische Darstellung von COX-1 und COX-2 [45]

Beide Enzyme besitzen ein Molekulargewicht von 71 kDa und bestehen aus ca. 600 Aminosäuren (COX-1 576 AS, COX-2 587 AS). Die Sequenzhomologie beträgt 60%. Röntgenkristallographische Untersuchungen ergaben, dass die Gesamttopologie der beiden Isoenzyme durch die Abweichungen in den Aminosäureresten nicht beeinflusst wird; die Strukturen erwiesen sich als deckungsgleich. Beide Isoformen besitzen ähnliche aktive Zentren für ihr natürliches Substrat und für die Blockade durch nichtsteroidale Antiphlogistika [45, 46, 47]. Auf die Bindung von Inhibitoren an die COX wird in Kapitel 1.6.2.2 näher eingegangen.

1.4.3 Vorkommen der Cyclooxygenasen

Die beiden Isoenzyme sind auf der Kernmembran und der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums zu finden. Die COX-1-Isoform kommt in fast allen Geweben einschließlich Gastrointestinaltrakt, Thrombozyten, Endothelzellen und Niere vor. Die

COX-2 hingegen befindet sich unter normalen Umständen nur in Gehirn und Nieren sowie in kleineren Mengen in Lunge, Leber und Magen. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens der COX-1 lässt sich dieses Enzym auch als konstitutiv und mit „house-keeping“-Funktion beschreiben. Dagegen ist COX-2 induzierbar und kommt unter normalen Umständen nur in den Zellen der oben genannten Organe vor. Die Expression wird durch Hormone, Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Cytokine, bakterielle Endotoxine, Lipopolysaccharide und Tumorpromotoren angeregt [4, 16, 28, 48].

1.4.4 Biologische Vorgänge mit COX-Beteiligung

An bestimmten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ist jeweils nur eines der beiden Isoenzyme beteiligt. Es gibt jedoch auch Vorgänge, an denen sowohl COX-1 als auch COX-2 beteiligt sind (z.B. Entzündungsreaktionen). Unter bestimmten Umständen kann eine COX-Isoform das Fehlen der anderen kompensieren [41]. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht dieser Vorgänge.

Tabelle 5: Physiologische und pathophysiologische Vorgänge mit COX-1- und/oder COX-2-Beteiligung [41, 49, 50]

Physiologischer/pathophysiologischer Vorgang	COX-1	COX-2
Darmkrebs	beteiligt	beteiligt
Entzündungszeichen	beteiligt	beteiligt
Entzündungsrückbildung	nicht beteiligt	beteiligt
Entwicklung der T-Zellen	stadienabhängig	stadienabhängig
Geburtsvorgang	beteiligt	kompensatorisch
Implantation	nicht beteiligt	beteiligt
Magenulzera	beteiligt	beteiligt
Ovulation	nicht beteiligt	beteiligt
Perinatale Entwicklung der Nieren	nicht beteiligt	beteiligt
Plättchenaggregation	beteiligt	ohne Bedeutung
Ulkusheilung	nicht beteiligt	beteiligt
Umbau des Ductus arteriosus Botalli	kompensatorisch	beteiligt
Überleben von Kryptenstammzellen	beteiligt	kompensatorisch

1.5 Lipoxygenasen

1.5.1 Einführung

Lipoxygenasen (LOX) sind cytosolische Enzyme, die die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu Lipidhydroperoxiden katalysieren. Als Substrate dienen Fettsäuren mit zwei konjugierten *cis*-ständigen Doppelbindungen. Da Arachidonsäure mehrere Doppelbindungen enthält, auf die diese Voraussetzungen zutreffen, können bei der Umsetzung verschiedene Produkte entstehen, diese werden als Hydroperoxyeicosatetraensäuren (HPETE) bezeichnet. Die Klassifikation der Lipoxygenasen basiert auf der Position der Hydroperoxy-Gruppe im Molekül. Säugetiere besitzen eine 5-LOX, 12-LOX und 15-LOX-1 und -2. Die 5-Lipoxygenase ist der biologisch wichtigste Vertreter dieser Enzymfamilie. Sie dient als Katalysator bei der Bildung der Leukotriene (siehe auch Kapitel 1.5.2) und wird im Folgenden näher beschrieben [16, 17, 51].

1.5.2 5-LOX

1.5.2.1 Aufbau

5-LOX ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 72-80 kDa, das ein nichthämgebundenes Eisenion enthält. Das Eisenion kann sowohl als Elektronendonator als auch als Elektronenakzeptor fungieren. In seiner aktiven Form liegt es als Fe^{3+} vor. Die Oxidation findet in Abhängigkeit von Lipidhydroperoxiden (LOOH) statt. Die menschliche 5-LOX enthält 674 Aminosäuren und ist in ihrer Aktivität Ca^{2+} - und ATP-abhängig. Werden Zellen aktiviert und steigt ihr intrazellulärer Ca^{2+} -Gehalt an, wird die 5-LOX in die Zell- oder Kernmembran transloziert und an das transmembranäre Protein FLAP (engl. five-lipoxygenase activating proteins) gebunden. Erst durch diese Bindung wird die 5-LOX aktiviert. Zudem steigert Ca^{2+} die Affinität der 5-LOX gegenüber der Arachidonsäure und LOOH. Des Weiteren wird die 5-LOX durch Phosphorylierung aktiviert [16, 34].

Die 3D-Struktur des Enzyms wurde bis jetzt noch nicht entschlüsselt. Da die Primärstruktur der katalytischen Domäne der humanen 5-LOX der 15-LOX des Hasen ähnelt, konnte ein theoretisches Modell der Tertiärstruktur entwickelt werden. Aus diesem Modell ergibt sich, dass 5-LOX aus einer langen C-terminalen katalytischen Domäne, die das aktive Zentrum enthält, und einer N-terminalen β -Faß-Domäne besteht (siehe Abbildung 8) [51, 52].

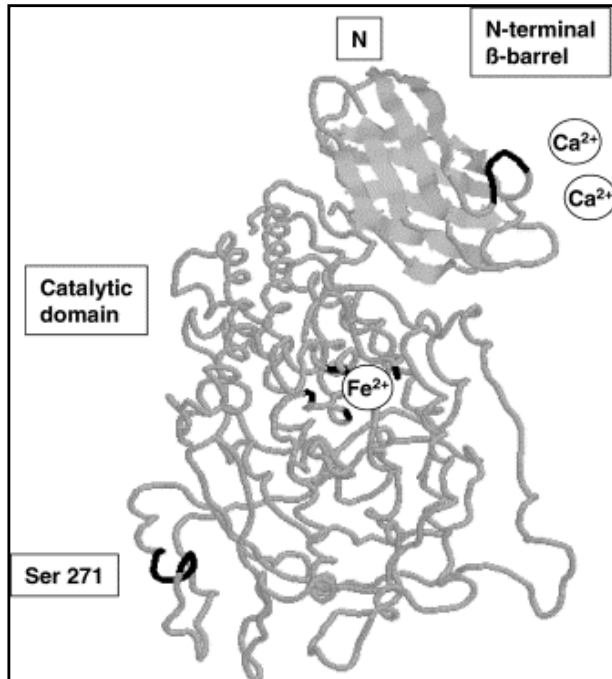


Abbildung 8: Schematisches Modell der 5-LOX [51]

In der β -Faß-Domäne sind die Aminosäurereste 43-46 in Schwarz dargestellt, dort binden die Ca^{2+} -Ionen. Die fünf Aminosäuren der katalytischen Domäne, die als Eisenliganden dienen, sind ebenfalls schwarz gefärbt. Die Aminosäuren 266-271 sind in Schwarz dargestellt, da es sich hierbei um das MAPKAP-Kinase 2/3-Motiv handelt. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2/3 (MAPKAP 2/3) phosphoryliert Serin 271 der 5-LOX zur Aktivierung des Enzyms [51, 53].

1.5.2.2 Vorkommen

Die 5-Lipoxygenase wird gewebe- und zellspezifisch exprimiert. Sie befindet sich in den Leukozyten und dort vor allem in Granulozyten (Basophile und Eosinophile), Monozyten und Makrophagen sowie Mastzellen und B-Lymphozyten. 5-LOX ist in der Regel im Cytoplasma zu finden, je nach Zelltyp auch im Nukleoplasma. Nach Aktivierung kommt es zur Translokation des Enzyms an die Membran [16, 34, 54].

1.6 Analgetika

1.6.1 Einteilung

Unter dem Begriff Analgetika versteht man Substanzen, die die Schmerzempfindung verringern oder unterdrücken, ohne eine narkotische Wirkung zu besitzen. Aufgrund von Wirkstärke, Wirkungsmechanismus und Nebenwirkungen werden Analgetika in zwei Gruppen eingeteilt: Opioid-Analgetika mit vorwiegender zentraler Wirkung und nicht opioide Analgetika mit peripherer und teilweise zentraler Wirkung. Die nicht opioiden Analgetika lassen sich darüber hinaus in zwei Gruppen unterteilen: Bei der ersten Gruppe handelt es sich größtenteils um saure Verbindungen, die sowohl analgetisch und antipyretisch als auch antiphlogistisch wirken. Sie werden als nicht steroidale Antiphlogistika (engl. non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) bezeichnet. Zur zweiten Gruppe gehören wenige nicht saure antipyretische Analgetika [8]. Im Folgenden wird auf die Substanzklasse der NSAIDs näher eingegangen.

1.6.2 Nicht steroidale Antiphlogistika (NSAID)

1.6.2.1 Indikationen

Die klassischen nicht steroidal Antiphlogistika werden auch als nicht steroidale Antirheumatika (NSAR) bezeichnet. NSAR können bei verschiedenen Schmerzzuständen (z.B. Kopf-, Zahnschmerzen), Schmerzen bei degenerativen Gelenkerkrankungen, Migräne, Fieber und vor allem bei pathophysiologischen Nozizeptorschmerzen eingesetzt werden. Auch in der Schmerztherapie bei Knochenmetastasen haben sie sich als wirksam erwiesen. Des Weiteren werden sie zum Verschluss eines nach der Geburt offenen Ductus arteriosus botalli verwendet [8, 55].

1.6.2.2 Wirkmechanismus

Die Wirkung der nicht steroidal Antiphlogistika liegt in der Hemmung der Cyclooxygenasen. NSAIDs inhibieren damit die Synthese von Prostaglandinen und vermindern somit eine Sensibilisierung der Nozizeptoren. Die Symptome einer Entzündungsreaktion werden unterdrückt, ohne den Krankheitsverlauf zu ändern. Da Prostaglandine in fast allen Zellen bzw. Geweben produziert werden und vielfältige physiologische Funktionen haben, ist der Einsatz von NSAIDs mit Nebenwirkungen verbunden [1, 8, 16, 56].

Die Bindung von NSAIDs an die Cyclooxygenasen ist in Abbildung 7 (Kapitel 1.4.2) zu sehen. Nichtsteroidale Antiphlogistika inhibieren die Cyclooxygenasen, indem sie den Zugang zum hydrophoben Kanal blockieren, an dessen Ende sich das aktive Zentrum

befindet. Dabei bilden sie eine Wasserstoffbrückenbindung und ionische Wechselwirkungen zu der polaren Aminosäure Arginin in Position 120 aus. An Position 523 trägt COX-1 die Aminosäure Isoleucin und COX-2 das um eine Methylgruppe kleinere Valin. Dadurch entsteht eine hydrophile Seitentasche, in der selektive COX-2-Inhibitoren binden können. Dies wird durch die Aminosäure an Position 434 noch verstärkt, bei der es sich im Falle der COX-1 um Isoleucin und bei COX-2 um Valin handelt. Somit ist die Bindungsstelle für NSAIDs bei COX-2 um ca. 20% größer als bei COX-1 [43, 45, 57].

1.6.2.3 Nebenwirkungen

Folgende Nebenwirkungen können bei der Einnahme nicht steroidaler Antiphlogistika auftreten:

- Gastrointestinale Störungen und Erosionen, Ulzerationen, Blutungen, Perforationen
- Hautreaktionen
- Nierenfunktionsstörungen, Ödembildung, Blutdruckerhöhung
- Hemmung der Thrombozytenaggregation
- Zentralnervöse Symptome (Schwindel, Kopfschmerzen)
- Abnahme der Uterusmobilität
- Kardiovaskuläre Komplikationen (Myokardinfarkt, Schlaganfall)
- Asthmaanfall (durch verstärkte Bildung bronchokonstriktorischer Leukotriene) [1, 8]

1.6.2.4 Eigenschaften

Charakteristisch für die klassischen NSAR, mit Ausnahme der Coxibe, ist das Vorhandensein von Carbonsäurefunktionen sowie eines oder mehrerer aromatischer oder heteroaromatischer Ringsysteme. Diese Strukturelemente imitieren die Säurefunktion und den großen lipophilen Bereich der Arachidonsäure. Coxibe enthalten meist einen fünfgliedrigen Heteroaromaten, der vicinal mit zwei Phenylringen substituiert ist. Als entscheidend für die Pharmakokinetik und die antiinflammatorischen Eigenschaften der NSAR gelten die hohe Plasmaeiweißbindung und die Anreicherung im entzündeten Gewebe, da dort ein niedriger pH-Wert vorherrscht [12].

1.6.2.5 Einteilung

Der Großteil der klassischen NSAIDs hemmt unselektiv sowohl COX-1 als auch COX-2. Einige dieser Arzneistoffe inhibieren zwar beide Isoformen, besitzen jedoch eine leichte COX-2-Präferenz. Um selektive COX-2-Hemmer handelt es sich bei den Coxiben. Acetylsalicylsäure nimmt eine Sonderstellung ein, da sie, bei niedriger Dosierung, selektiv und irreversibel die Cyclooxygenase-1 inhibiert [8, 12, 58]. Aufgrund ihrer chemischen Struktur kann eine weitere Einteilung der NSAR in mindestens acht Klassen erfolgen [4].

Unselektive COX-Inhibitoren [1, 8, 12]:

Indometacin ist ein Beispiel für ein Heteroaryl-Essigsäure-Derivat mit vorwiegend antiphlogistischer und antirheumatischer Wirkung. Die Nebenwirkungsrate liegt bei 30%, vor allem gastrointestinale Komplikationen treten bei Indometacin häufiger auf als bei anderen NSAR. Um die gastrointestinalen Nebenwirkungen zu reduzieren, wurde das Prodrug Acemetacin entwickelt, das erst im Organismus in seine aktive Form überführt wird. Die lokale Magenreizung wird somit vermieden [59].

Ein besonders häufig verwendetes Antiphlogistikum ist das Aryl-Essigsäure-Derivat Diclofenac. Es handelt sich um einen COX-Hemmer mit geringer COX-2-Präferenz. Nachteilig ist die Erhöhung von Leberenzymen, die bei Diclofenac häufiger auftritt als bei anderen NSAR. Ein Ester des Diclofenacs ist Aceclofenac, der im Körper jedoch nur zu maximal 5% zu Diclofenac metabolisiert wird [60].

Ibuprofen ist ein typischer Vertreter der Aryl-Propionsäure-Derivate. Diese Wirkstoffgruppe besitzt ein asymmetrisch-substituiertes Kohlenstoffatom, wobei das *S*-Enantiomer in Bezug auf die COX-Hemmung das Eutomere darstellt. Bei einigen Aryl-Propionsäure-Derivaten wird das *R*-Enantiomer im Organismus in das *S*-Enantiomer metabolisiert. Ibuprofen ist ein relativ schwacher COX-Hemmer, hat jedoch ein geringeres Risiko starke gastrointestinale Störungen zu verursachen. Die Hemmung der Cyclooxygenase ist reversibel. Ketoprofen wird sowohl als Racemat als auch in Form des reinen *S*-Enantiomers (Dexketoprofen) eingesetzt. Tiaprofensäure und Naproxen gehören ebenfalls zur Gruppe der Profene [61].

Weitere unselektive COX-Hemmer sind die Oxicame. Zu dieser Substanzklasse gehören Piroxicam, Meloxicam und Lornoxicam. Der saure Charakter kommt durch das Vorhandensein einer vinylogenen Carbonsäurestruktur zustande [62].

In Abbildung 9 sind die Strukturformeln einiger oben genannter Arzneistoffe aufgeführt.

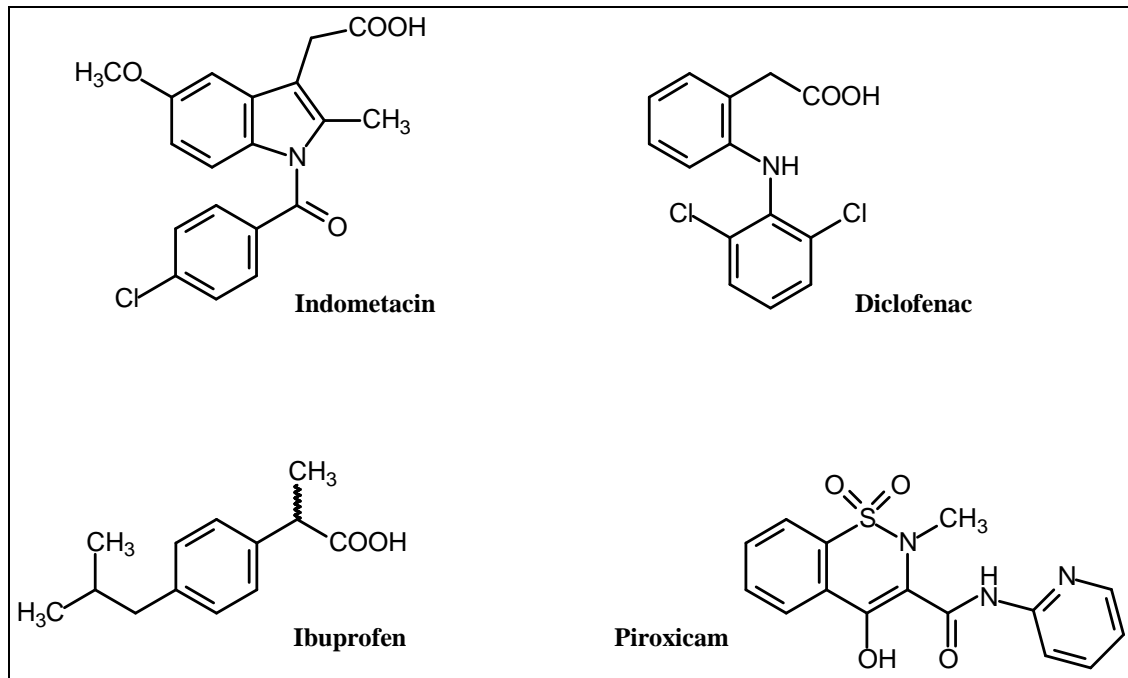
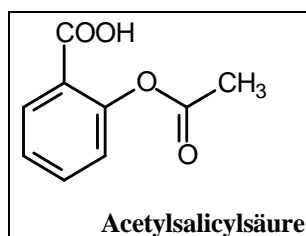


Abbildung 9: Beispiele einiger unselektiver COX-Hemmer [8]

Selektive COX-1-Hemmer:

Acetylsalicylsäure (ASS) ist bei geringer Dosierung - 30 bis 50 mg - ein selektiver COX-1-Hemmer. Mit steigender Dosis hemmt ASS beide Isoenzyme. Nach peroraler Einnahme wird der Wirkstoff schnell resorbiert und zu Salicylsäure desacetyliert. Strukturell kann Acetylsalicylsäure als Arachidonsäure-Mimetikum betrachtet werden, wobei die Säurefunktion eine elektrostatische Wechselwirkung mit Arginin an Position 120 im aktiven Zentrum der Cyclooxygenase eingeht. Nach der Bindung wird die Cyclooxygenase durch Acetylierung eines Serinrestes in Position 530 irreversibel gehemmt. Aufgrund seiner antipyretischen, antiphlogistischen und thrombozytenaggregationshemmenden Wirkung ist Aspirin[®] das am meist verwendeten NSAR weltweit [8, 63].

Abbildung 10: Acetylsalicylsäure (Aspirin[®]) [8]

Selektive COX-2-Hemmer:

Das Vorkommen der COX-1 im Gastrointestinaltrakt führte zu der Vermutung, dass die Hemmung der COX-2 für die antiinflammatorischen Effekte und die COX-1-Inhibition für die unerwünschten Nebenwirkungen verantwortlich sei (sogenannte COX-Hypothese). Aufgrund dessen wurden selektive COX-2-Inhibitoren mit dem Ziel synthetisiert, gastrointestinale und renale Nebenwirkungen der klassischen NSAIDs zu verhindern [64, 65, 66].

1999 wurde Celecoxib (Celebrex[®]) als erstes Coxib auf den Markt gebracht, es folgten Rofecoxib (Vioxx[®]) und Valdecoxib (Bextra[®]). Alle drei Arzneistoffe erreichten mit Umsätzen von über einer Milliarde US-Dollar in den ersten fünfzehn Monaten nach Markteinführung Blockbuster-Status. Aufgrund kardiovaskulärer Risiken wurden Rofecoxib und Valdecoxib 2004 bzw. 2005 wieder vom Markt genommen [40, 67]. Auch bei der zweiten Generation der Coxibe - Lumiracoxib, Etoricoxib und Parecoxib - traten teilweise schwerwiegende Nebenwirkungen auf. Die Arzneistoffe wurden in manchen Ländern nicht zugelassen oder wieder vom Markt genommen [68, 69]. In Deutschland befinden sich zum aktuellen Zeitpunkt Celecoxib, Etoricoxib und Parecoxib auf dem Markt [70]. Die Strukturen einiger genannter Coxibe sind in Abbildung 11 zu sehen.

Es stellte sich heraus, dass die kardiovaskulären Nebenwirkungen nicht nur bei den Coxiben vorkommen, sondern auch andere Wirkstoffe aus der Klasse der NSAIDs betreffen [71, 72, 73]. Dies hat zu der Empfehlung geführt, Coxibe bei kardiovaskulären Risikopatienten nur nach sorgfältiger Abwägung der Nutzen-Risiko-Bilanz einzusetzen, da die Gefahr kardiovaskulärer Nebenwirkungen einer Coxib-Therapie wahrscheinlich mit der Dosis und der Behandlungsdauer ansteigt [8, 70, 74].

Ein vielversprechendes Target stellt die COX-2 auch bei der Krebstherapie dar. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die COX-2-Expression bei vielen malignen und prämaligen Tumoren dauerhaft hochreguliert ist. Dies führt zu einer Krebsprogression, da die Cyclooxygenase-2 an fast allen Prozessen der Kanzerogenese beteiligt ist [75, 76].

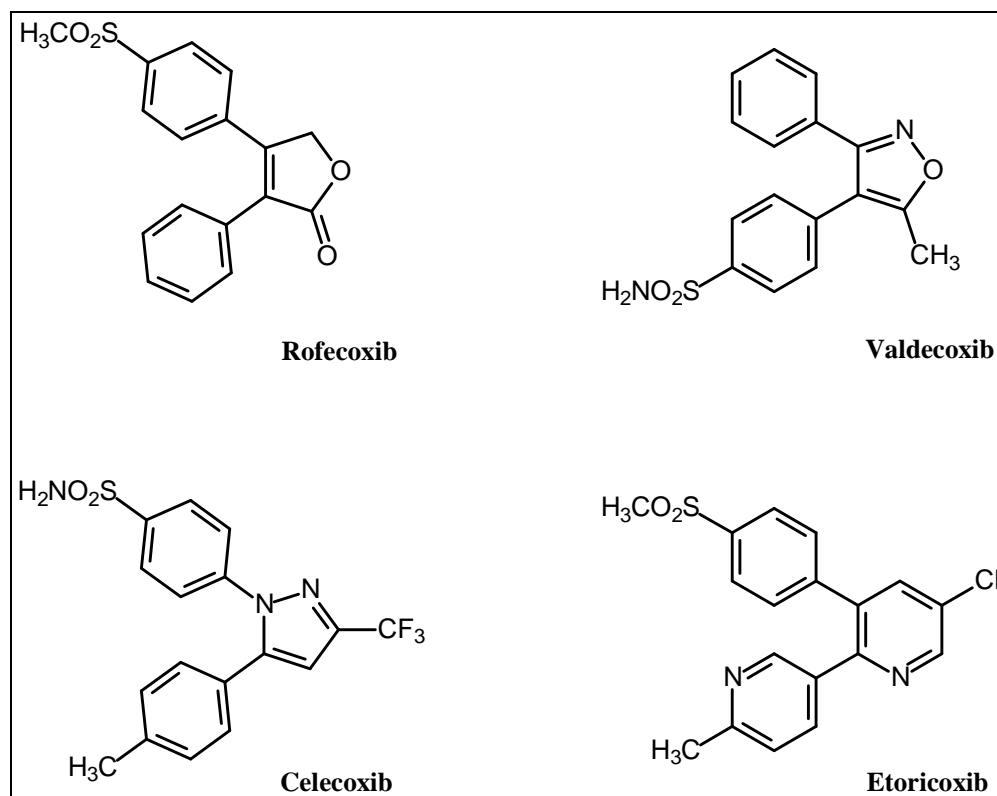


Abbildung 11: Beispiele einiger selektiver COX-2-Hemmer [8]

1.6.3 5-LOX-Inhibitoren

Die Hemmung der 5-Lipoxygenase ist nicht nur über eine direkte Inhibition der 5-LOX, sondern auch indirekt durch eine Inaktivierung des 5-Lipoxygenase-aktivierenden Proteins (FLAP) möglich [34]. In Abbildung 12 sind einige Beispiele für 5-LOX-Inhibitoren aufgeführt.

FLAP-Inhibitoren fungieren als Antagonisten. Ihre hohe Effizienz in isolierten Leukozyten lässt sich jedoch meist nicht auf Vollblut-Assays übertragen. Dies hängt vermutlich mit einer Plasmaprotein-Bindung der Wirkstoffe oder einer Konkurrenz mit der Arachidonsäure zusammen. Vielversprechend ist AM103, ein neuer potenter FLAP-Inhibitor, der auch *in vivo* seine Effektivität beibehält [77, 78].

Direkte 5-LOX-Inhibitoren lassen sich in Redox-Inhibitoren, Eisen-Chelatbildner und Nicht-Redox-Inhibitoren unterteilen. Durch diese Wirkstoffe werden teilweise auch 12- und 15-LOX sowie die Cyclooxygenasen beeinflusst [16, 34].

Redox-Inhibitoren reduzieren das Eisenion im aktiven Zentrum des Enzyms. Es handelt sich um lipophile Reduktionsmittel. Ihre hohe Effizienz *in vitro* lässt sich jedoch nicht nutzen, da die orale Bioverfügbarkeit meist schlecht sowie die 5-LOX-Selektivität gering ist [79].

Eisen-Chelatbildner enthalten Hydroxamsäure oder *N*-Hydroxy-Harnstoff-Gruppen, die mit dem Eisenion einen Chelatkomplex bilden. ABT-761 (VIA-2291) ist ein solcher Inhibitor, der nach Abschluss der Phase II der klinischen Studien einer der vielversprechendsten 5-LOX-Inhibitoren in der Entwicklung ist. Bisher konnte nur ein 5-LOX-Inhibitor auf den Markt gebracht werden. Hierbei handelt es sich um Zileuton, einen Eisenchelate-Bildner, der in den USA unter dem Handelsnamen Zylflo[®] zur Behandlung von Asthma zugelassen ist [80, 81].

Nicht-Redox-Inhibitoren konkurrieren mit der Arachidonsäure oder Lipidhydroperoxiden um die 5-LOX-Bindungsstelle. Strukturell gesehen handelt es sich um eine sehr heterogene Substanzklasse. Ein Beispiel für einen Nicht-Redox-Inhibitor ist ZD 2138 [82, 83].

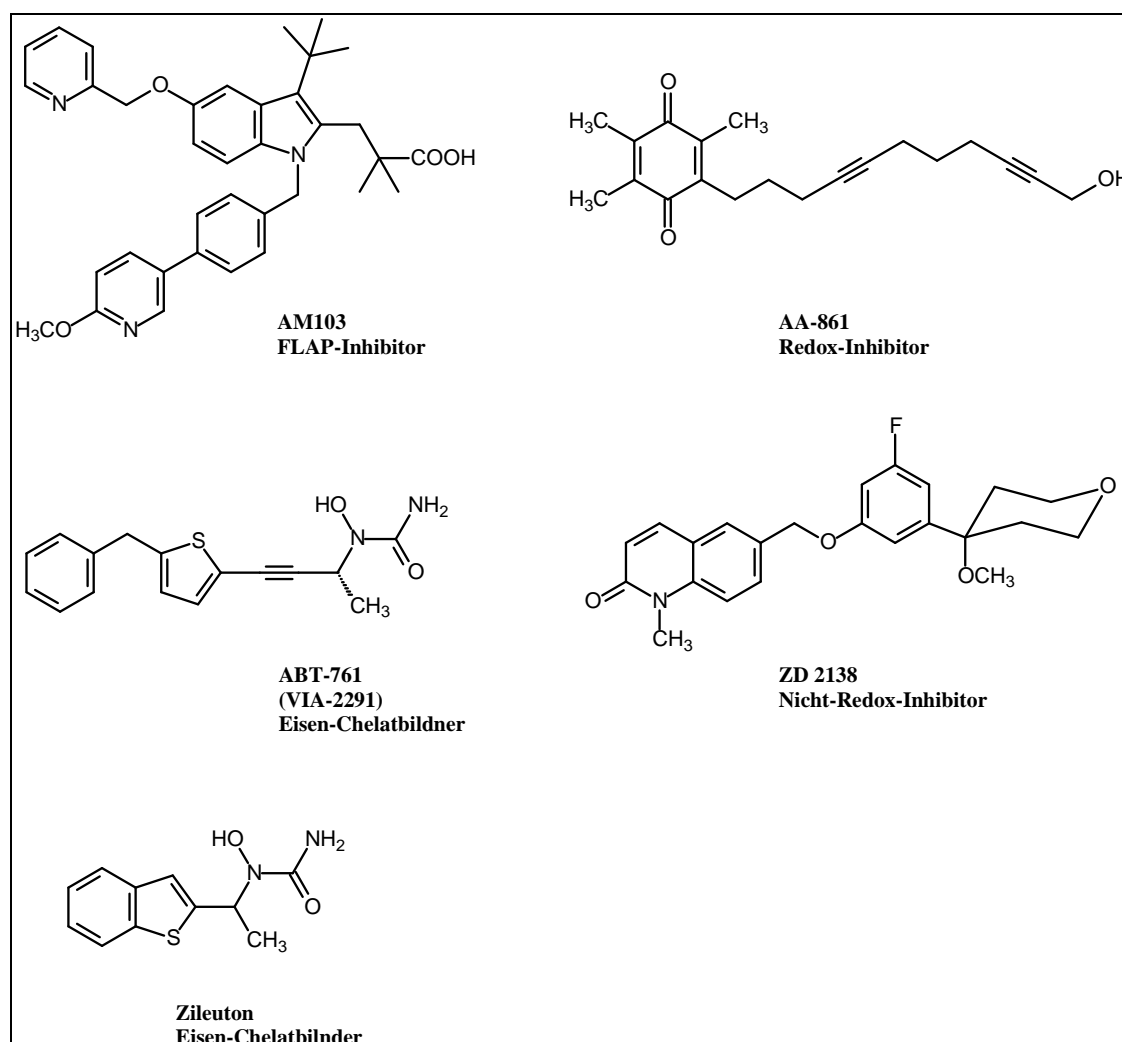


Abbildung 12: Beispiele einiger 5-LOX-Inhibitoren [34, 84]

1.6.4 Duale COX/LOX-Hemmer

Neben COX-2-selektiven Inhibitoren gibt es auch andere Ansätze zur Entwicklung gastrointestinal verträglicher NSAR. Wird die Cyclooxygenase gehemmt, erfolgt die Umsetzung der Arachdionsäure vermehrt über den Lipoxygenaseweg (sogenannte Shunt-Hypothese) [85]. Durch die erhöhte Konzentration an Leukotrienen (in diesem Fall LTB₄, LTC₄ und LTD₄) kommt es durch Mikrozirkulationsstörungen zu lokalen ischämischen Zuständen und Schleimhautläsionen [86]. Mit dualen Hemmstoffen der COX-1/-2 und 5-LOX sollte es möglich sein, diesen Toxizitätsmechanismus zu vermeiden [87].

Die duale Hemmung kann entweder durch den Einsatz eines Wirkstoffes, der gleichzeitig COX und 5-LOX inhibiert, erreicht werden oder durch die Verknüpfung eines 5-LOX-Inhibitors mit einem COX-Hemmer. Duale COX/LOX-Inhibitoren besitzen in der Regel einen Fünfring, der mit zwei Arylresten verknüpft ist [34, 88, 89]. Einige der dualen Wirkstoffe sind Redox-Inhibitoren; das gemeinsame Strukturmerkmal ist hier ein Di-*tert*-Butyl-Rest. Der Nachteil dieser redoxaktiven Strukturen ist die fehlende Selektivität, so dass auch andere Redoxsysteme in der Leber inhibiert werden. Deshalb wurde die Entwicklung redoxaktiver COX/LOX-Inhibitoren, mit Ausnahme des Wirkstoffs S-2474, eingestellt [16, 90]. Viele neu entwickelte duale COX/LOX-Hemmer zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zu den Coxiben. Der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib wurde kürzlich ebenfalls als 5-LOX-Inhibitor identifiziert [91]. Zwei weitere neue Strukturklassen stellen Phenylsulfonyl-Ureido-Chalcon-Derivate sowie eine strukturelle Kombination aus Resveratrol und Acrylsäure dar [92, 93].

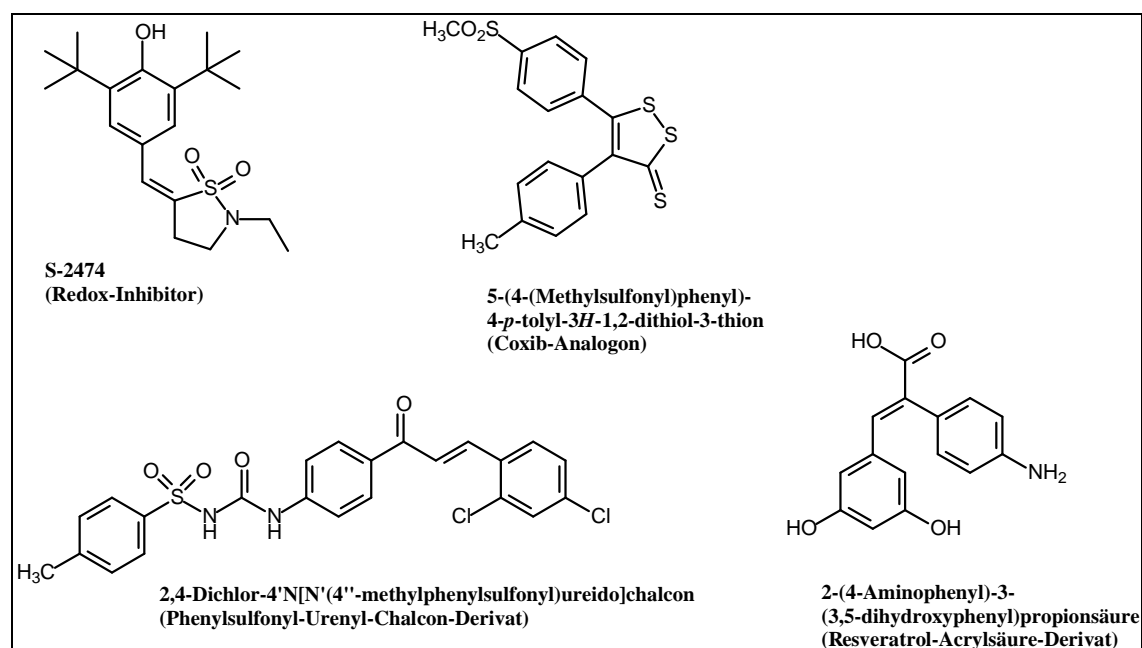


Abbildung 13: Beispiele einiger dualer COX/LOX-Inhibitoren [16, 34]

Licofelon (ML3000)

Licofelon ist ein dualer COX-/LOX-Inhibitor mit IC_{50} -Werten im submikromolaren bis mikromolaren Bereich. Er wirkt analgetisch, antipyretisch, antiinflammatorisch und hemmt die Thrombozytenaggregation. Strukturell handelt es sich um ein Substratanalogon der Arachidonsäure, das die Konformation relevanter Teilbereiche der Arachidonsäure im aktiven Zentrum der Enzyme nachahmt. Licofelon wurde 1994 entwickelt [87] und soll für die Indikation Arthrose (Osteoarthritis) eingesetzt werden. Im Vergleich mit den klassischen NSAIDs sind die gastrointestinalen Nebenwirkungen bei Licofelon geringer [34, 85, 94, 95, 96, 97].

Nach neusten Erkenntnissen ist Licofelon kein klassischer dualer COX/LOX-Hemmer, sondern inhibiert FLAP, COX-1 und die mikrosomale Prostaglandin E_2 -Synthase-1 (mPGES-1) [34, 98, 99].

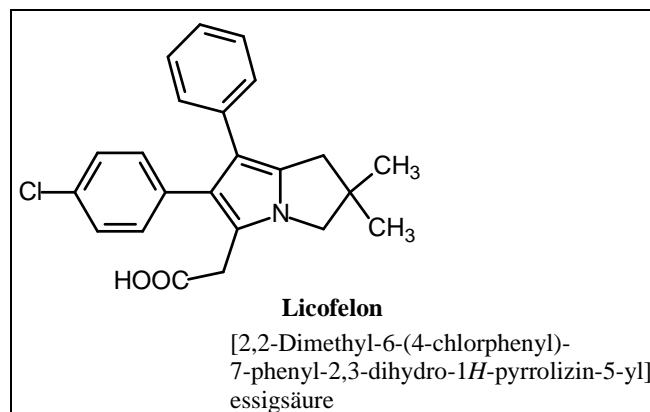


Abbildung 14: Struktur von Licofelon [100]

1.6.5 Weitere vielversprechende Targets

PLA₂: Die Hemmung der Phospholipase A₂ als Schlüsselenzym der Arachidonsäure-Kaskade wird als interessantes Target betrachtet, da nicht nur die Prostaglandin-Synthese sondern auch die Produktion von Leukotrienen, Lysophospholipiden und PAF inhibiert werden kann. Da es jedoch eine Vielzahl von Phospholipasen im menschlichen Organismus gibt, stellt die Wirkstoffspezifität ein Hauptproblem dar. Die bislang beschriebenen cPLA₂-Inhibitoren sind strukturell sehr unterschiedlich, ein Beispiel für einen potenten cPLA₂-Inhibitor ist AR-C73346XX [23].

mPGES-1: Bei der Schmerzentstehung könnte Prostaglandin E₂ der hauptverantwortliche Entzündungsmediator sein. PGE₂ wird durch die PGE₂-Synthase aus PGH₂ synthetisiert. Die mikrosomale PGE₂-Synthase-1 (mPGES-1) ist induzierbar und mit der COX-2-Expression gekoppelt. Die Vorteile der mPGES-1-Inhibition sind noch fraglich, da auch andere Prostanoiden außer PGE₂ an Entzündungsreaktionen beteiligt sind.

Zudem kann die Hemmung der PGE₂-Synthese durch bislang unbekannte Vorgänge kompensiert werden. Nichtsdestotrotz wird mPGES-1 als ein neues vielversprechendes Target zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen und Krebs betrachtet. Das Indol-Derivat MK-886, das zunächst als potenter FLAP-Inhibitor beschrieben wurde, ist ein Beispiel für einen mPGES-1-Inhibitoren [101, 102].

mPGES-1/5-LOX: Um die kardiovaskulären Risiken der COX/LOX-Inhibition zu vermeiden, stellt die duale Hemmung der mPGES-1 und der 5-LOX eine neue pharmakologische Strategie dar. Die Prostacyclin-Bildung wird durch die Inhibition der mPGES-1 nicht beeinflusst. Ein Beispiel für einen solchen Wirkstoff ist 2-(3-Chlorbenzyl)-5-hydroxy-1*H*-benzo[*g*]indol-3-ameisensäureethylester [34].

NO-NSAIDs: Stickstoffmonoxid besitzt vielfältige physiologische und pathophysiologische Funktionen im Organismus. NSAIDs, die NO-Donor-Gruppen enthalten, weisen - aufgrund der protektiven Wirkung von NO auf die Magenschleimhaut - weniger gastrointestinale Nebenwirkungen auf. Dies macht die sogenannten NO-NSAIDs zu einer interessanten Alternative der klassischen NSAIDs. Auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen treten bei dieser Wirkstoffgruppe nicht auf, da Stickstoffmonoxid vasodilierend wirkt und die Plättchenaggregation hemmt. Das in Abbildung 15 aufgeführte Pyrazol-Derivat ist ein solches COX-Inhibitor/NO-Donor-Hybridmolekül, das selektiv die COX-2 hemmt und NO freisetzt [40, 103].

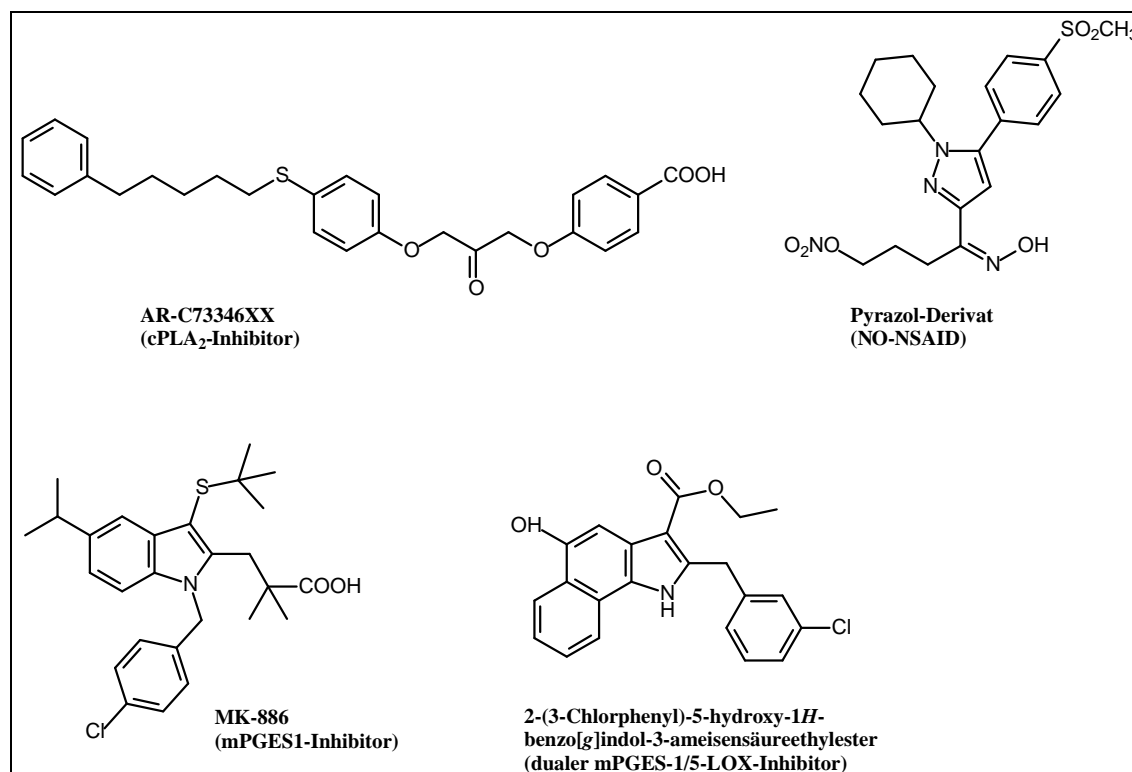


Abbildung 15: Strukturbeispiele einiger neuer Wirkstoffe [23, 34, 40, 102]

1.7 Die Haut als Applikationsort

1.7.1 Einführung

Das größte, schwerste und vielseitigste Organ des Menschen, die Haut, bildet als Oberfläche des Körpers die Schranke zwischen der Umwelt und dem inneren Milieu. Sie schützt die Gewebe gegen exogene Noxen, verhindert eine zu starke Austrocknung, vermittelt als Sinnesorgan vielfältige Reize und fungiert als Wärmeregulator [13].

1.7.2 Aufbau der Haut

Die menschliche Haut besitzt eine Dicke von 1 bis 4 mm und eine Fläche von 1,6–2,0 m² [104]. Sie setzt sich aus der Epidermis (Oberhaut) mit den Anhangsgebilden (Drüsen, Nägeln, Haaren) und der Dermis/Korium (Lederhaut), einem bindegewebigen Anteil, zusammen. Epidermis und Korium werden als Kutis bezeichnet. Darunter befindet sich die Subkutis (Unterhaut) [13]. Die Epidermis lässt sich, von außen nach innen, in Stratum corneum (Hornhaut), Stratum granulosum (Körnerschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und Stratum basale (Basalschicht) weiter unterteilen [104]. In Abbildung 16 ist der Aufbau der Haut dargestellt.

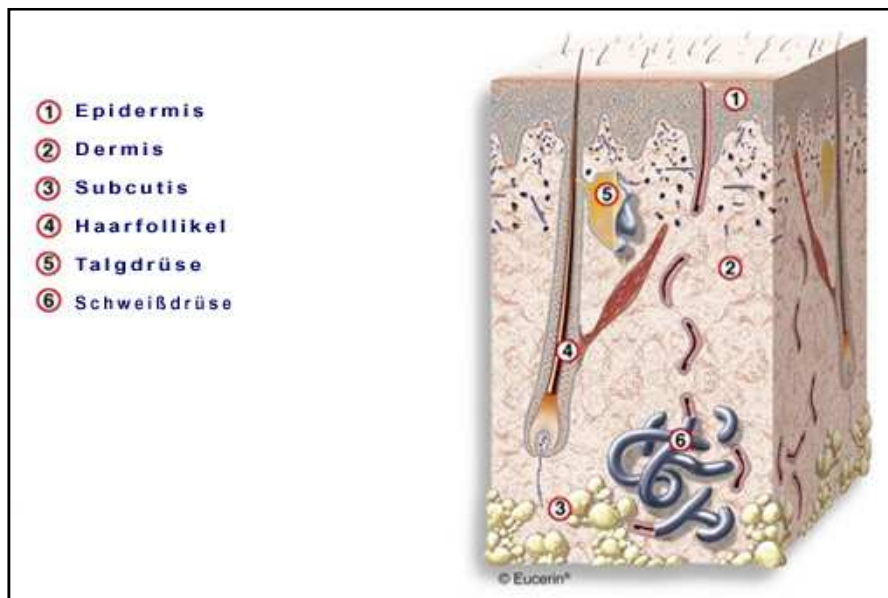


Abbildung 16: Aufbau der Haut [105]

Die Dermis besteht hauptsächlich aus Kollagen und Elastin und ist für die Elastizität und mechanische Stabilität der Haut verantwortlich. Hier finden sich auch zahlreiche Nervenfasern und Gefäße. Der Wassergehalt beträgt 70%. Die Epidermis enthält zu

90% Keratinozyten. Befinden sich die Keratinozyten im Stratum corneum, werden sie auch als Corneozyten bezeichnet. Charakteristisch ist das große Wasseraufnahmevermögen. Das Stratum corneum besteht aus etwa 15-20 Schichten Corneozyten und einem Lipidgemisch aus Ceramiden, Cholesterin und Cholesterinestern. Ein Hydrolipidfilm aus Fettsäuren, Triglyceriden, Wachsen und Aminosäuren überzieht die Hornschicht. Die Subkutis setzt sich aus Bindegewebe und Fettzellen zusammen und ist für die Speicherung von Energie in Form von Fett zuständig. Des Weiteren übernimmt sie eine Schutzfunktion [104].

1.7.3 Entzündungsreaktionen der Haut

Im Folgenden werden einige entzündliche Dermatosen kurz genannt. Eine genauere Erläuterung einer entzündlichen Reaktion der Haut erfolgt am Beispiel der Dermatitis solaris.

Eine typische entzündliche Hauterkrankung ist Psoriasis vulgaris (Schuppenflechte), bei der die Keratinozyten-Reifung gestört und die -Proliferation beschleunigt ist. Es kommt zu einer entzündlichen Infiltration der Haut. Auch bei Ekzemen (Dermatitis) handelt es sich um Entzündungsreaktionen. Durch inflammatorische Reaktionen im Stratum papillare und in der Epidermis kommt es zur Ödembildung und Einwanderung von T-Lymphozyten in die Epidermis. Es wird zwischen einem toxischen oder allergischen Kontaktexzem - das durch exogene Noxen verursacht wird -, einem atopischen Ekzem (Neurodermitis) und einem seborrhoischen Ekzem unterschieden. Eine weitere entzündliche Dermatose ist Akne. Der Begriff Akne bezeichnet Erkrankungen der Talgdrüsen-follikel. Sistiert der Talgabfluss aufgrund einer follikulären Verhornungsstörung bei gleichzeitiger starker Talgproduktion, entstehen als Primäreffloreszenzen Komedone. Als entzündliche Effloreszenzen treten nachfolgend Papeln, Pusteln und Knoten auf. Ausgelöst werden kann Akne durch Bakterien, chemische oder physikalische Noxen. Man unterscheidet zwischen einer endogenen und exogenen Akne [13, 106, 107, 108, 109, 110].

Dermatitis solaris (Sonnenbrand)

Die UV-Strahlung des Sonnenlichts lässt sich in verschiedene Bereiche einteilen, die unterschiedliche Wirkungen auf die Haut besitzen. UV-A-Strahlung (λ 320-400 nm) dringt bis in die Lederhaut ein, wo sie durch Wechselwirkung mit Bindegewebsfasern die Hautelastizität dauerhaft schädigen kann. Zudem kann UV-A-Strahlung Lichtdermatosen auslösen. UV-B-Strahlung (λ 280-320 nm) verursacht bei übermäßiger Einwirkung akute Hautschäden. Als Spätfolge können bösartige Neubildungen auftreten. UV-C-Strahlung ($\lambda < 280$ nm) wirkt erythemauslösend. Durch die Ozonschicht wird dieser Anteil des Sonnenlichts fast vollständig herausgefiltert [104]. Bei einem Sonnenbrand handelt es sich um eine akute Hautschädigung, die durch Absorption von UV-Licht, insbesondere von UV-B-Strahlen, hervorgerufen wird. Es

kommt zu einer akuten Entzündungsreaktion, die als Erythem (entzündungsbedingte Hautrötung) bereits nach einigen Stunden sichtbar wird. Charakteristisch für eine Dermatitis solaris ist die erhöhte Konzentration von Prostaglandinen in den ersten 24-48 h nach Einwirkung, gefolgt von den Produkten des Lipoxygenaseweges. Auch die Expression der COX-2 und der 12- und 15-LOX ist erhöht [111].

Als antientzündliche Dermatika werden oft Glucocorticoide eingesetzt. Bei entzündlichen Hauterkrankungen immunpathologischer Genese werden zudem Immunsuppressiva verwendet [8]. Auch die topische Anwendung nicht steroidaler Antiphlogistika ist bei Entzündungsreaktionen der Haut indiziert [112, 113]. So werden NSAIDs unter anderem bei der Behandlung von Akne, Psoriasis, Dermatitis solaris und Erythema nodosum angewandt. Aspirin, Flurbiprofen, Indomethacin und Diclofenac zeigten sich in Testungen bei der Eindämmung der Entzündungsreaktion nach einem Sonnenbrand erfolgreich [114, 115]. Die topische Anwendung von NSAIDs wird nicht nur bei der Therapie entzündlicher Dermatosen sondern auch bei anderen Indikationen eingesetzt. Bei Muskel- und Gelenkschmerzen können NSAIDs wie Ibuprofen und Diclofenac sowohl oral als auch topisch appliziert werden [1, 116]. Die geringere Konzentration der Wirkstoffe im Blut im Vergleich zu einer oralen Gabe vermindert das Nebenwirkungsrisiko [11]. Auch bei der Behandlung rheumatischer Erkrankungen können NSAIDs topisch angewendet werden, hier ist jedoch eine systemische Wirkung erwünscht [117].

1.7.4 Aspekte der topischen Anwendung

Das Eindringen von Stoffen in die intakte Haut über das Stratum corneum ist gering [118]. Voraussetzungen für die Penetration und Permeation sind eine gewisse Lipophilie und gleichzeitige Wasserlöslichkeit des Arzneistoffes. Der Arzneistofftransport lipophiler Wirkstoffe durch passive Diffusion findet durch lipidreiche Interzellularräume der Hornhaut statt. Nach Passage des Stratum corneum erfolgt die Durchdringung der tiefer gelegenen Schichten und die Aufnahme in das kapillare System wesentlich schneller. Wirkstoffe, die die Hornschicht durchdringen, können zu unerwünschten systemischen Nebenwirkungen führen. Dies ist vor allem bei großflächiger Applikation auf die geschädigte Haut zu berücksichtigen [104]. In welchem Ausmaß Arzneistoffe in die Hornschicht ein- und diese durchdringen können, hängt sowohl vom Applikationsort als auch von den Eigenschaften des Arzneistoffes und der Zusammensetzung der Arzneiform ab [8, 104]. Eine erste Abschätzung der Penetrationsfähigkeit ist durch Betrachtung des Verteilungskoeffizienten ($\log P$ -Wert), der Löslichkeit, Polarität, Molekülgröße, des pK_a -Werts und des Dissoziationsgrads unter physiologischen pH-Bedingungen des Arzneistoffs möglich. Geeignet sind vor allem Wirkstoffe mit einem $\log P$ -Wert von 4-4,5 und einem Molekulargewicht unter 500 g/mol [118, 119].

2 Zielsetzung

Bei Entzündungsreaktionen nimmt die Arachidonsäure-Kaskade eine zentrale Rolle ein. Die Hemmung von Enzymen dieser Kaskade verhindert die Neusynthese von Prostaglandinen und Leukotrienen, die wichtige Schmerzmediatoren darstellen. Klassische nicht steroidale Antiphlogistika hemmen entweder eines oder beide COX-Isoenzyme. Der Einsatz dieser Arzneistoffe ist jedoch teilweise mit beträchtlichen Nebenwirkungen verbunden. Um diese Nebenwirkungen zu vermindern und das Wirkspektrum zu verbessern, ist es sinnvoll nicht nur die Cyclooxygenasen sondern auch die 5-Lipoxygenase zu hemmen, die für die Synthese der Leukotriene verantwortlich ist [95, 120, 121, 122].

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese von Substanzen, die sowohl COX-1 als auch COX-2 und 5-LOX inhibieren und zur topischen Anwendung eingesetzt werden können. Zu diesem Zweck sollten zwei Strukturklassen entwickelt, synthetisiert und derivatisiert werden.

Die Leitsubstanz der ersten Strukturklasse wurde in Anlehnung an die Struktur von Licofelon entworfen (siehe Abbildung 17). Licofelon ist ein dualer COX/LOX-Inhibitor für die Indikation Osteoarthritis [87, 100, 123]. Durch den Austausch einzelner Substituenten an den Phenylringen sollte die Leitstruktur schrittweise verändert werden, um die Wirksamkeit zu optimieren. Die Substituentenvariation erfolgte anhand des sogenannten Topliss-Schemas [124].

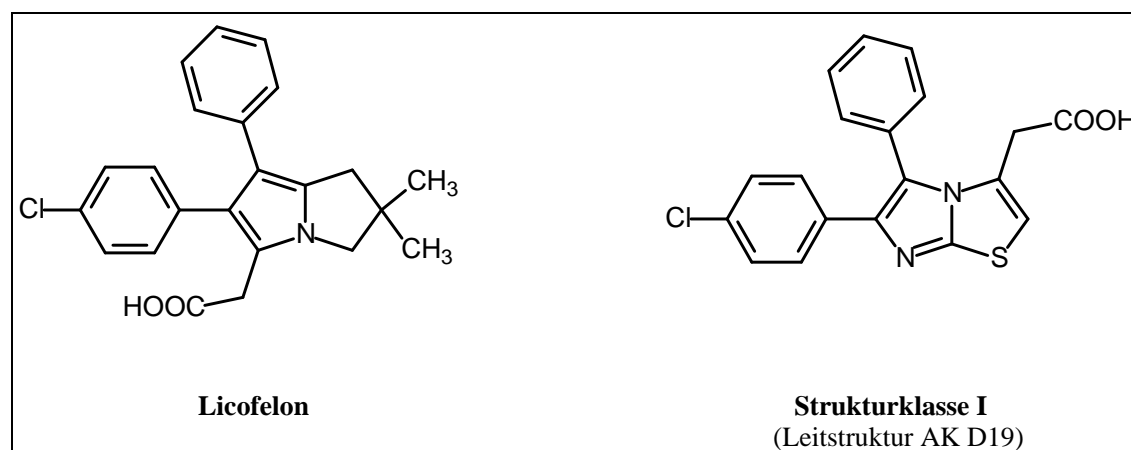


Abbildung 17: Strukturvergleich von Licofelon mit der Leitstruktur AK D19 der Strukturklasse I dieser Arbeit

Bei der zweiten Substanzklasse wurde durch Kombination zweier antiinflammatorisch wirksamer Moleküle - mit dem Ziel eines synergistischen Effekts - eine Optimierung der Wirksamkeit angestrebt. Als Komponenten dienten 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol-2-thiol (Z11) und ein Chalcon (siehe Abbildung 18). Z11 ist sowohl in der Literatur als auch in vorangegangenen Arbeiten des Arbeitskreises als dualer COX/LOX-Inhibitor beschrieben [119, 125, 126]. Chalcone besitzen eine 1,3-Diphenylpropenon-Partialstruktur und können über einen der beiden Phenylringe mit Z11 verknüpft werden (siehe Abbildung 18). In der Literatur wurde vielfach über die vielfältigen pharmakologischen Eigenschaften der Chalcone berichtet; im Rahmen dieser Arbeit stand deren antiinflammatorische Eigenschaft im Vordergrund [127, 128].

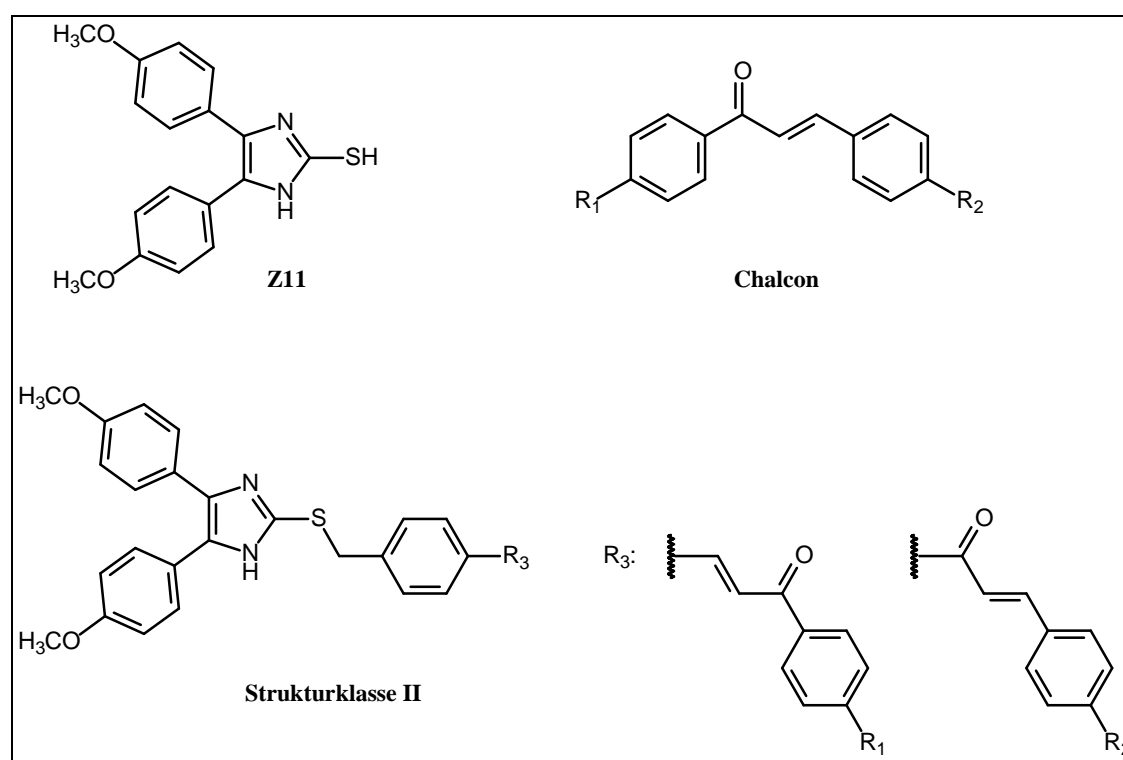


Abbildung 18: Strukturklasse II durch Kopplung von Z11 und der Chalconstruktur

Zur Beurteilung der Effektivität und Toxizität der Substanzen sollten diese pharmakologisch charakterisiert werden. Hierfür standen verschiedene *in vitro*-Testsysteme im Arbeitskreis zur Verfügung, die Aufschluss über die COX-1-, COX-2- und 5-LOX-Inhibition der synthetisierten Substanzen gaben. Des Weiteren wurden die Substanzen auf eine mögliche inhibitorische Aktivität gegenüber TNF- α untersucht. Da die Entwicklung der Testverbindungen mit dem Ziel der topischen Anwendung erfolgte, wurde eine log P-Wert-Bestimmung durchgeführt, um eine Aussage über die Lipophilie der Verbindungen treffen zu können.

3 Chemischer Teil

3.1 Einleitung

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Testsubstanzen lassen sich aufgrund ihrer Struktur in zwei Klassen unterteilen. Diese beiden Substanzklassen werden im Folgenden als Imidazothiazole und Chalcone bezeichnet. Im ersten Teil des Kapitels (Kapitel 3.2) werden die Entwicklung und Synthesen der Imidazothiazole beschrieben. Im zweiten Teil (Kapitel 3.3) folgen die die Synthesen der Substanzgruppe der Chalcone.

3.2 Imidazothiazole

3.2.1 Einführung

Zu Beginn des Kapitels wird das Design der Leitstruktur näher erläutert. Da sich die Variation der Substituenten am Topliss-Schema orientiert, wird hierauf näher eingegangen und es werden die Grundlagen der quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgeführt. Es folgt die Syntheseentwicklung der Leitstruktur. Nach einem Überblick über die Testsubstanzen schließen sich die Synthesen verschiedener Vorstufen an.

3.2.2 Entwicklung der Leitstruktur

Das Vorhandensein saurer Gruppen und der Besitz ein oder mehrerer aromatischer oder heteroaromatischer Ringsysteme ist ein Charakteristikum der klassischen NSAIDs [8, 12]. Die genannten Strukturelemente sind auch in der Leitstruktur dieser Arbeit zu finden. Ein typisches Beispiel für ein klassisches NSAID ist Indometacin (Abbildung 19).

Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen der Leitstruktur und den COX-2-selektiven Coxiben sind ebenfalls zu erkennen. Wie am Beispiel von Celecoxib (Abbildung 19) zu sehen ist, enthalten Coxibe meist einen fünfgliedrigen Heterocyclus, der vicinal mit zwei Phenylringen substituiert ist [12]. Auch die Leitstruktur ist so aufgebaut.

Als weiteres Vorbild bei der Strukturentwicklung diene Licofelon, [2,2-Dimethyl-6-(4-chlorphenyl)-7-phenyl-2,3-dihydro-1*H*-pyrrolizin-5-yl]essigsäure, das sowohl COX-1 als auch COX-2 und 5-LOX inhibiert [100]. Licofelon enthält unter anderem folgende

Strukturelemente, die bei der Entwicklung der Leitstruktur aufgegriffen wurden: einen anellierten Fünfring-Heterocyclus, der an zwei benachbarten Positionen mit Phenylringen verknüpft ist sowie eine Essigsäurefunktion.

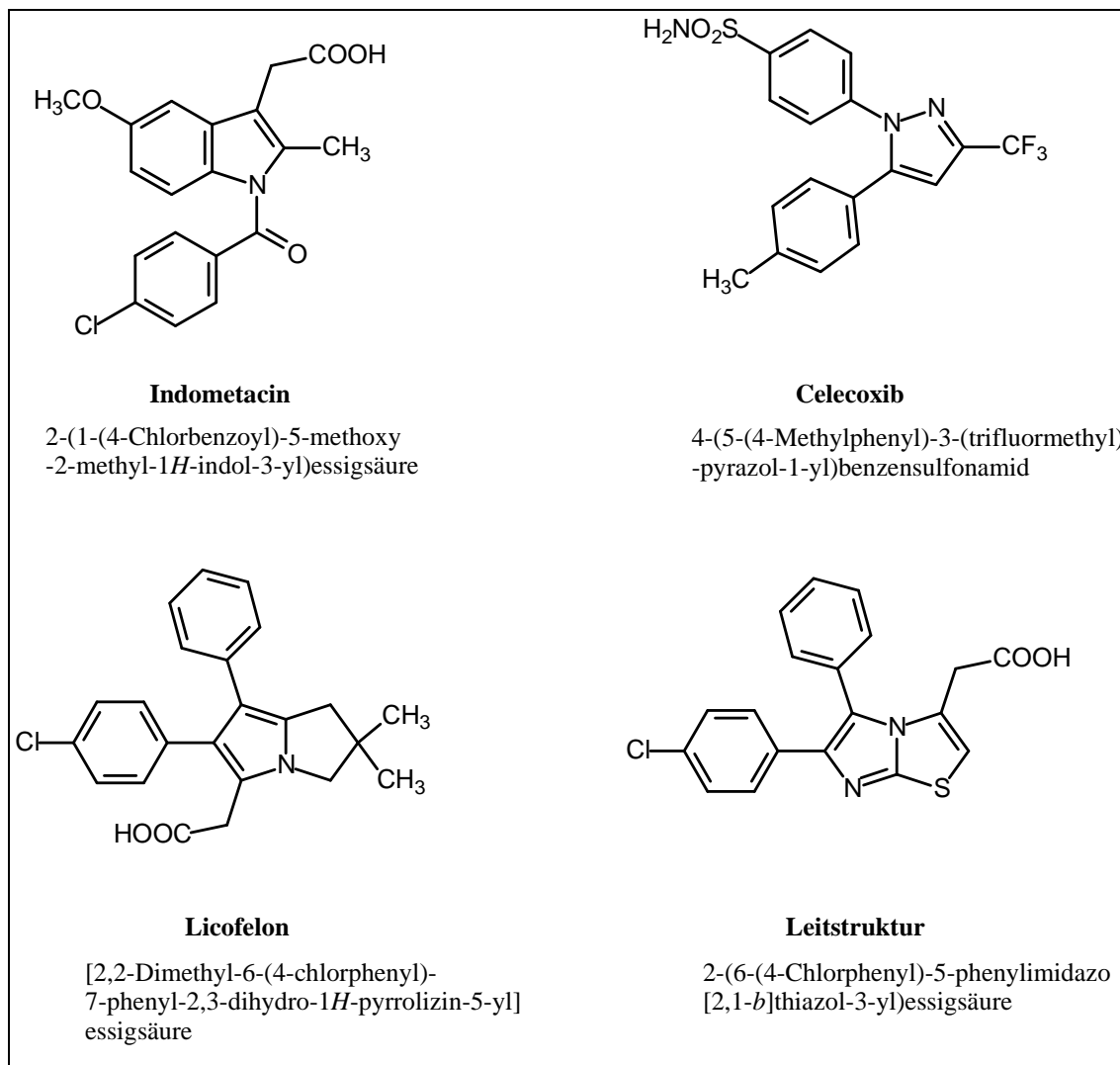


Abbildung 19: Vergleich der Leitstruktur mit Indometacin, Celecoxib und Licofelon [12]

Bei einem Vergleich der Struktur von Licofelon mit der Leitstruktur dieser Arbeit wird deutlich, dass es sich bei der Leitstruktur ebenfalls um einen anellierten Fünfring-Heterocyclus, in diesem Fall ein Imidazo[2,1-*b*]thiazol, handelt, der an zwei benachbarten Positionen mit Phenylringen substituiert ist und eine Essigsäurefunktion trägt. Beide Moleküle weisen an einem der Phenylringe einen *p*-Chlor-Substituenten auf.

Bei der klassischen Wirkstoffoptimierung geht man meist unidirektional vor, das heißt die Optimierung erfolgt jeweils nur an einer Position des Moleküls [129]. Ausgehend von der in Abbildung 19 gezeigten Leitstruktur wurde das Molekül an beiden Phenylringen anhand des Topliss-Schemas (siehe Kapitel 3.2.3.2) stufenweise verändert, um die antiinflammatorische Wirksamkeit zu maximieren.

3.2.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

3.2.3.1 Überblick

Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen (engl. quantitative structure-activity relationship, QSAR) basieren auf der Annahme, dass Veränderungen in der Molekülstruktur zu proportionalen Veränderungen der biologischen Aktivität führen. Voraussetzung hierfür ist, dass die zu vergleichenden Substanzen gleiche oder sehr ähnliche Grundgerüste haben und mit einem identischen Wirkmechanismus am selben biologischen Target angreifen. Die Wirkstärke und das Wirkspektrum einer Substanz sind abhängig von den elektronischen, sterischen und hydrophoben Eigenschaften der Substituenten [129].

Bereits im 19. Jahrhundert beschäftigten sich Wissenschaftler mit den Zusammenhängen zwischen der biologischen Aktivität und der Struktur von Substanzen. Hammett formulierte Mitte der dreißiger Jahre des letzten Jahrhunderts eine Beziehung zwischen den elektronischen Eigenschaften von Substituenten und der Reaktivität aromatischer Verbindungen. Die Hammett-Konstante σ (siehe Formel 1) beschreibt die elektronischen Parameter von Substituenten in *m*- und *p*-Stellung, sie ist positiv im Falle von Elektronenakzeptoren und negativ bei Elektronendonatoren. Für Substituenten in *o*-Position lässt sich die Hammett-Konstante nicht anwenden, da hier auch sterische Effekte eine Rolle spielen.

Formel 1: Definition der Hammett-Konstante σ

$$\log K_{R-X} - \log K_{R-H} = \rho\sigma$$

K: Gleichgewichtskonstante; ρ : Reaktionskonstante; R-X: Produkt; R-H: Edukt

Des Weiteren entwickelte Hammett die Hammett-Gleichung, die jedoch keine Allgemeingültigkeit besitzt. Fujita und Hansch kombinierten 1964 hydrophobe Konstanten mit der elektronischen Konstante von Hammett und kamen so zur Hansch-Gleichung (siehe Formel 2). Damit war der Grundstein für die quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen gelegt. Zudem entwickelten sie, analog zur Hammett-Konstante, den Lipophilie-Parameter π (siehe Formel 3).

Formel 2: Hansch-Gleichung

$$\log 1/C = -k_1(\log P)^2 + k_2(\log P) + k_3\sigma + \dots k$$

C: molare Konzentration; P: Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient; σ : Hammett-Konstante; k: Regressionskoeffizienten

Formel 3: Definition des Lipophilie-Parameters π

$$\log P_{R-X} - \log P_{R-H} = \pi_x$$

P: Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient; R-X: Produkt; R-H: Edukt; π_x : Lipophilie eines Substituenten X

Neben der Hansch-Gleichung wurden auch andere Methoden entwickelt, um Struktur-Aktivitäts-Fragen zu klären, wie zum Beispiel das Free-Wilson-Modell oder dessen Weiterentwicklung, die Fujita-Ban-Analyse. Es wird hierbei davon ausgegangen, dass sich die biologische Aktivität eines Moleküls aus der Aktivität μ des Grundgerüsts und den additiven und konstitutiven Gruppenbeiträgen a_i der Substituenten zusammensetzt. Die Zuverlässigkeit der Analyse ist jedoch durch die oftmals große Zahl von Variablen gemindert. Zudem können nur Vorhersagen für neue Kombinationen von bereits bekannten Substituenten und nicht für neue Substituenten getroffen werden. Craig schlug 1971 für die Variation aromatischer Substituenten einen zweidimensionalen Plot vor, der wichtige physikochemische Eigenschaften, z.B. die Lipophilie und elektronische Eigenschaften, beinhaltet. Aus allen vier Quadranten des Plots werden Substituenten ausgewählt, um die Kombinationen von Eigenschaften zu überprüfen [130, 131, 132].

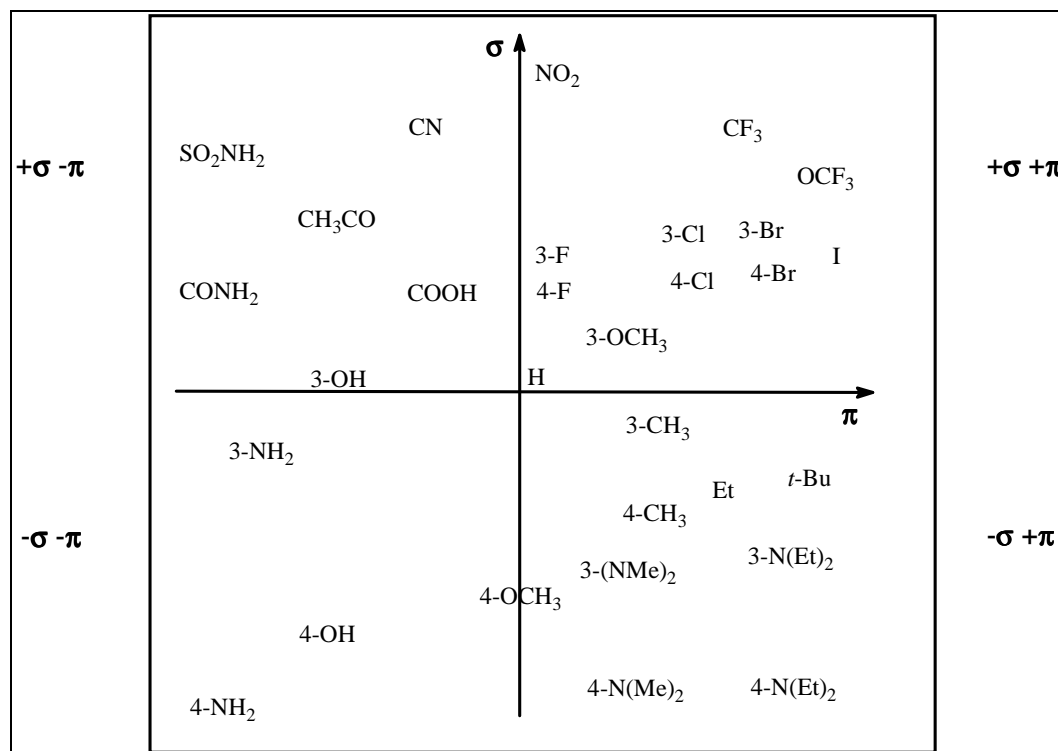


Abbildung 20: Craig Plot [133, 134]

1972 machte Topliss einen weitergehenden Vorschlag, der auf den Hansch-Prinzipien beruht. Zur Optimierung des Substitutionsmusters geht man von zwei Strukturen aus und vergleicht deren biologische Aktivität. Je nach Ergebnis werden neue Substituenten eingeführt. Hierfür orientiert man sich am sogenannten Topliss Decision Tree, der sich stufenweise verzweigt und abhängig von den Testergebnissen bestimmte Substituenten vorschlägt (siehe auch Kapitel 3.2.3.2) [135].

Mittlerweile gibt es verschiedene Stufen von QSAR, die sich in der Komplexität der Daten unterscheiden: zwei-, drei- und mehrdimensionale Methoden. Ab 3D-QSAR können Anordnungen der Moleküle im Raum berücksichtigt werden. Virtuelles Screening von Substanzdatenbanken ist zu einer vorherrschenden Strategie in der Wirkstoffentwicklung geworden [136].

3.2.3.2 Substituentenvariation nach Topliss

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Leitstruktur nach Topliss variiert. Das Schema basiert auf der Hansch-Methode, es ist jedoch nicht-mathematisch. Die Substituenten werden stufenweise ausgewählt und miteinander verglichen, um möglichst schnell zu einer hochpotenten Verbindung zu gelangen. Zu Beginn wird von zwei Substanzen ausgegangen. Die Planung der nächsten Verbindung orientiert sich daran, welche der beiden Substanzen im Testsystem eine höhere Wirkung zeigt. Nach Synthese und Testung der nächsten Substanz wird deren biologische Aktivität mit der der

vorhergehenden Substanz verglichen. Verbessert der neue Substituent die Wirksamkeit, so wählt man als nächstes einen Substituenten aus, der gleiche physikalisch-chemische Eigenschaften in stärkerem Ausmaß hat oder führt mehrere dieser Substituenten ein. Zur Auswahl der Substituenten bezieht man sich auf den bereits erwähnten Topliss Decision Tree (siehe Abbildung 21). Die Topliss-Methode lässt sich sowohl für eine Substitution an Aromaten als auch an aliphatischen Seitenketten anwenden. Nachteilig bei dieser Strategie ist der zeitliche Aufwand, der für ein schrittweises Vorgehen erforderlich ist [129, 137].

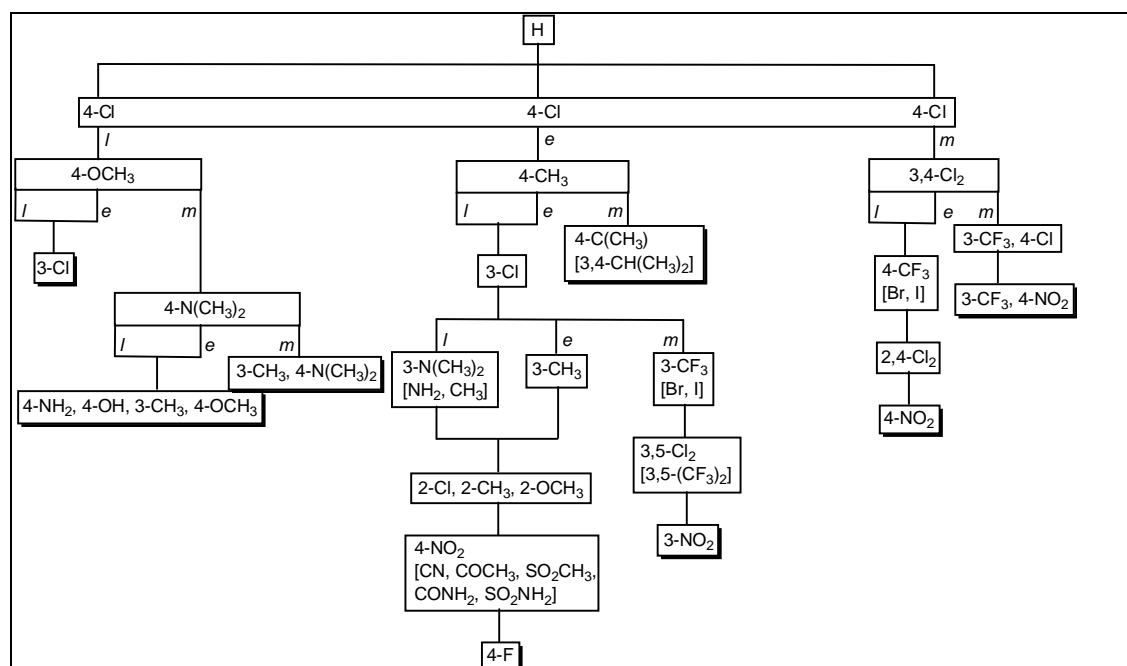


Abbildung 21: Topliss Decision Tree [124]

m: more active, e: equiactive, l: less active; alternative Substituenten in eckigen Klammern

Im Folgenden wird die Anwendung des Topliss Decision Tree kurz erläutert. Es wird mit der Synthese und anschließenden Testung der unsubstituierten Phenylkomponente (H) begonnen und diese mit der *p*-Chlor-substituierten Variante verglichen, da sich gezeigt hat, dass die biologische Aktivität oftmals mit steigenden π -Werten zunimmt ($\pi(\text{H}) = 0$, $\pi(4\text{-Cl}) = 0.70$). Die biologische Aktivität der *p*-Chlor-substituierten Verbindung kann höher, niedriger oder gleich der Wirksamkeit der unsubstituierten Phenylkomponente sein.

Ist die Aktivität höher, so beruht dies wahrscheinlich auf einem $+\pi$ - oder $+\sigma$ -Effekt oder aus einer Kombination dieser beiden Effekte. In diesem Fall wäre die 3,4-Dichlor-Variante die nächste zu synthetisierende Substanz, da somit die $+\pi$ - und $+\sigma$ -Werte weiter erhöht würden. Anschließend würde man die biologische 3,4-

Dichlorkomponente mit der 4-Chlorkomponente vergleichen und anhand des Ergebnisses den nächsten Substituenten auswählen (rechter Zweig).

Für den Fall, dass die biologischen Aktivitäten der unsubstituierten und der *p*-Chlor-Variante annähernd gleich wären, läge dies vermutlich an einem vorteilhaften $+\pi$ -Effekt der chlorierten Substanz, der durch eine ungünstige $-\sigma$ -Abhängigkeit ausgeglichen wird. Der *p*-Methyl-Substituent wäre dann die nächste Wahl, da es sich hierbei um einen $+\pi$ - und $-\sigma$ -Substituenten handelt (mittlerer Zweig).

Falls die *p*-Chlorkomponente eine geringere Potenz als die unsubstituierte Phenylkomponente aufweist, läge dies entweder an einer sterischen Hinderung durch die *p*-Substitution oder die Aktivität wäre $-\sigma$ - oder $-\pi$ -abhängig. Am wahrscheinlichsten ist die $-\sigma$ -Abhängigkeit, deshalb sollte als nächstes die *p*-Methoxy-Variante synthetisiert werden (linker Zweig).

Nach Synthese und Testung der ersten beiden Substanzen befindet man sich nach einem Vergleich der biologischen Aktivitäten in einem der drei Zweige. Nun kann die nächste vorgeschlagene Substanz synthetisiert und deren pharmakologische Potenz wiederum mit der vorhergehenden Substanz verglichen werden, bis man zum Ende des Zweiges gelangt [124, 138].

In Tabelle 6 sind für verschiedene Substituenten jeweils die drei Konstanten aufgelistet, auf deren Grundlage das Topliss Schema basiert: der Lipophilie-Parameter, der elektronische Parameter und der sterische Effekt.

Tabelle 6: Substituentenkonstanten [124]

Substituent	π	σ	E_s	Substituent	π	σ	E_s
H	0.00	0.00	1.28	3-NO ₂	0.11	0.71	-1.28
4-Cl	0.70	0.23	0.27	2-CH ₃	0.68	-0.17	-0.14
3-Cl	0.76	0.37	0.27	2-OCH ₃	-0.33	-0.27	0.69
3-CF ₃	1.21	0.43	-0.98	4-CN	-0.32	0.66	-
4-NO ₂	0.24	0.78	-1.28	4-COCH ₃	-0.37	0.38	-
4-CF ₃	1.07	0.54	-0.98	4-SO ₂ CH ₃	-1.26	0.72	-
4-Br	1.19	0.23	0.08	4-CONH ₂	-1.49	0.40	-
4-I	1.43	0.28	-0.16	4-SO ₂ NH ₂	-1.82	0.57	-
2-Cl	0.76	0.23	0.27	4-F	0.15	0.06	0.78
4-CH ₃	0.60	-0.17	-0.14	3-N(CH ₃) ₂	0.18	-0.21	-
4-C(CH ₃) ₃	1.68	-0.20	-1.65	3-NH ₂	-1.23	-0.16	0.63
3-CH ₃	0.54	-0.07	-0.14	4-OCH ₃	-0.04	-0.27	0.69
3-Br	0.94	0.39	0.08	4-NH ₂	-1.23	-0.66	0.63
3-I	1.15	0.35	-0.16	4-OH	-0.61	-0.37	0.69

π : Lipophilie-Parameter; σ : elektronischer Parameter; E_s : sterischer Faktor

3.2.4 Strukturvariationen der Leitsubstanz AK D19 nach dem Topliss-Schema

Wie schon in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, beginnt das Topliss-Schema für die Variation an Aromaten mit den Synthesen einer *p*-Chlor-substituierten und einer unsubstituierten Verbindung [124]. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Leitstruktur enthält jedoch nicht nur einen sondern zwei Phenylringe. Es ist somit möglich, sowohl in den einen als auch in den anderen Aromaten einen *p*-Chlor-Substituenten einzuführen. Diese beiden Substanzen wurden dargestellt und anschließend mit der unsubstituierten Verbindung hinsichtlich der inhibitorischen Potenz gegen COX-1, COX-2 und 5-LOX verglichen.

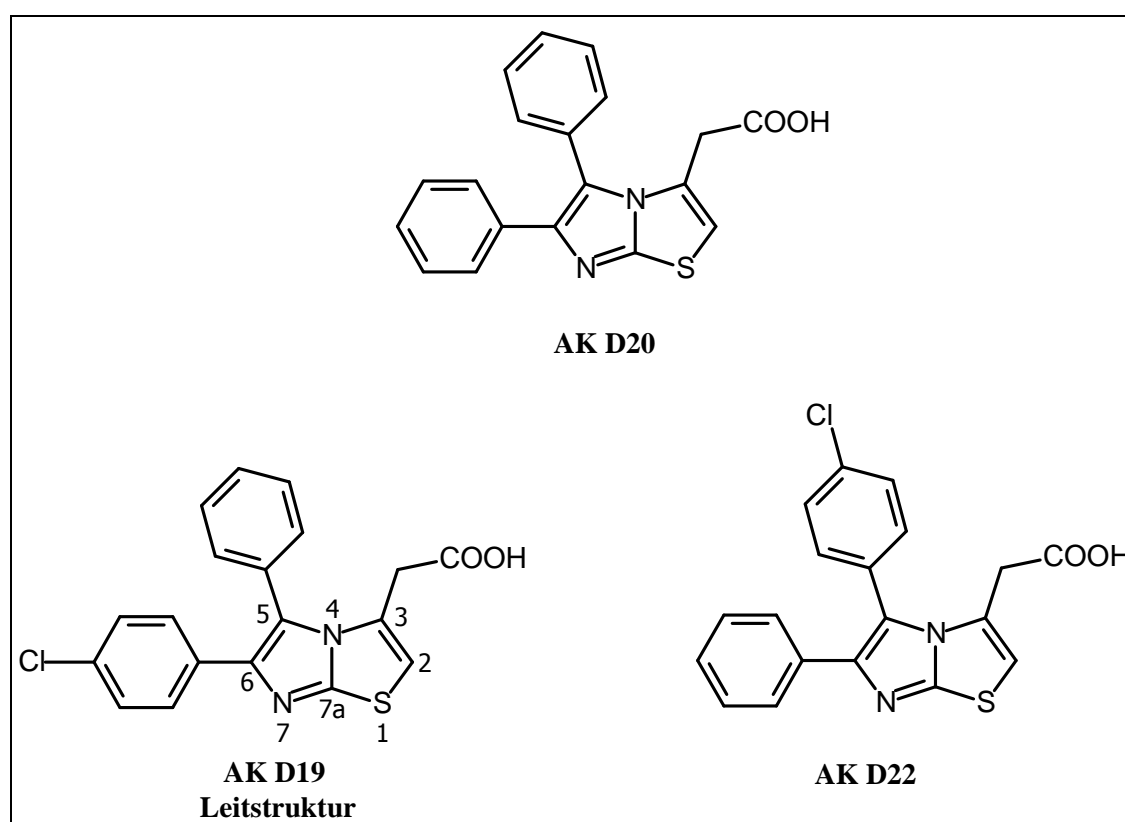


Abbildung 22: 2-(5,6-Diphenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D20), 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D19) und 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D22)

Die pharmakologischen Testergebnisse, auf die in Kapitel 4 näher eingegangen wird, zeigen, dass AK D19 eine geringere biologische Aktivität als die unsubstituierte Verbindung AK D20 aufweist. Deshalb wurden für die Variation am Phenylring, der sich an Position 6 befindet, Substituenten aus dem linken Zweig des Topliss Decision Trees entnommen. Die konstitutionsisomere Testverbindung AK D22 zeigt eine höhere Aktivität als AK D20. Dementsprechend wurden für die Variation am Phenylring der Position 5 Substituenten aus dem rechten Zweig des Topliss Decision Trees eingesetzt.

3.2.4.1 Linker Zweig des Topliss Decision Tree

Die geringere Potenz der chlorierten Substanz AK D19 gegenüber der unsubstituierten Verbindung AK D20, kann - wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben - an einer sterischen Hinderung durch die *p*-Substitution oder einer $-\sigma$ - oder $-\pi$ -Abhängigkeit der biologischen Aktivität liegen. Ein Chlorid-Substituent in *p*-Position besitzt $+\sigma$ - und $+\pi$ -Werte (siehe Tabelle 6, Kapitel 3.2.3.2). Da die $-\sigma$ -Abhängigkeit am wahrscheinlichsten ist, muss als nächstes ein Substituent mit negativem σ -Wert ausgewählt werden. Hierfür wurde die Methoxygruppe in *p*-Position eingeführt, die Substitutionskonstante beträgt $\sigma = -0.27$ [124]. Es wurde 2-(6-(4-Methoxyphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D21) erhalten. Die biologische Aktivität dieser Substanz wurde anschließend mit der unsubstituierten Verbindung AK D20 verglichen.

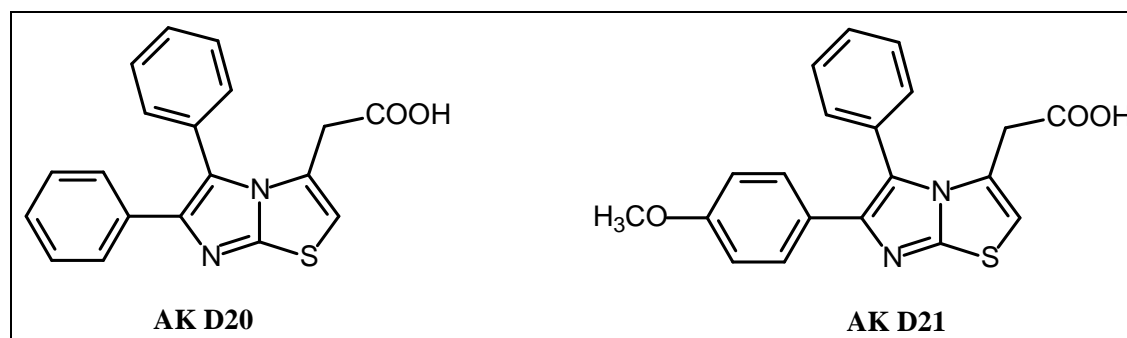


Abbildung 23: 2-(5,6-Diphenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D20) und 2-(6-(4-Methoxyphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure AK D21

Die pharmakologische Testung ergab, dass die *p*-Methoxy-substituierte Verbindung AK D21 eine höhere inhibitorische Aktivität gegenüber der COX besitzt als die unsubstituierte Variante AK D20. Die Annahme, dass die biologische Aktivität $-\sigma$ -abhängig ist, hat sich somit bestätigt. Laut Topliss-Schema wäre der nächste vielversprechende Substituent eine *p*-Dimethylamin-Funktion, da diese einen noch größer $-\sigma$ -Wert aufweist als die *p*-Methoxy-Gruppe [124].

3.2.4.2 Rechter Zweig des Topliss Decision Tree

Demgegenüber zeigt die *p*-Chlor-substituierte Verbindung AK D22 eine höhere biologische Aktivität als die unsubstituierte Variante AK D20. Dies ist entweder auf die positive Auswirkung des $+\pi$ - (+0.70) oder $+\sigma$ -Effekts (+0.23) des Substituenten zurückzuführen oder auf eine Kombination dieser beiden. Deshalb wurde als nächstes die 3,4-Dichlor-Verbindung synthetisiert, da die Einführung eines zweiten Chloratoms die $+\pi$ - und $+\sigma$ -Werte weiter erhöht [124].

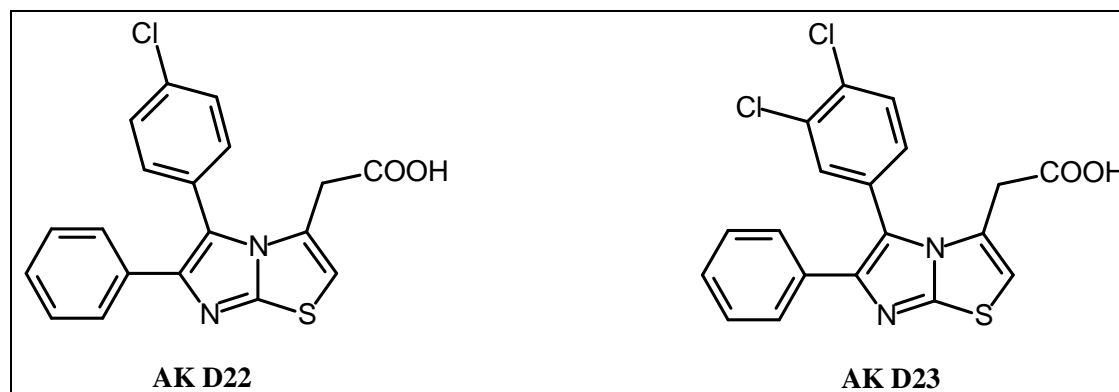


Abbildung 24: 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D22) und 2-(5-(3,4-Dichlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D23)

Die Testungen ergaben, dass AK D23 keinerlei inhibitorische Aktivität gegenüber COX-1, COX-2 und 5-LOX besitzt. Dies könnte sowohl mit einer sterischen Hinderung durch die *m*-Substitution zusammenhängen als auch an einer Überschreitung des Lipophilie-Optimums liegen. Im nächsten Schritt wäre folglich ein Substituent zu wählen, der sich in *p*-Position befinden sollte und zudem weniger lipophil als 3,4-Cl sein muss. Hierfür eignet sich die Trifluormethyl-Gruppe sowie ein Iod- oder Bromsubstituent [124].

3.2.4.3 Zusätzliche Substitutionsvariante

Da sowohl die 6-(4-Methoxyphenyl)- (AK D21) als auch die 5-(4-Chlorphenyl)-Verbindung (AK D22) eine gute antiinflammatorische Potenz zeigten, wurde zusätzlich eine Substanz synthetisiert, die beide wirkungsverstärkenden Substituenten vereint. Hierbei handelt es sich um 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D24). Die Rationale für diese Testsubstanz bestand darin, durch die Kombination zweier Substituenten an beiden Phenylringen, die sich in der Testung bereits als potent erwiesen hatten, die biologische Aktivität weiter zu steigern. Die Ergebnisse der pharmakologischen Testungen bestätigten diesen wirkungsverstärkenden Effekt.

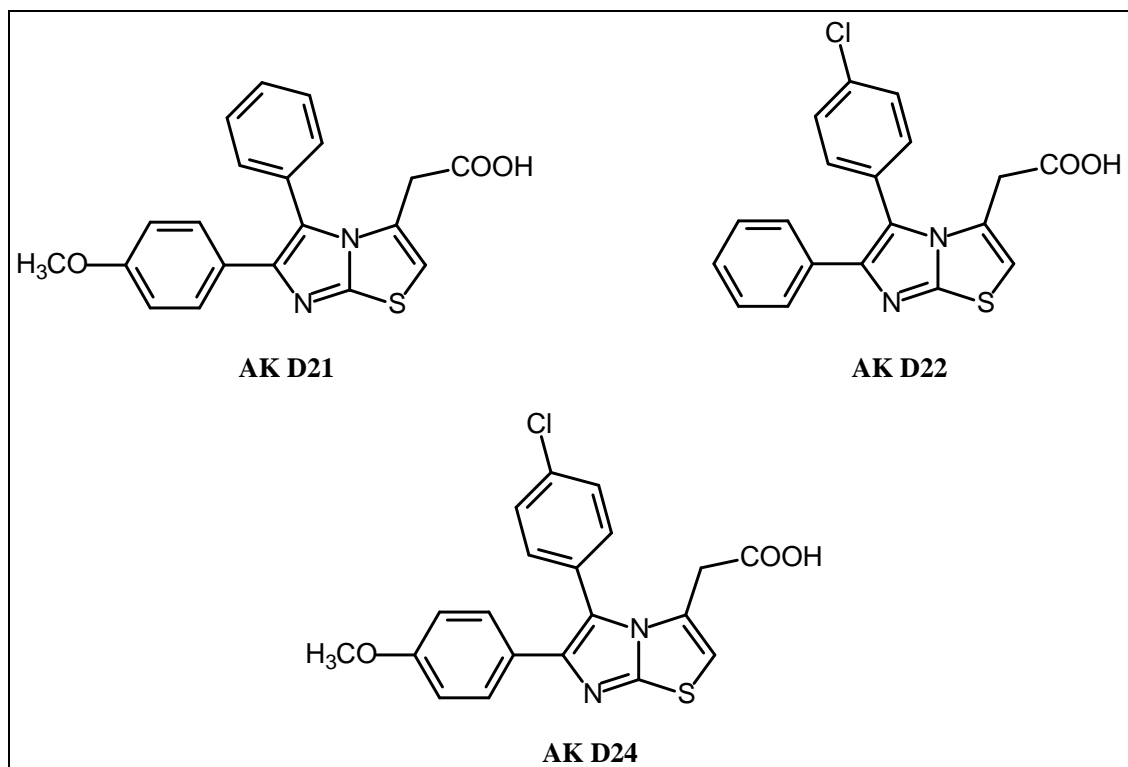


Abbildung 25: 2-(6-(4-Methoxyphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AKD21), 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AKD22) und 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D24)

3.2.5 Synthesen

3.2.5.1 Syntheseentwicklung

In diesem Kapitel wird zunächst ein Überblick über die Darstellung der Leitstruktur AK D19 gegeben. Auf die Synthesen der weiteren Testsubstanzen, die Variationen der Leitstruktur darstellen, wird anschließend näher eingegangen. In Abbildung 26 ist die vollständige Synthese der Leitstruktur AK D19 zu sehen.

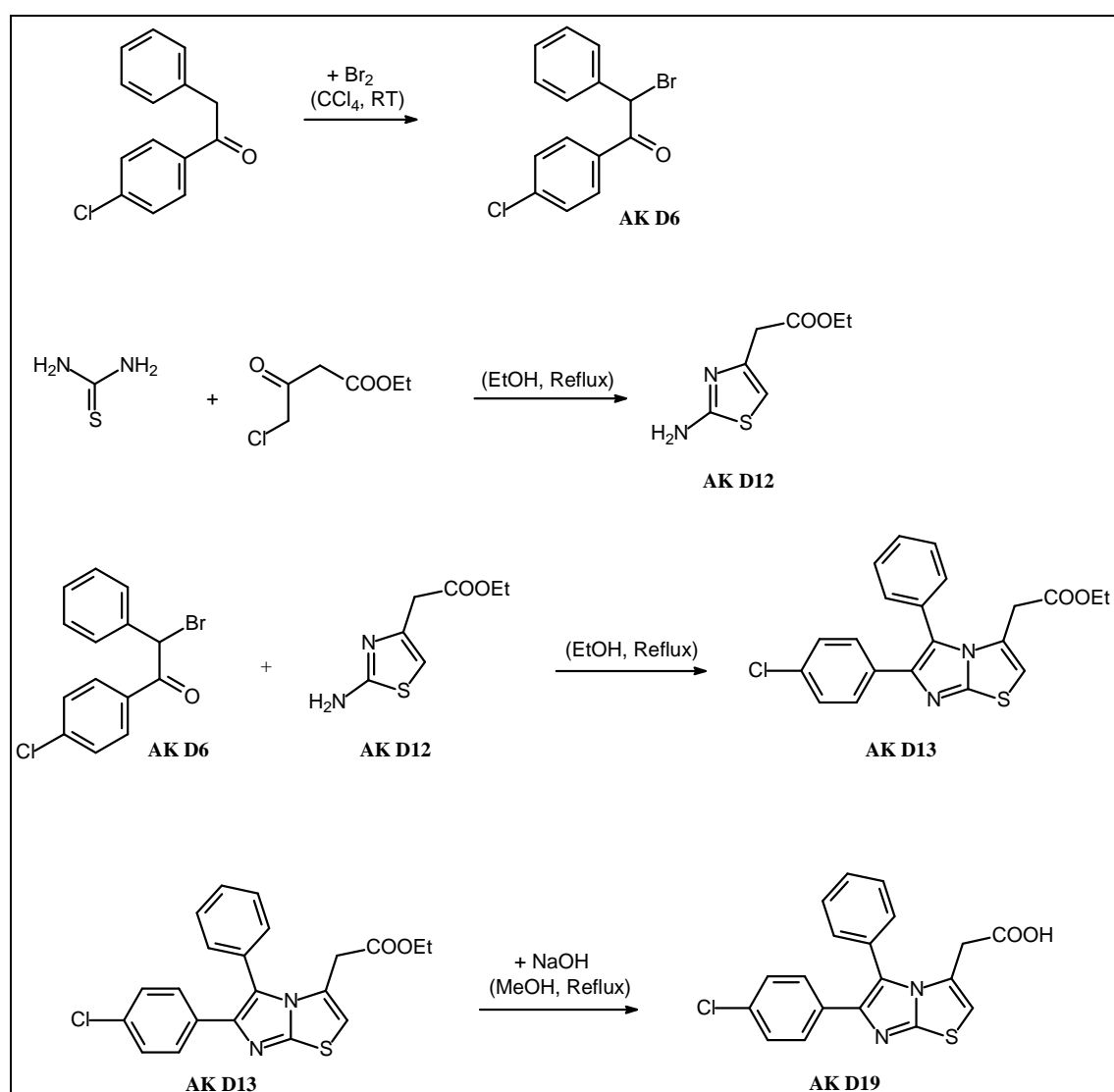


Abbildung 26: Überblick über die Synthese der Leitstruktur AK D19

In der ersten Stufe wird 1-(4-Chlorphenyl)-2-phenylethanon in α -Stellung zur Carbonylgruppe bromiert. Die zweite Stufe dient dem Aufbau des Thiazolgerüsts, als Edukte werden Thioharnstoff und 4-Chloracetessigsäureethylester eingesetzt. Die

Produkte der ersten beiden Stufen, (*R,S*)-2-Brom-1-(4-chlorphenyl)-2-phenylethanon (AK D6) und 2-(2-Aminothiazol-4-yl)essigsäureethylesters (AK D12), werden in einem konvergenten Syntheseschritt in der dritten Stufe zu 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäureethylester (AK D13) cyclisiert und unter Bildung des Endprodukts 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D19) hydrolysiert.

Stufe 1: Bromierung eines substituierten Phenylacetophenons in α -Position

1-(4-Chlorphenyl)-2-phenylethanon wird in α -Stellung bromiert, die Reaktion ist in Abbildung 27 dargestellt. Das Edukt liegt aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie sowohl als Keton als auch in seiner Enolform vor. Bei Annäherung von Brom an die Doppelbindung kommt es zu einer Polarisierung des Brommoleküls, es bildet sich ein π -Komplex. Nach Addition eines der Bromatome entsteht ein Oxonium-Ion, dessen Deprotonierung zum racemischen Produkt AK D6 führt. Die Reaktion findet in Tetrachlorkohlenstoff bei Raumtemperatur statt; die Zugabe eines Katalysators ist nicht notwendig. Es liegt eine Form von Autokatalyse vor, da sich im Verlauf der Reaktion Bromwasserstoff bildet und ein saures Milieu die Enolisierung begünstigt [139].

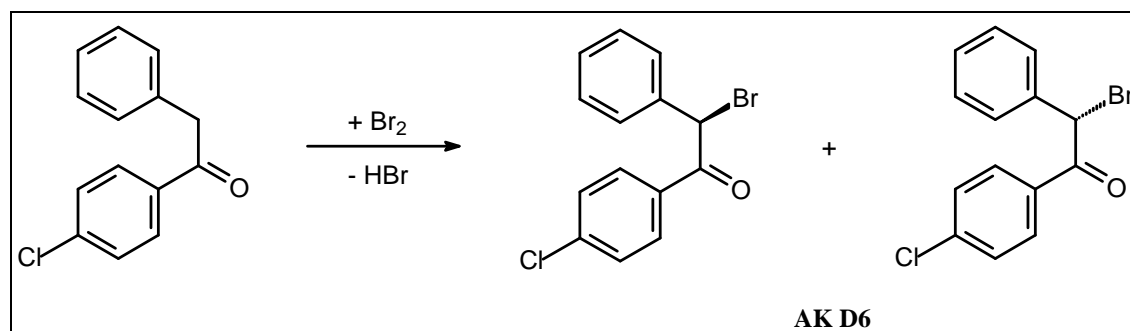


Abbildung 27: Mechanismus der Bromierung von 1-(4-Chlorphenyl)-2-phenylethanon

Der Verlauf der Reaktion lässt sich optisch nachverfolgen. Brom wird so langsam zugegeben, dass es aufgrund der erfolgenden Bromierung immer wieder zu einer Entfärbung der Lösung kommt. Als Nebenprodukt entsteht die in α -Position zweifach bromierte Verbindung. Während dünnschichtchromatographisch aufgrund gleicher R_f -Werte nicht zwischen Edukt und Produkt differenziert werden kann, gelingt die eindeutige Strukturaufklärung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

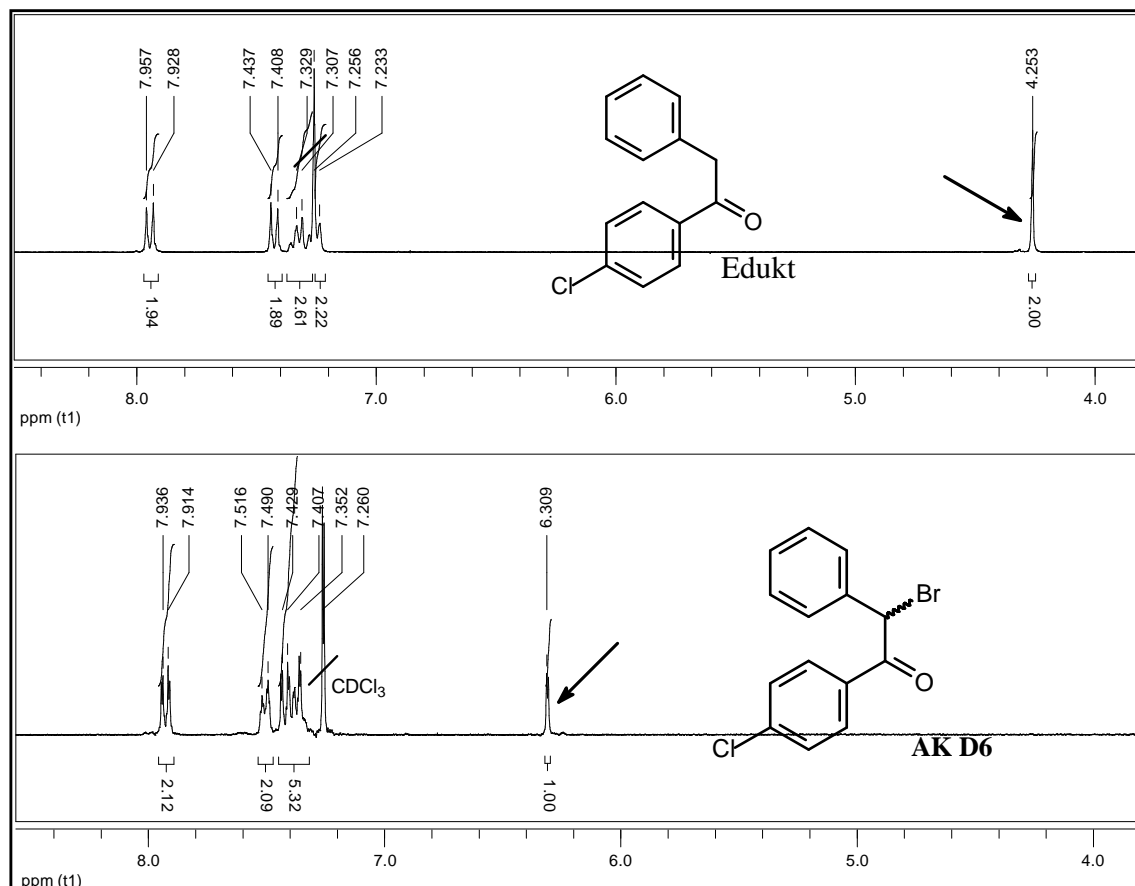


Abbildung 28: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des nicht-bromierten Edukts 4-Chlor-2-phenylacetophenon und (*R,S*)-2-Brom-1-(4-chlorphenyl)-2-phenylethanon (AK D6) (jeweils in CDCl_3)

Die beiden Protonen der Methylen-Gruppe des Edukts 1-(4-Chlorphenyl)-2-phenylethanon sind im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei 4.25 ppm zu finden. Nach Bromierung des Moleküls ist das Signal des aliphatischen Protons stark tieffeldverschoben bei 6.31 ppm. Die aromatischen Protonen liegen bei beiden Spektren in einem ähnlichen Bereich. Zwischen 7.23 und 7.43 ppm befinden sich die fünf Protonen des monosubstituierten Phenylrings. Die vier Protonen des *p*-substituierten Phenylrings sind als zwei pseudo-Dubletts bei 7.53 und 7.92 ppm (siehe Spektrum AK D6) aufgespalten, die Kopplungskonstante für die *o*-Kopplung beträgt 8.6 Hz.

Stufe 2: Aufbau des Thiazolrings

Eine Möglichkeit zur Darstellung von Thiazol-Derivaten besteht in der Cyclokondensation von α -Halogenketonen mit Thioamiden nach Hantzsch. Im Rahmen dieser Arbeit wurden als Edukte Thioharnstoff und 4-Chloracetessigsäureethylester zur Darstellung des Hetarens AK D12 eingesetzt. Bei der Reaktion findet eine nucleophile Substitution statt, hierbei dient Schwefel als Nucleophil und Chlorid als Abgangsgruppe. Da es sich bei Alkylhalogeniden um weiche Elektrophile handelt, werden diese bevorzugt von großen, ungeladenen Nucleophilen angegriffen. Des Weiteren greift eine der beiden Aminogruppen des Thioharnstoffs nucleophil an der Carbonylverbindung an und es entsteht ein Imin. Carbonylgruppen sind, bezogen auf das Sauerstoffatom, harte Nucleophile, sie reagieren bevorzugt mit basischen Nucleophilen wie Aminogruppen [139]. In Abbildung 29 ist der Verlauf der Reaktion zusammengefasst dargestellt.

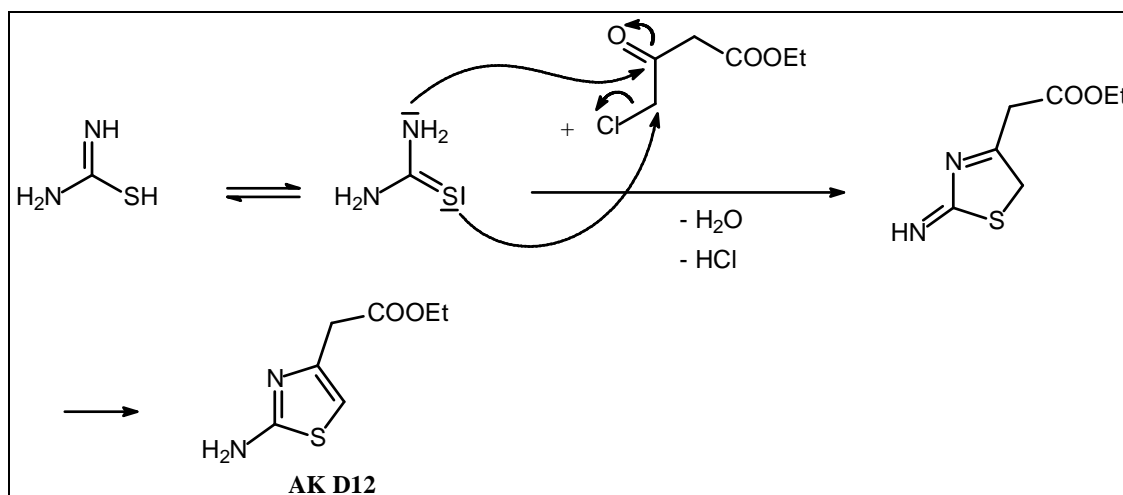


Abbildung 29: Synthese von 2-(2-Aminothiazol-4-yl)essigsäureethylester (AK D12)

Stufe 3: Aufbau des Imidazo[2,1-*b*]thiazol-Gerüsts

Die Darstellung eines Imidazo[2,1-*b*]thiazol-Grundkörpers ist vielfach in der Literatur beschrieben und geht meist von 2-Aminothiazol- und 2-Bromacetophenon-Derivaten aus, wobei die Reaktionsbedingungen variieren. Es können verschiedene Lösungsmittel eingesetzt werden und die Reaktion kann bei verschiedenen Temperaturen und mit unterschiedlichen Reaktionszeiten stattfinden. Die Kopplung der beiden Komponenten zum anellierten Heterocyclus verläuft ohne Katalysator [140, 141, 142, 143, 144, 145].

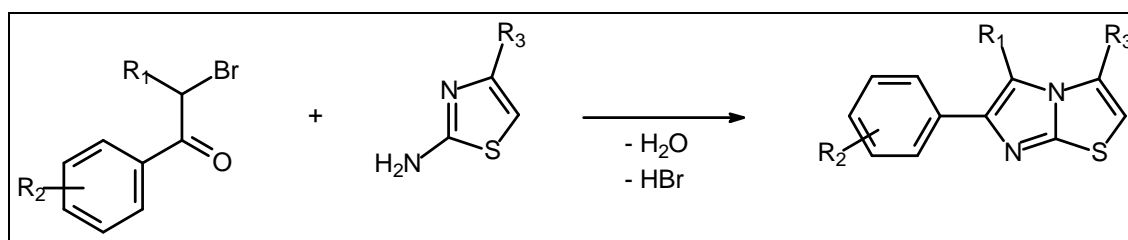


Abbildung 30: Allgemeines Syntheschema zur Darstellung des Imidazo[2,1-*b*]thiazol-Grundkörpers
R₁, R₂ und R₃: Aromaten, Aliphaten, funktionelle Gruppen

Es ist anzunehmen, dass die Kopplungsreaktion nach dem in Abbildung 31 aufgeführten Mechanismus verläuft [146, 147]. Zu Beginn kommt es zu einer nucleophilen Substitution am α -Kohlenstoffatom, wobei der heterocyclische Thiazol-Stickstoff als Nucleophil angreift und Bromid als Abgangsgruppe dient (1). Nach Abspaltung von Bromwasserstoff entsteht intermediär ein Imin (2), das anschließend nucleophil am positiv polarisierten Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe angreift. Das resultierende instabile Halbaminale (3) geht unter Dehydratisierung in ein aromatisches System und damit das Endprodukt über.

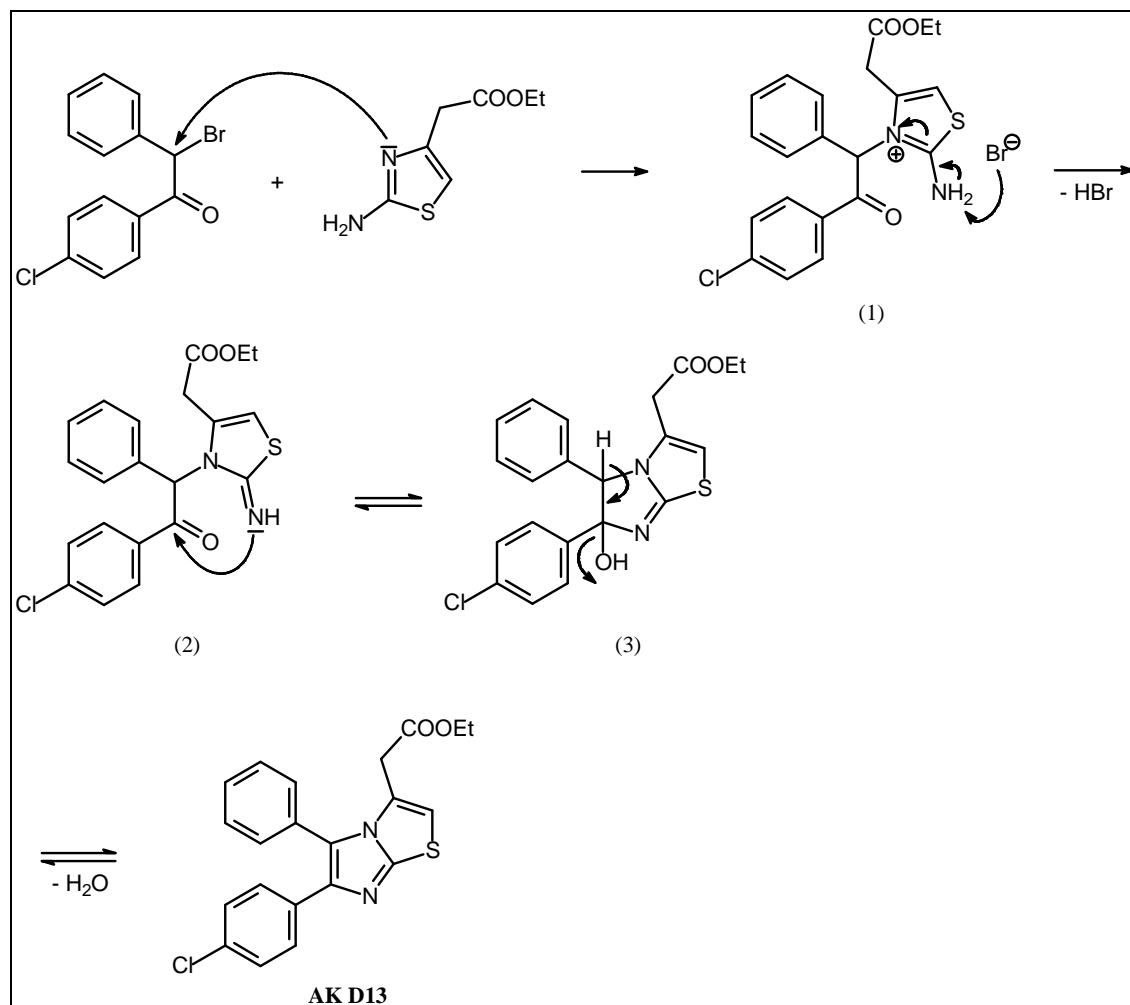


Abbildung 31: Synthese des 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäureethyl-esters (AK D13)

Neben der Entstehung des Produkts AK D13 wäre theoretisch auch das Auftreten eines Regioisomers denkbar, bei dem sich der Chlorphenylrest an Position 5 und der unsubstituierte Phenylring an Position 6 befindet. Im oben gezeigten Reaktionsverlauf kommt es zu einer nucleophilen Substitution am α -Kohlenstoffatom mit dem cyclischen Stickstoffatom (*endo*-N) als Nucleophil. Vorstellbar wäre auch eine nucleophile Substitution, bei der das primäre Amin (*exo*-N) als Nucleophil fungiert. Meakins et al. [147] führten Untersuchungen zur Kopplung von 2-Aminothiazolen mit α -Bromketonen durch und konnten das ausschließliche Vorliegen des oben gezeigten Regioisomers bestätigen. Sie gingen hierbei vom Imin-Zwischenprodukt aus, das sie isolierten und anschließend durch Acylierung in ein Amid überführten. Vergleicht man die Carbonylbanden der beiden Amide im IR-Spektrum werden charakteristische Unterschiede deutlich. Die Carbonylbanden des *exo*-N-Amids liegen um ca. 55 cm^{-1} höher als die des *endo*-N-Amids [148].

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 32) kann die Identität des Produkts bestätigt werden. Bei 0.98 ppm befindet sich das Triplett der Methylgruppe. Bei 3.56 ppm und 3.70 ppm sind das Singulett der heterocyclische gebundenen CH_2 - sowie das Quartett der OCH_2 -Gruppe zu sehen. Das Signal des Protons des Thiazolrings liegt bei 7.09 ppm. Im Bereich von 7.24 – 7.51 ppm befinden sich die neun Protonen der beiden Aromaten.

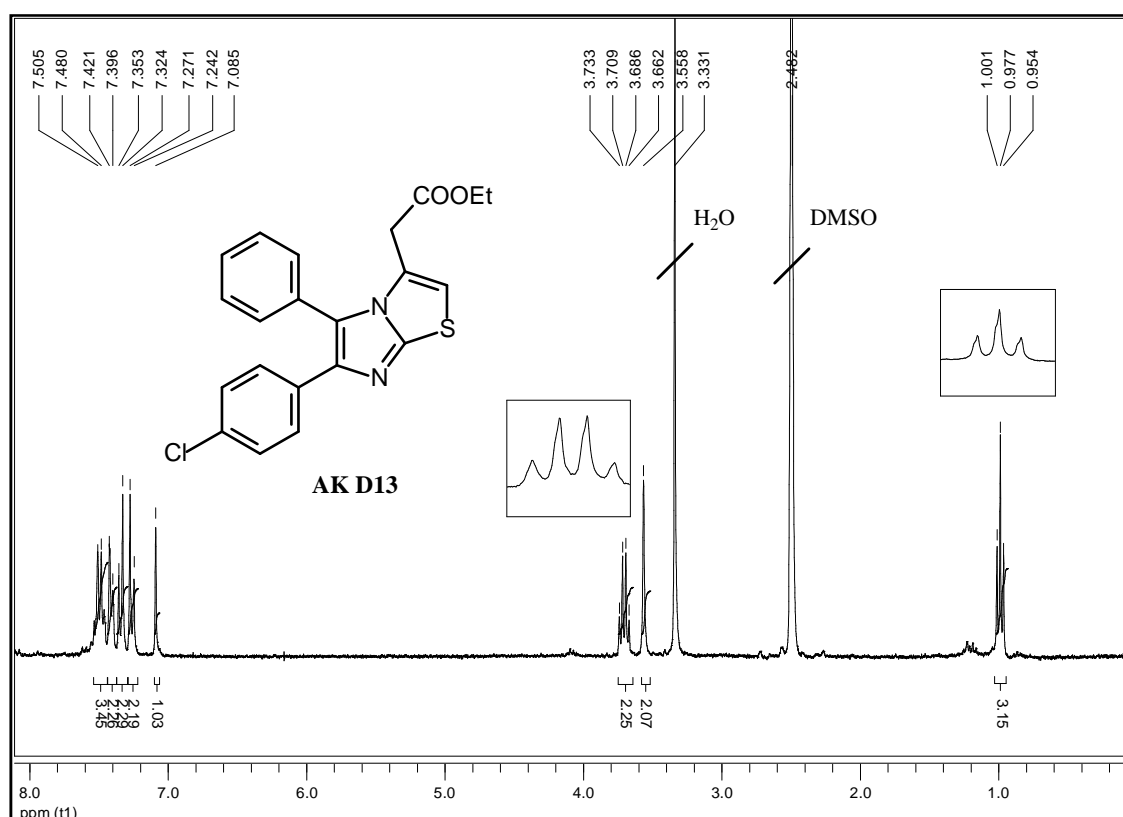


Abbildung 32: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäureethylester (AK D13) in DMSO-d_6

Die Umsetzung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Edukte war unvollständig und es entstand neben dem gewünschten 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäureethylester (AK D13) ein weiteres Produkt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden die Reaktionsbedingungen variiert. Schrittweise wurden das Lösungsmittel, die Reaktionszeit sowie die Reaktionstemperatur verändert. Als Lösungsmittel wurden Aceton, Ethanol, Butanol, Dichlormethan und 1,2-Dichlorethan eingesetzt. Die Reaktion wurde sowohl bei Raumtemperatur als auch unter Rückfluss durchgeführt. Die Reaktionszeiten wurden zwischen 6 Stunden und einer Woche variiert. Es erfolgte eine Zugabe von Triethylamin als Katalysator. Als am besten geeignete Methode stellte sich die Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel und ein Refluxieren der Edukte für etwa 30 h heraus.

In der Literatur sind für vergleichbare Reaktionen Ausbeuten von ca. 60% zu finden [141, 142, 143, 144, 145]. Es stellt sich die Frage, warum die Synthese von AK D13 mit einer Ausbeute von nur 7% verläuft. Eine sterische Hinderung des Reaktionsablaufs könnte die Ursache sein. Im Additionsschritt entsteht aus der ebenen, trigonalen Carbonylverbindung ein tetraedrisches Addukt ((3) in Abbildung 31), in dem die Substituenten näher zusammenrücken. Die Addition verläuft daher zunehmend schwerer, je voluminöser die Reste sind. In Abbildung 30 ist das allgemeine Syntheschema zur Darstellung von Imidazo[2,1-*b*]thiazolen aufgeführt. Als Rest R₁ befindet sich bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Edukten ein Phenylring in α -Position zur Carbonylgruppe. Bei vergleichbaren Reaktionen der Literatur handelt es sich bei R₁ meist um Methyl- oder kurze Alkylgruppen. Die sterische Hinderung durch den Phenylring ist somit deutlich größer und könnte der Grund für die geringe Ausbeute sein.

Wie bereits erwähnt, entsteht bei der Reaktion ein Nebenprodukt. Nach Isolation und Aufreinigung stellte sich heraus, dass es sich hierbei um das Imin (2) aus Abbildung 31 handelt. Dies konnte unter anderem mit Hilfe der ¹³C-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

Das Spektrum in Abbildung 33 wurde mit dem J-modulierten Spin-Echo-Verfahren aufgenommen. Somit zeigen die Signale aller sekundären und quartären Kohlenstoff-Atome nach oben und alle primären und tertiären Kohlenstoff-Signale nach unten. Die Signale der Kohlenstoff-Atome der beiden Carbonylverbindungen befinden sich bei 166.9 und 195.6 ppm, die der aliphatischen Gruppen sind im hohen Feld bei 14.3 (CH₃), 37.4 (CH₂) und 60.9 ppm (OCH₂) zu finden. Bei 63.7 ppm liegt das Signal des tertiären Kohlenstoff-Atoms, das sich α -ständig zur Carbonylgruppe befindet. Die drei Kohlenstoff-Atome des Thiazolrings erscheinen bei 104.2 (tertiär), 144.8 (quartär) und 170.5 ppm (quartär). Bei 134.5 und 136.6 ppm befinden sich die beiden quartären Kohlenstoff-Atome der Phenylringe. Die restlichen zehn aromatischen Protonen liegen zwischen 128.6 und 133.8 ppm.

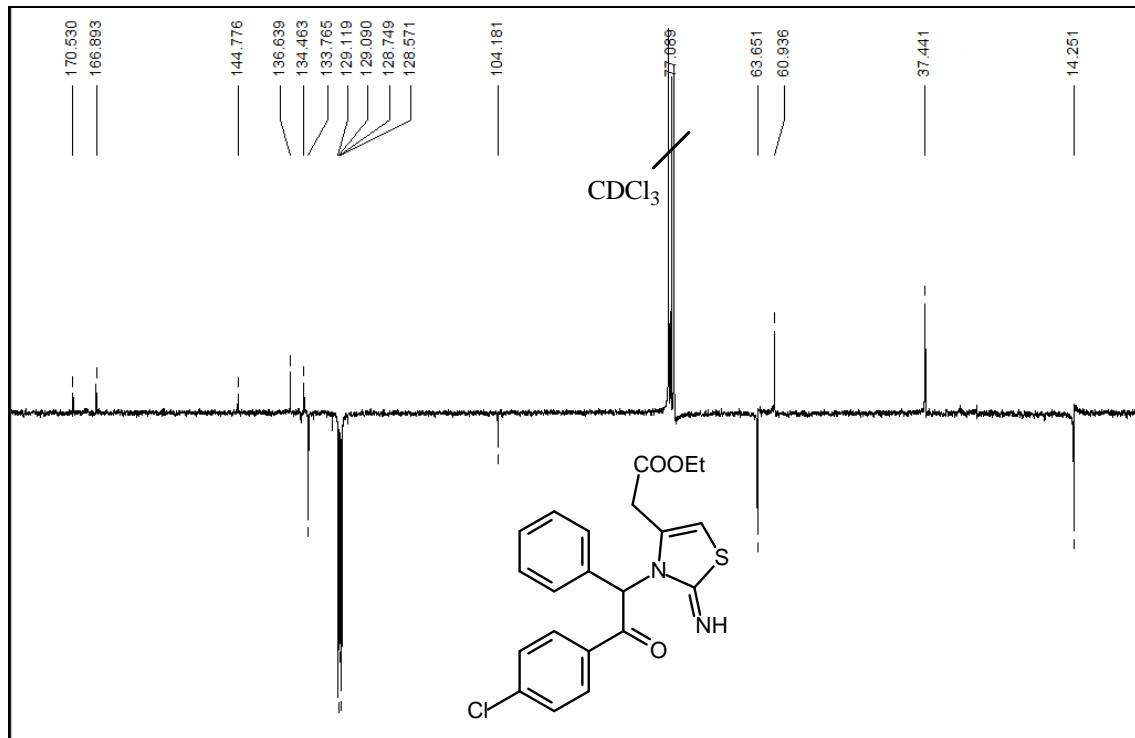


Abbildung 33: ^{13}C -NMR-Spektrum (Spin-Echo-Verfahren) des Nebenprodukts 2-(3-(2-(4-Chlorphenyl)-2-oxo-1-phenylethyl)-2-imino-2,3-dihydro-thiazol-4-yl)essigsäureethylester in CDCl_3

Stufe 4: Esterhydrolyse

Als letzter Schritt wird der Ethylester hydrolysiert, so dass als Endsubstanz die freie Säure vorliegt. Die Reaktion läuft unter basischer Katalyse ab. Auch eine saure Hydrolyse wäre möglich, diese verläuft jedoch langsamer und mit schlechteren Ausbeuten, da es sich hierbei um eine Gleichgewichtsreaktion handelt. Bei der Reaktion bildet sich zunächst ein tetraedrisches Zwischenprodukt. Nach Abspaltung von Ethanol erhält man ein Carboxylat. Da dieser Schritt irreversibel ist, ist das Gleichgewicht im basischen Milieu zugunsten der Hydrolyse gegenüber der Veresterungs-Rückreaktion verschoben. Anschließend wird das Carboxylat durch Ansäuern des Reaktionsansatzes in die freie Säure überführt (siehe Abbildung 34) [149].

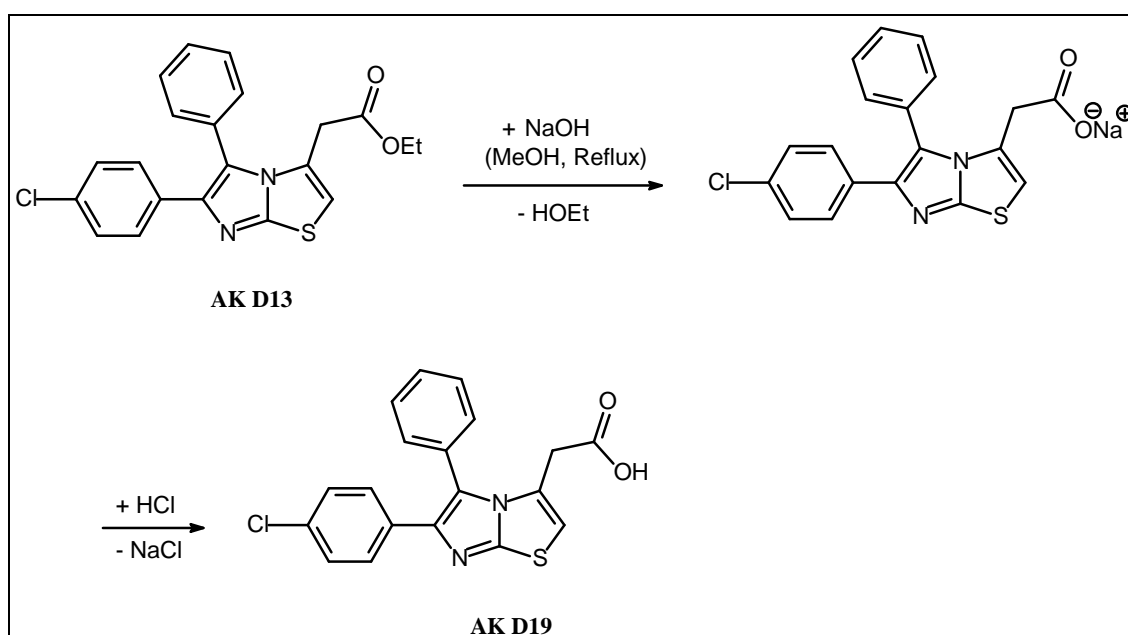


Abbildung 34: Basische Esterhydrolyse zur Darstellung der 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D19)

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 35) erkennt man den erfolgreichen Verlauf der Reaktion am Fehlen der Esterprotonen. Bei 3.42 ppm befindet sich das Signal der verbleibenden CH_2 -Gruppe. Das Proton des Thiazolrings ist bei 7.07 ppm zu finden. Die vier Protonen des *p*-substituierten Phenylrings liegen bei 7.27 und 7.36 ppm, die Kopplungskonstante beträgt 8.7 Hz. Die Signale der fünf Protonen des zweiten Phenylrings sind als Multipllett zwischen 7.42 und 7.54 ppm zu sehen.

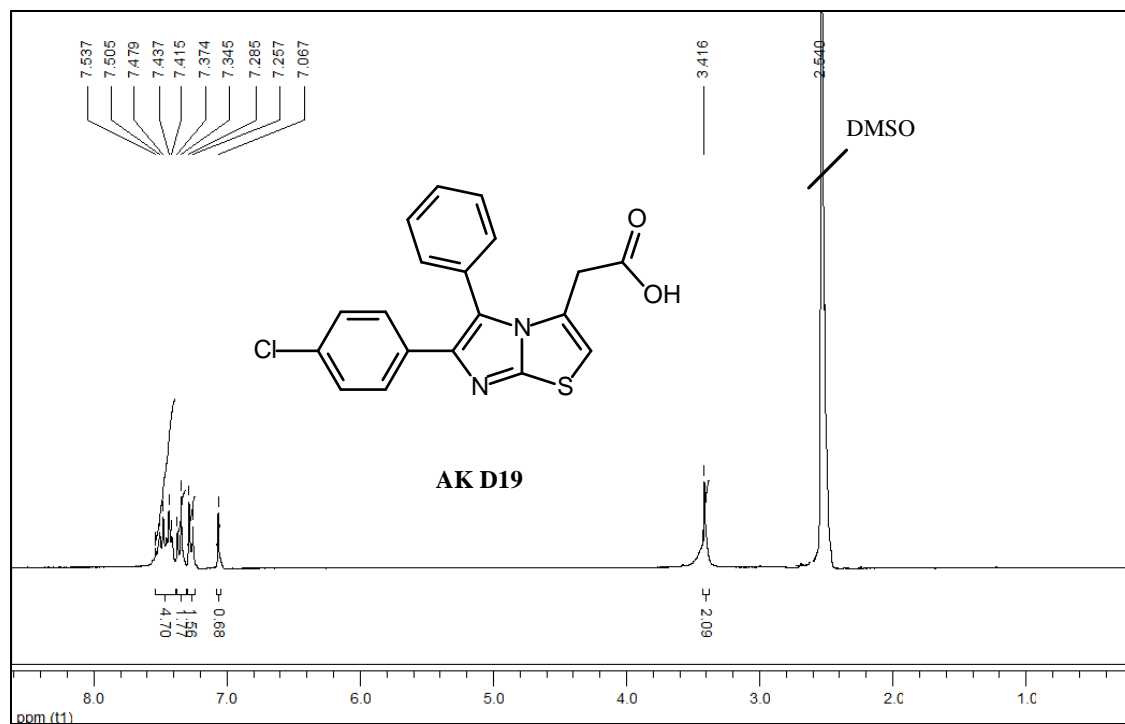


Abbildung 35: ¹H-NMR-Spektrum der 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D19) in DMSO-d₆

3.2.5.2 Überblick Testsubstanzen

Folgende Testsubstanzen wurden, ausgehend von der Leitstruktur AK D19, unter Einbeziehung des Toppliss Decision Trees dargestellt:

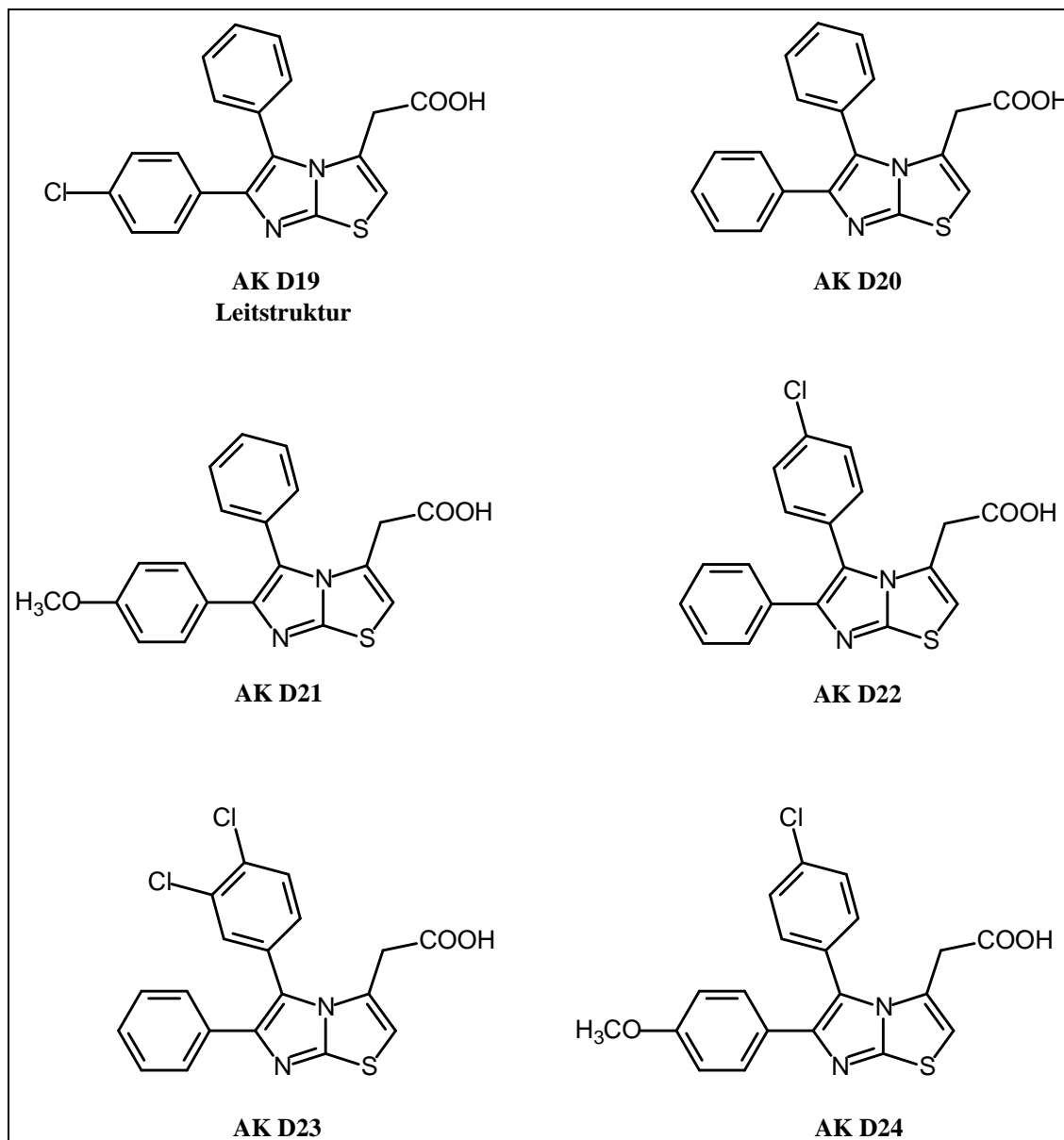


Abbildung 36: Überblick über die Substanzreihe der Imidazothiazole

3.2.5.3 Syntheseüberblick

In Kapitel 3.2.5.1 ist die vollständige, vierstufige Synthese der Leitstruktur AK D19 beschrieben (siehe Abbildung 26). Die Synthesen der weiteren Testsubstanzen verlaufen analog. In der ersten Stufe wird ein substituiertes Acetophenon in α -Stellung zur Carbonylgruppe bromiert. Die zweite Stufe dient dem Aufbau des Thiazolgerüsts, als Edukte werden Thioharnstoff und 4-Chloracetessigsäureethylester eingesetzt. Die Produkte der ersten beiden Stufen werden miteinander in der dritten Stufe zu einem substituierten Imidazo[2,1-*b*]thiazol-Gerüst verknüpft. Zuletzt wird Essigsäureethylester unter Verwendung von Natronlauge hydrolysiert und das Endprodukt nach Ansäuern erhalten.

Als Edukte für die erste Stufe werden unterschiedlich substituierte Phenylacetophenone eingesetzt. Nur 4-Chlor-2-phenylacetophenon (zur Darstellung von AK D19) und 2-Phenylacetophenon (zur Darstellung von AK D20) sind käuflich zu erwerben. Die restlichen substituierten Phenylacetophenone wurden synthetisiert. Die Darstellung erfolgte über Friedel-Crafts-Acylierungen.

3.2.5.4 Synthese der Vorstufen

Friedel-Crafts-Acylierung

Die Friedel-Crafts-Acylierung ist die wichtigste Methode zur Darstellung aromatischer Ketone und verläuft nach dem Mechanismus einer elektrophilen aromatischen Substitution. Es lassen sich nur Aromaten umsetzen, die Substituenten erster Ordnung enthalten, da diese die Basizität des Kerns erhöhen. Als Elektrophile dienen Carbonylverbindungen, meistens werden - aufgrund ihrer hohen Carbonylreaktivität - Carbonsäurehalogenide eingesetzt. Da deren Elektrophilie relativ gering ist, muss die Reaktion durch den Einsatz einer Lewis-Säure wie z.B. Aluminiumchlorid katalysiert werden [150].

Bei Carbonsäurechloriden ist der Angriff des Katalysators sowohl am Sauerstoff- als auch am Chlor-Atom möglich. Durch die Wechselwirkung des ambidenten Säurechlorids mit dem Friedel-Crafts-Katalysator bilden sich folgende elektrophile Agentien [139]:

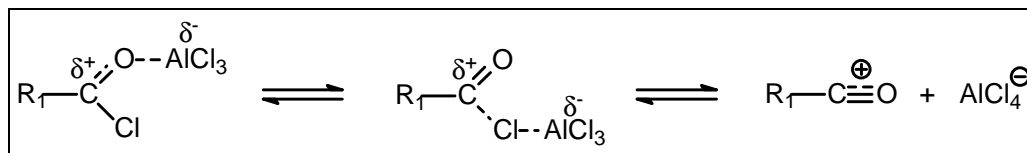


Abbildung 37: Elektrophile Agentien bei der Friedel-Crafts-Acylierung [149]

Da diese als Zwischenprodukte auftretenden Donor-Akzeptor-Komplexe voluminös sind, erhält man bei Friedel-Crafts-Acylierungen einfach substituierter Aromaten ausschließlich eine *p*-Substitution. Durch diese hohe Regioselektivität kann die *o*-Position nur begünstigt werden, wenn das Elektrophil mit dem Substituenten in Wechselwirkung treten kann [149].

In Abbildung 38 ist die Reaktion dargestellt. Das Acylium-Ion reagiert als Elektrophil mit dem Aromaten. Es bildet sich zunächst ein π -Komplex aus, der unter Dearomatisierung in einen σ -Komplex übergeht. Anschließend wird ein Proton des Aromaten abgespalten und es kommt zu einer Rearomatisierung. Es entsteht ein Arylketon, das durch die Lewis-Säure komplexiert wird.

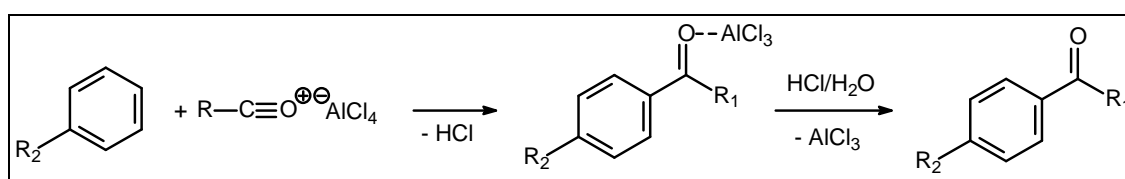


Abbildung 38: Verlauf der Friedel-Crafts-Acylierung [149]

Aluminiumtrichlorid bildet nicht nur mit dem Acylierungsmittel, sondern auch mit dem entstehenden aromatischen Keton einen Komplex, der unter normalen Reaktionsbedingungen stabil ist. Deshalb benötigt man stöchiometrische Mengen des Katalysators. Der Arylketon/Lewis-Säure-Komplex muss nach Ablauf der Reaktion unter Verwendung von Eiswasser und Salzsäure hydrolytisch gespalten werden. Da die Friedel-Crafts-Acylierung auch im industriellen Maßstab genutzt wird und die Verwendung stöchiometrischer statt katalytischer Katalysator-Mengen höhere Kosten verursacht und einen größeren Aufwand bei der Produkt-Isolierung bedeutet, wurden zu Beginn des Jahrtausends die ersten katalytischen Friedel-Crafts-Acylierungen beschrieben. Trifluormethansulfonate seltener Erden wie z.B. Scandium(III)triflat ermöglichen dies. Der Unterschied zu den gebräuchlichen Lewis-Säuren besteht darin, dass der gebildete Komplex mit dem entstehenden Keton instabil ist [150].

Eine Mehrfachsubstitution ist bei der Acylierung nicht zu befürchten. Aromaten mit stark desaktivierenden Substituenten wie Carbonylverbindungen sind nicht basisch genug, um in einer elektrophilen Substitutionsreaktion zu reagieren. Es kann jedoch zu Decarbonylierungen kommen, wenn sich durch Kohlenmonoxid-Abspaltung ein stabiles Carbeniumion bildet. Als Reaktionsprodukt entsteht ein alkylierter Aromat [151].

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Friedel-Crafts-Acylierungen führten ausschließlich zu den *p*-substituierten Produkten. Der Nachweis wird am Beispiel von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylethanon (AK D2) mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie erbracht. Zur Darstellung des Produkts wurden Anisol und Phenyllessigsäurechlorid als Edukte eingesetzt. Man erhält für den zweifach substituierten Aromaten das für eine *p*-Substitution typische AA'-BB'-Aufspaltungsmuster. Die Kopplungskonstante für die *o*-Kopplung beträgt 8.9 Hz. Die fünf Protonen des zweiten Phenylrings liegen als Multipllett zwischen 7.26 - 7.32 ppm. Die drei Protonen der Methoxygruppe finden sich bei 3.86 ppm. Das Signal der Methylengruppe ist bei 4.23 ppm zu sehen.

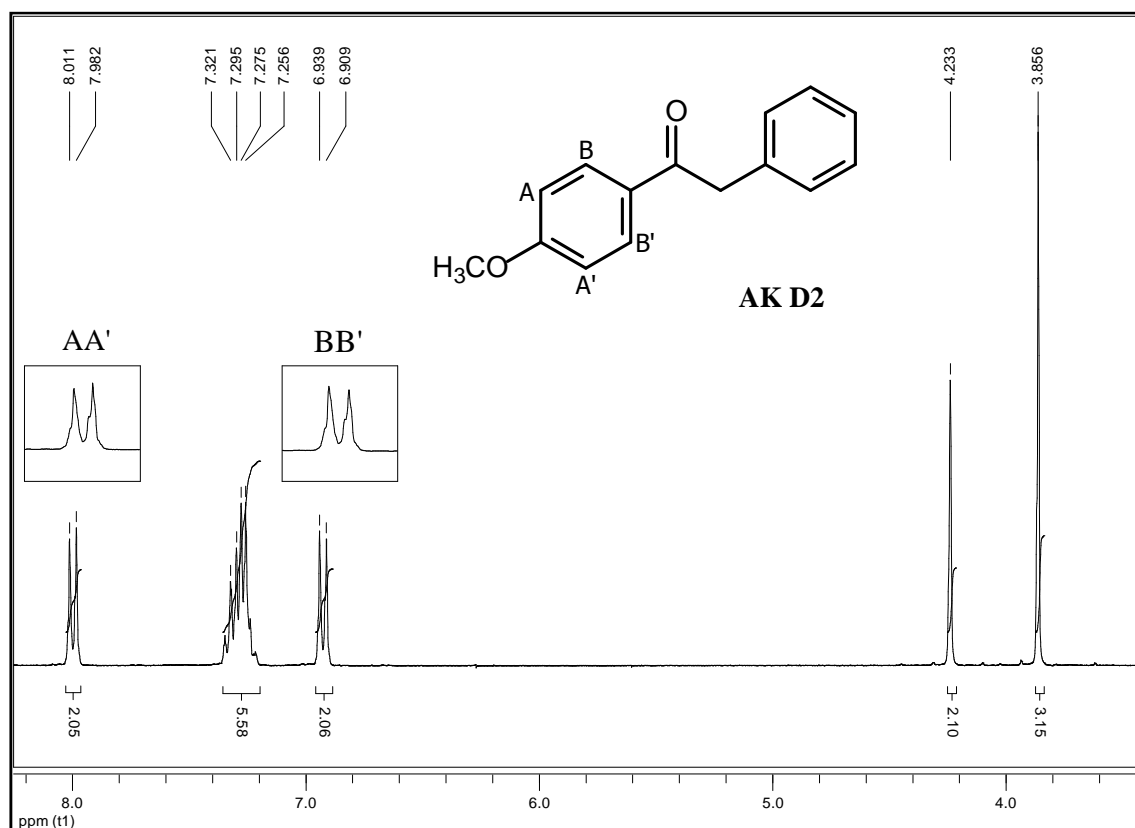


Abbildung 39: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 1-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylethanons (AK D2) in DMSO-d_6

Folgende substituierte Phenylacetophenone wurden über eine Friedel-Crafts-Acylierung dargestellt:

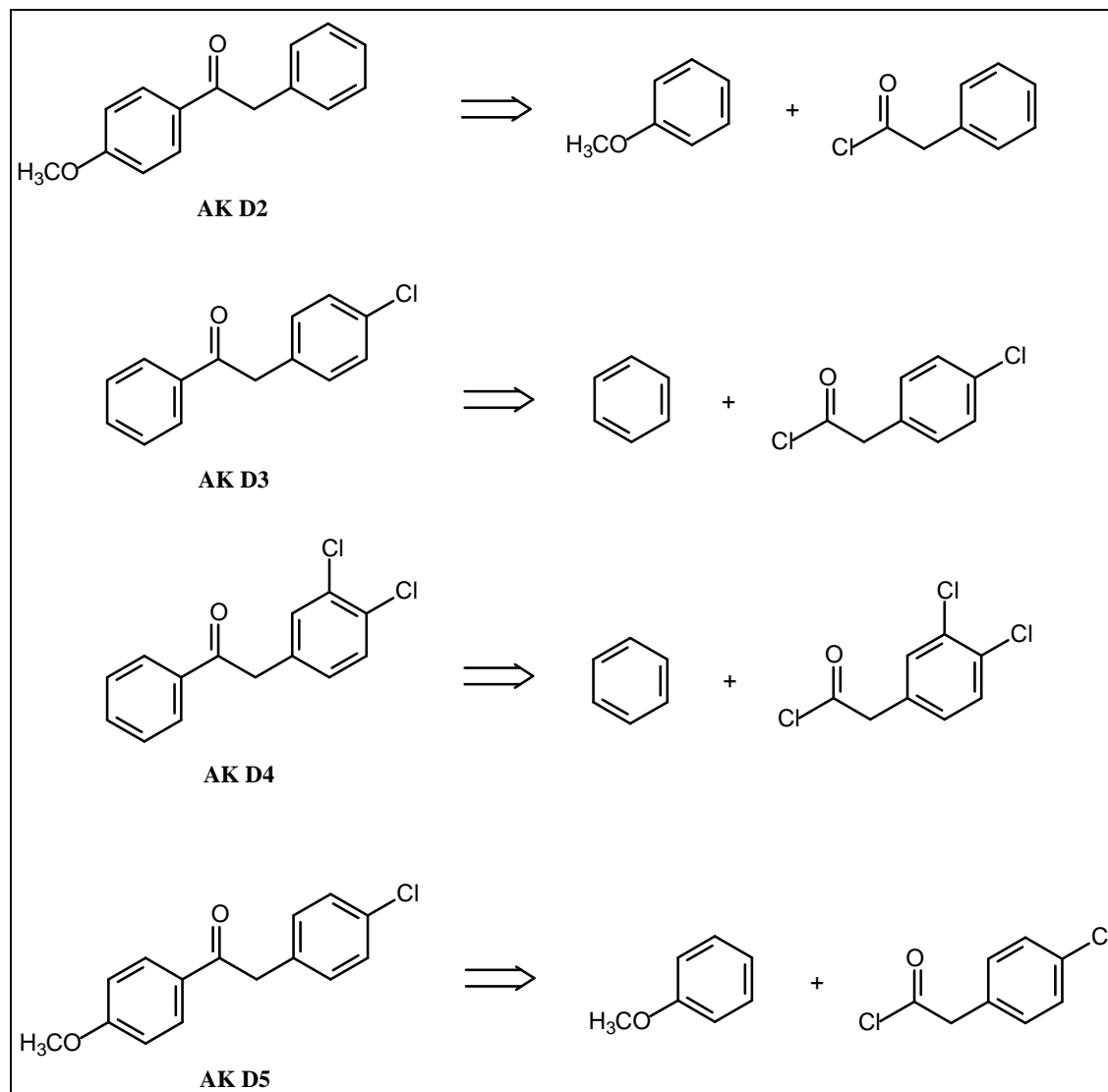


Abbildung 40: Retrospektive Darstellung von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylethanon (AK D2), 2-(4-Chlorphenyl)-1-phenylethanon (AK D3), 1-(3,4-Dichlorphenyl)-2-phenylethanon (AK D4) und 2-(4-Chlorphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)ethanon (AK D5) über Friedel-Crafts-Acylierungen

Alle Phenylessigsäurechloride, die als Ausgangsprodukte für die in Abbildung 40 aufgelisteten Friedel-Crafts-Acylierungen benötigt wurden, sind - bis auf 3,4-Dichlorbenzoylchlorid (zur Synthese von AK D4) - käuflich zu erwerben. Für die Synthese von 3,4-Dichlorbenzoylchlorid wurde 3,4-Dichlorphenylessigsäure als Edukt eingesetzt.

Acylchloride aus Carbonsäuren

Die wichtigste und allgemeinste Darstellungsmethode für Acylchloride ist die Umsetzung von Carbonsäuren mit anorganischen Säurechloriden, wie Phosphortrichlorid, Phosphorpentachlorid oder Thionylchlorid. Thionylchlorid ist am wenigsten reaktiv und wird stets im Überschuss eingesetzt [149]. Zur Darstellung von 3,4-Dichlorbenzoylchlorid (AK D1) wurde 3,4-Dichlorphenylelessigsäure mit Thionylchlorid ohne Verwendung eines Lösungsmittels refluxiert, bis die Gasentwicklung beendet war. Anschließend wurde das überschüssige Thionylchlorid abdestilliert.

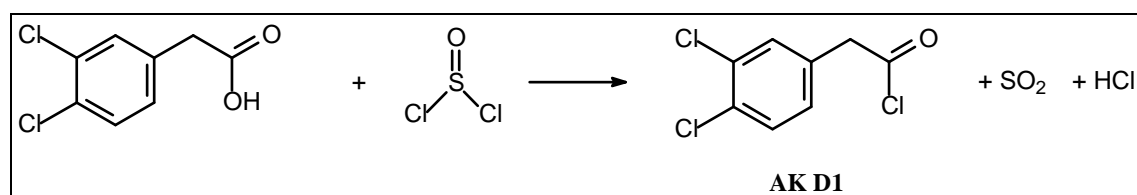


Abbildung 41: Synthese von 3,4-Benzoylchlorid (AK D1)

Der elektrophile Schwefel des Thionylchlorids wird vom Sauerstoffatom der Carbonsäure nucleophil angegriffen, unter Abspaltung von Chlorwasserstoff kommt es zur Bildung eines instabilen Intermediats. Dieses kann durch die entstandene Salzsäure protoniert und von dem schwachen Nucleophil Chlorid angegriffen werden. Das sich bildende tetraedrische Intermediat zerfällt anschließend in das Acylchlorid AK D1, Schwefeldioxid und Chlorwasserstoff [139].

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 42) ist deutlich zu erkennen, dass eine Umsetzung der Carbonsäure zum Carbonsäurechlorid stattgefunden hat. Im Spektrum des Edukts befindet sich bei 12.34 ppm das Proton der Säuregruppe. Im Falle des Säurechlorids ist dieses Signal verschwunden. Während das Signal der Methylengruppe im Spektrum des Edukts bei 3.63 ppm anzutreffen ist, sind diese beiden Protonen im Spektrum des Produkts nicht mehr gleichwertig und zeigen zwei Signale bei 3.61 und 3.96 ppm. Die Signale der drei aromatischen Protonen liegen in beiden Spektren als Multipllett zwischen 7.22 und 7.58 ppm.

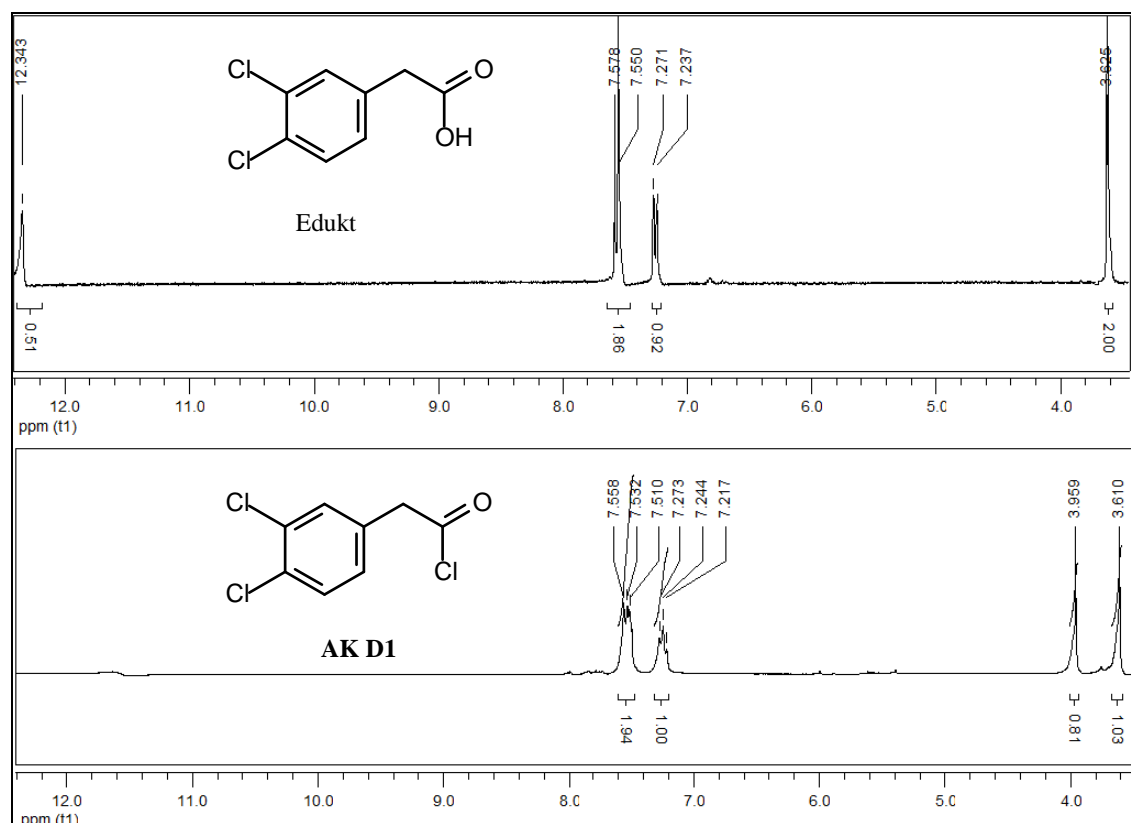


Abbildung 42: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 3,4-Dichlorphenylacrylsäure (Edukt) und 3,4-Dichlorbenzoylchlorid (AK D1) in DMSO- d_6

3.3 Chalcone

3.3.1 Einführung

Zu Beginn dieses Abschnitts werden das Codrug-Prinzip und die Entwicklung der Leitstruktur beschrieben. Nach einem kurzen Überblick über die Testsubstanzen folgen Erläuterungen zu den durchgeführten Synthesen. Auf die Konfiguration und Konformation der Enon-Teilstruktur wird am Ende des Kapitels eingegangen.

3.3.2 Das Codrug-Prinzip

Der Begriff Codrug beschreibt die Kopplung von zwei oder mehr Arznei- oder Wirkstoffen, die zur Behandlung derselben Erkrankung eingesetzt werden, zu einem Molekül. Die Komponenten sind über einen inerten Linker miteinander verknüpft. Im Gegensatz zu einem Prodrug sind alle Komponenten biologisch aktiv, das Ziel ist ein Synergismus der biologischen Aktivitäten. Weitere Vorteile liegen in der potentiellen Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften und dem möglichen spezifischeren Angriff am Target [152]. Codrugs werden unter anderem bei der Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen [153], HIV [154], Krebs [155] und in der Ophthalmologie [156] eingesetzt. Auch die Kombination zweier Analgetika zu einem Codrug ist bereits in der Literatur beschrieben [157]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Codrug-Prinzip bei der Entwicklung der Leitstruktur der Chalcon-Substanzklasse angewandt.

3.3.3 Entwicklung der Leitstruktur

Chalcone sind Moleküle mit 1,3-Diphenylpropenon-Partialstruktur, die vielfältige biologische Eigenschaften besitzen. Sie wirken unter anderem antiinflammatorisch, antimikrobiell, antiviral, cytotoxisch und chemoprotektiv [128]. Um die antiinflammatorische Wirksamkeit der Chalcone zu erhöhen, wurde bei der Entwicklung der Leitstruktur dieser Arbeit eine zweite, antiinflammatorisch aktive Substanz mit der Chalconstruktur zu einem Codrug verknüpft.

In Abbildung 43 ist die charakteristische Struktur eines Chalcons zu sehen. Bei den beiden Phenylringen unterscheidet man zwischen Ring A, der mit der Carbonylgruppe verknüpft ist, und Ring B, der sich in Nachbarschaft zur Doppelbindung befindetet. Die Verknüpfung mit einem weiteren Wirkstoff kann über Ring A oder Ring B erfolgen (R_1 bzw. R_2).

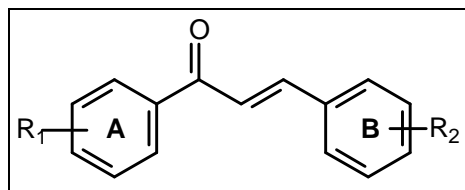


Abbildung 43: Struktur eines Chalcones

R₁, R₂: Aromaten, Aliphaten, funktionelle Gruppen

Bei der zweiten antiinflammatorisch wirksamen Substanz, mit der die Chalcone verknüpft wurden, handelt es sich um das Diarylmercaptoimidazol-Derivat 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiol (Z11). 4,5-Diaryl-2-mercaptoimidazol-Derivate sind sowohl in der Literatur als auch in vorangegangenen Arbeiten des Arbeitskreises als antiinflammatorisch aktive Strukturen beschrieben [119, 125, 158]. Als besonders wirksam gegen COX-1, COX-2 und 5-LOX zeigte sich 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiol. Strukturell ähnelt Z11 den COX-2-selektiven Coxiben wie zum Beispiel Celecoxib, das in Abbildung 44 aufgeführt ist. Beide Moleküle enthalten einen Heterocyclus mit vicinalen, *p*-substituierten Phenylringen.

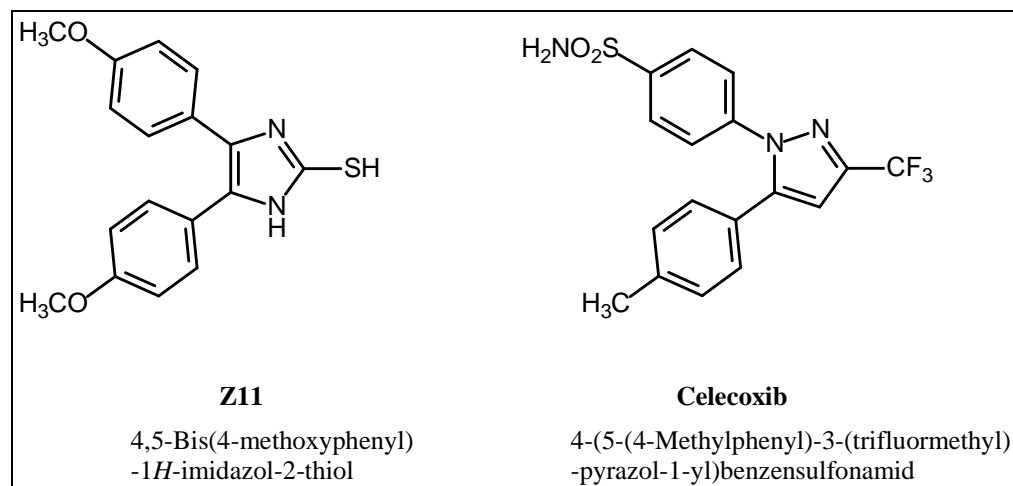


Abbildung 44: Strukturvergleich von Z11 mit Celecoxib

Die Verknüpfung der Chalconstruktur mit 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiol erfolgt zwischen einer Methylengruppe in *p*-Position an Ring A oder B des Chalcones und der Thiolfunktion des 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiols. Sind die Chalcone über Ring A verknüpft, werden diese Substanzen im Folgenden als Z11-A-Chalcone bezeichnet. Wenn die Moleküle über Ring B miteinander verknüpft sind, werden sie Z11-B-Chalcone genannt (siehe Abbildung 45).

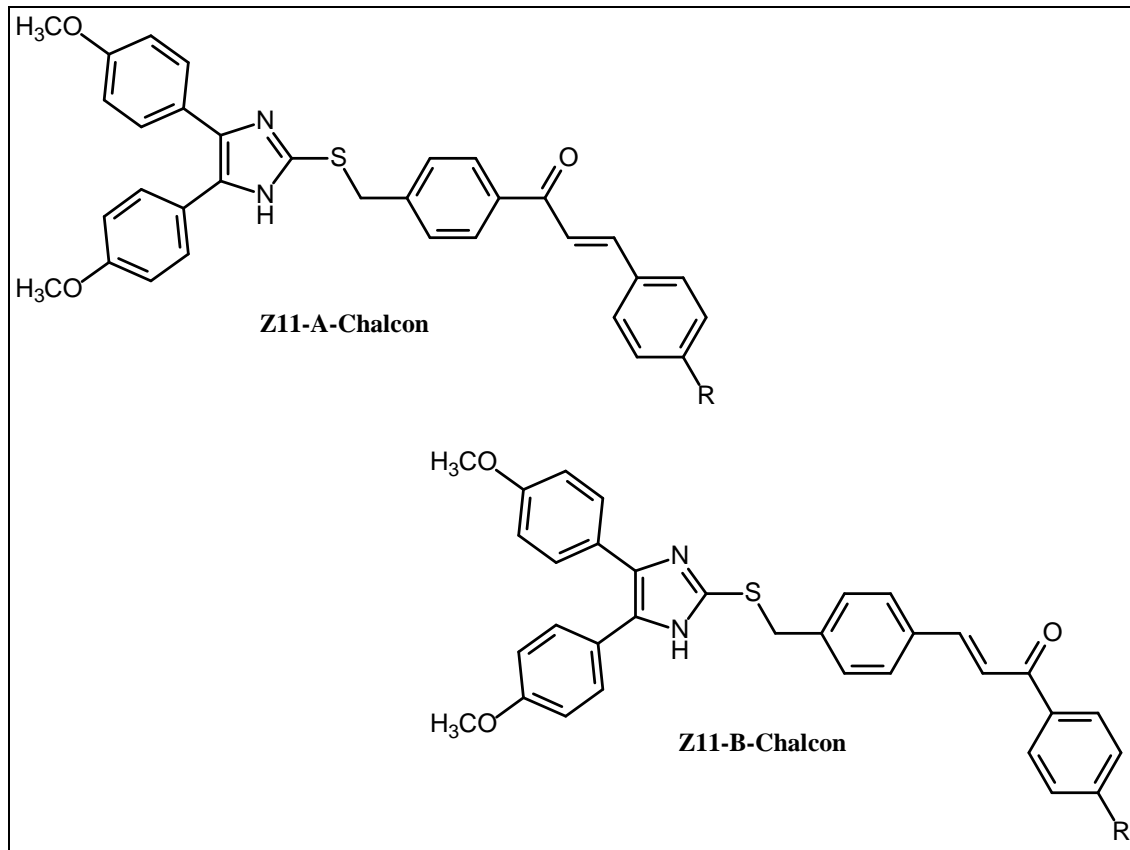


Abbildung 45: Allgemeine Struktur der konstitutionsisomeren Z11-A- und Z11-B-Chalcone

3.3.4 Überblick Testsubstanzen

In Abbildung 46 sind alle synthetisierten Testsubstanzen aufgeführt. Es wurden drei Z11-A-Chalone und ein Z11-B-Chalcon dargestellt.

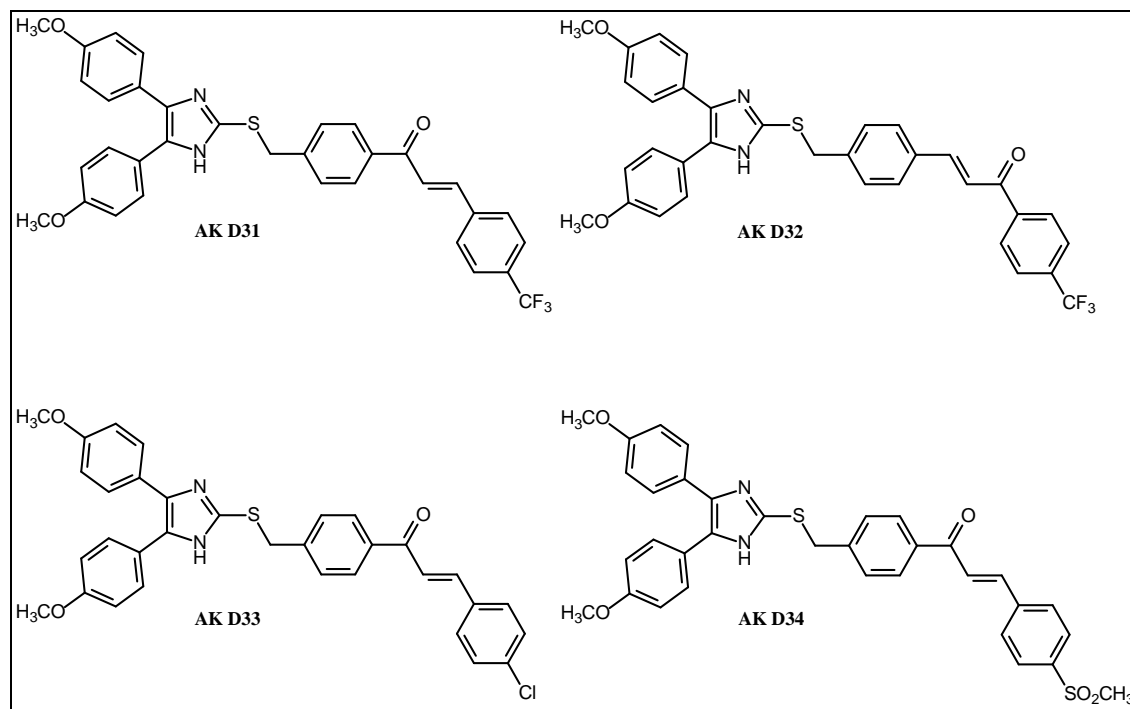


Abbildung 46: Überblick über die Testsubstanzen der Chalcon-Reihe

3.3.5 Auswahl der Substituenten

Sowohl das Z11-A-Chalcon AK D31 als auch das Z11-B-Chalcon AK D32 tragen einen Trifluormethylsubstituenten in *p*-Position. Der Einsatz von Trifluormethylresten ist bei vielen Wirkstoffklassen verbreitet, so besitzt beispielsweise der COX-2-Inhibitor Celecoxib diese funktionelle Gruppe. Auch bei Chalconen werden häufig Trifluormethylsubstituenten eingesetzt [127], wodurch die Metabolisierung des Wirkstoffs verlangsamt und somit dessen Wirkdauer gesteigert wird [12]. Als weiterer Substituent wurde Chlor (AK D33) ausgewählt. Das Z11-A-Chalcon AK D34 besitzt als Substituenten eine Methylsulfonylgruppe. Diese funktionelle Gruppe kann, in Analogie zur Struktur vieler Coxibe, die COX-2-Affinität steigern. Einige Coxibe, wie Rofecoxib und Etoricoxib, tragen einen Methylsulfonyl-Substituenten in *p*-Position an einem der beiden Phenylringe, wodurch eine Optimierung der Affinität in der Bindungstasche der COX-2 erreicht werden kann [12].

3.3.6 Syntheseentwicklung

3.3.6.1 Retrosynthetische Betrachtung

Bei einer Betrachtung der Leitstrukturen unter retrosynthetischen Aspekten wird eine Zerlegung in drei Synthone (einfache Molekülbausteine) deutlich. Die α , β -ungesättigte Carbonylstruktur des Chalcones ist über eine Aldolreaktion darstellbar. Als Bausteine werden *p*-substituierter Benzaldehyd als Carbonylkomponente und *p*-substituiertes Acetophenon als Methylengruppe eingesetzt. Die Verknüpfung von 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazolthiol (Z11) mit einer Methylengruppe in *p*-Position an Benzaldehyd oder Acetophenon kann über eine nucleophile Substitution erfolgen. Als Nucleofug dient Bromid [159]. In Abbildung 47 ist die Retrosynthese eines Z11-A-Chalcons aufgeführt.

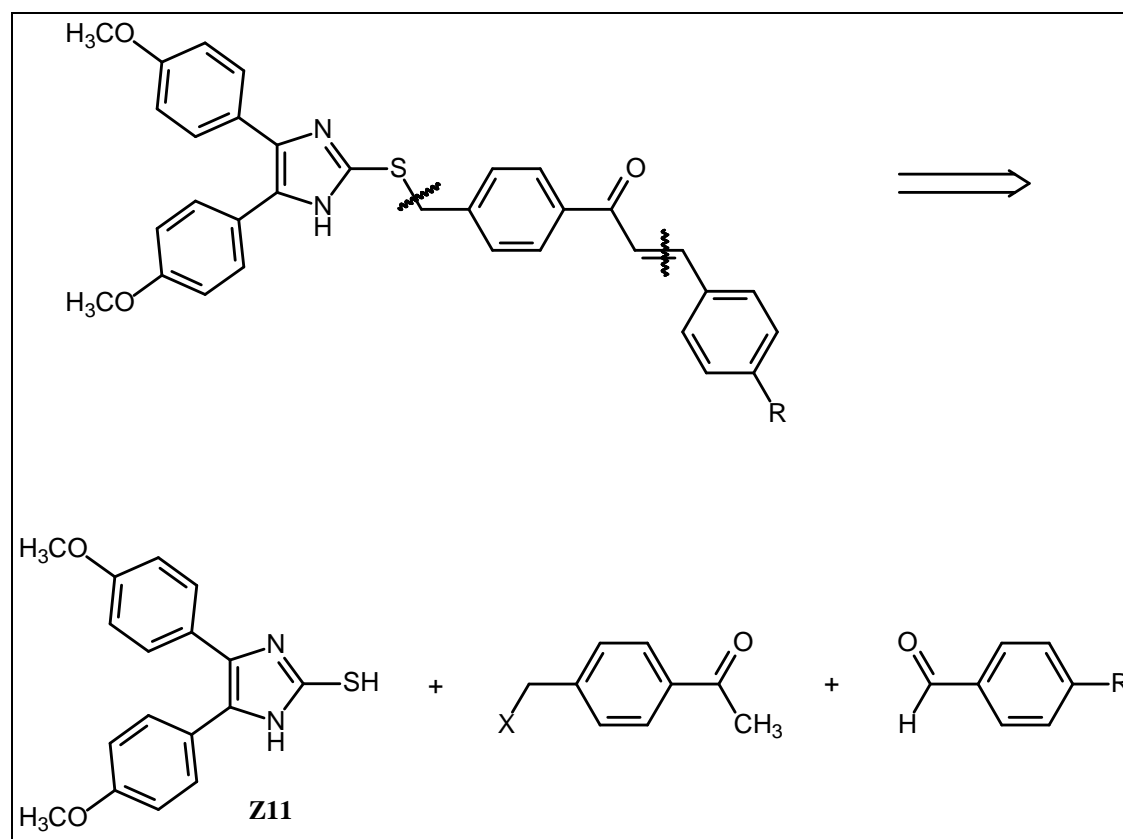


Abbildung 47: Retrosynthetische Betrachtung eines Z11-A-Chalcons

X: Halogen

3.3.6.2 Darstellung eines Z11-A-Chalcons

Z11-A-Chalcone lassen sich in einer vierstufigen Synthese darstellen. Es handelt sich um eine konvergente Synthese, bei der in den ersten beiden Stufen jeweils Z11 und die Methylenkomponente des späteren Chalcons synthetisiert werden. Die Verknüpfung dieser beiden Bausteine erfolgt in der dritten Stufe. Abschließend wird die Aldolreaktion durchgeführt. Der bereits vorhandene Molekülteil wird mit einem *p*-substituierten Benzaldehyd, der als Carbonylkomponente dient, zu einer α, β -unge-sättigten Carbonylverbindung verknüpft. Abbildung 48 gibt einen kurzen Überblick über die vollständige Synthese.

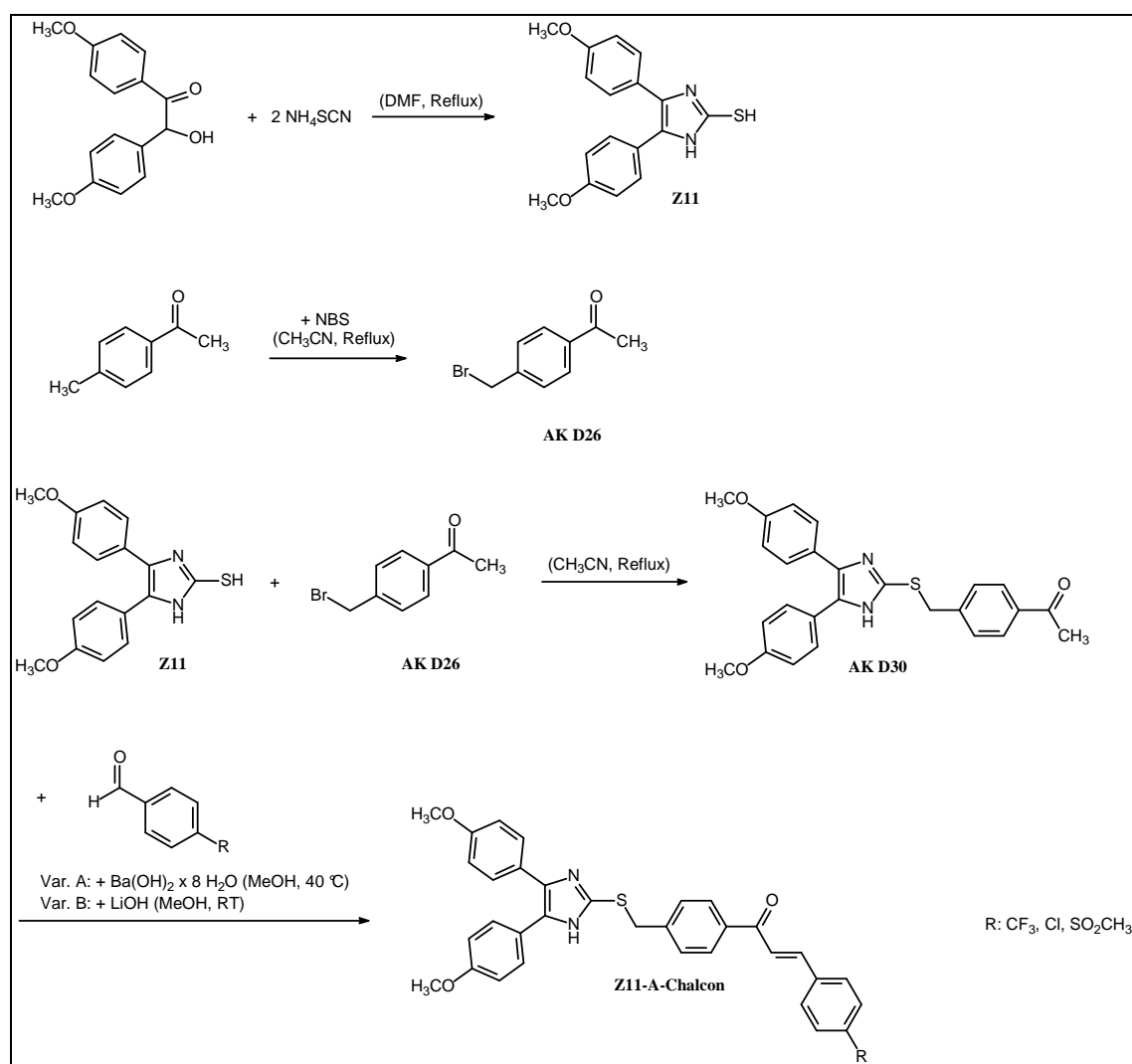


Abbildung 48: Darstellung der Z11-A-Chalcone

Stufe 1: Synthese des Mercaptoimidazol-Grundgerüsts

Die Darstellung von 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiol wurde bereits 1895 durch die Umsetzung von *p*-Anisoin mit Thioharnstoff beschrieben [160]. Eine weitere Syntheseariante verläuft über die Umsetzung des *p*-Anisoin mit Ammoniumthiocyanat [158]. Auf Grund präparativer Vorteile der Synthese unter Verwendung von Ammoniumthiocyanat - wie der Verkürzung der Reaktionszeit und einer vereinfachten Aufreinigung - wurde das synthetisierte 4,5-Bis-(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiol auf diesem Wege dargestellt. Da die Verbindung bereits in vorangegangenen Dissertationen [119, 125] ausführlich charakterisiert wurde, wird hier nur kurz auf deren Synthese eingegangen. Der Verlauf der Reaktion ist in Abbildung 49 aufgeführt. Durch nucleophile Substitutionsreaktionen wird Ammoniumthiocyanat an das α -Hydroxyketon kondensiert.

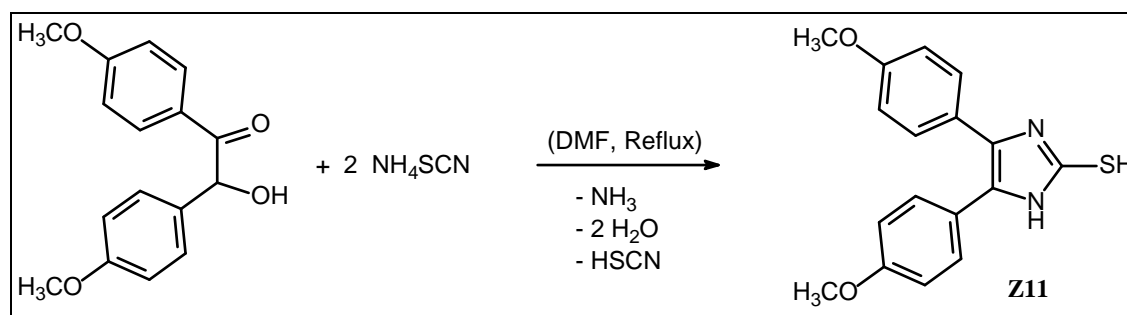


Abbildung 49: Synthese von 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiol (Z11)

Im ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 50) sind aufgrund des symmetrischen Substitutionsmusters nur drei Signale zu beobachten. Die sechs Protonen der beiden Methoxygruppen finden sich als Singulett bei 3.83 ppm. Die Signale der acht Protonen der beiden Aromaten liegen als zwei pseudo-Dubletts bei 6.85 und 7.60 ppm vor.

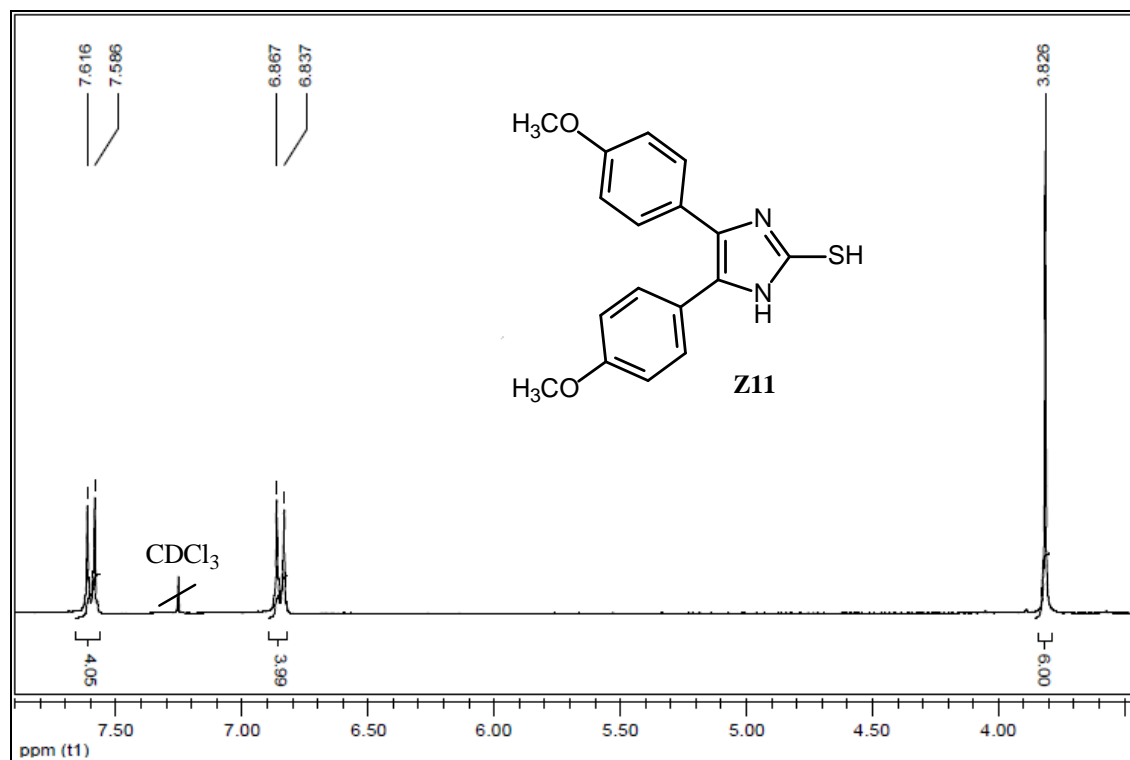


Abbildung 50: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol-2-thiol (Z11) in CDCl_3

Stufe 2: Synthese von 4-Brommethylacetophenon (AK D26)

Um 4-Methylacetophenon in *p*-Position mit der Thiofunktion des 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiols verknüpfen zu können, wird mit Brom eine geeignete Abgangsgruppe an der Methylgruppe eingeführt. Es wird eine Wohl-Ziegler-Bromierung durchgeführt, bei der das Molekül unter Einsatz von *N*-Bromsuccinimid (NBS) an der Methylgruppe bromiert wird. In Abbildung 51 ist der Verlauf der Reaktion dargestellt.

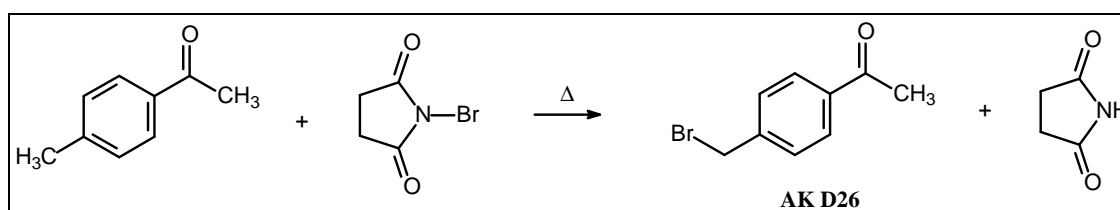


Abbildung 51: Synthese des 4-Brommethylacetophenons (AK D26)

Die Reaktion verläuft über den Mechanismus einer Radikalkettenreaktion. Der Zusatz eines Radikalstarters wie Azobisisobutyronitril (AIBN) oder Dibenzoylperoxid (DBPO) ist hier nicht notwendig. Molekulares Brom befindet sich als Verunreinigung im Reagenz und zerfällt unter Wärmezufuhr homolytisch [149].

Im Verlauf der Reaktion entsteht als Nebenprodukt Succinimid. Dieses kann leicht abgetrennt werden, da es in Tetrachlorkohlenstoff eine geringe Löslichkeit besitzt. Nach Zugabe von Tetrachlorkohlenstoff zum Reaktionsansatz befindet sich das Succinimid an der Oberfläche und kann abfiltriert werden [161].

Stufe 3: Synthese von 1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)ethanon (AK D30)

Bei der Verknüpfung von 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiol und 4-Brommethylacetophenon wird ein mit Z11 über eine Methylengruppe in *p*-Stellung gekoppeltes Acetophenon erhalten. Dieses Molekül dient in der darauf folgenden Aldolreaktion als Methylenelement. Die Verknüpfungsreaktion verläuft als nucleophile Substitution mit Bromid als Abgangsgruppe und Schwefel als Nucleophil.

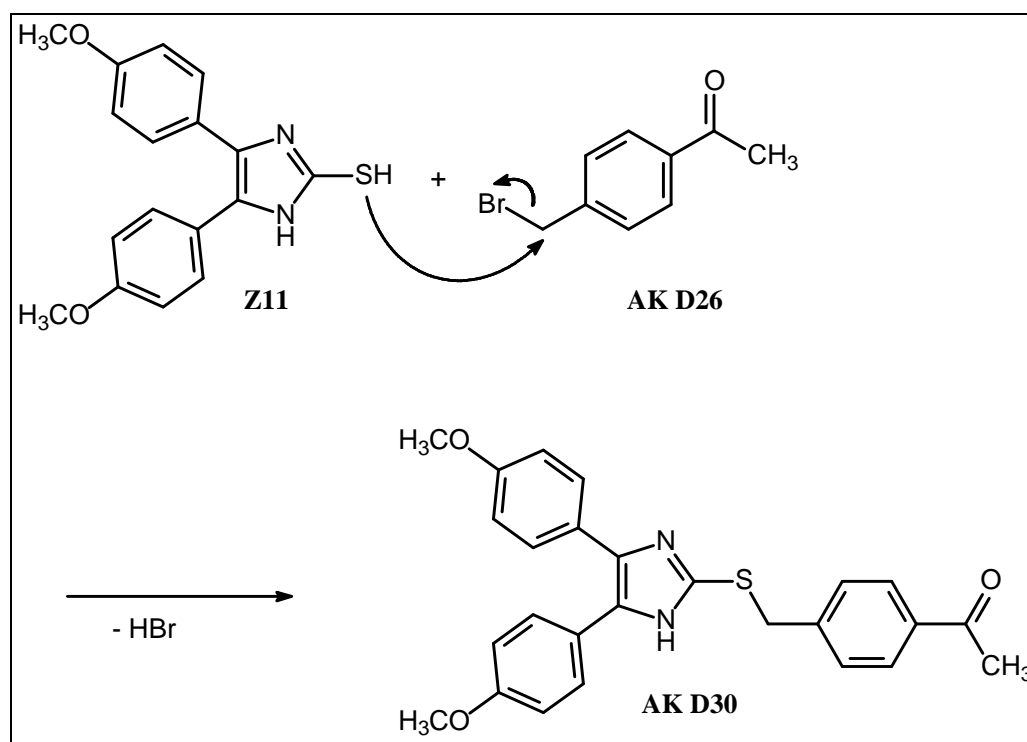


Abbildung 52: Synthese von 1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)ethanon (AK D30)

Im ¹H-NMR-Spektrum (Abbildung 53) sind die sechs, für *p*-substituierte Benzolderivate typischen, pseudo-Dubletts der aromatischen Protonen zu erkennen. Sie liegen im Bereich von 6.84 bis 7.90 ppm. Die Kopplungskonstanten betragen 8.1, 7.7 und 8.3 Hz. Das Signal der Thiomethylengruppe liegt bei 4.41 ppm. Bei den dicht aufeinander folgenden Singulets bei 3.73 und 3.76 ppm handelt es sich um die Signale der Methoxyprotonen. Bei 2.54 ppm findet sich das Signal der Methylgruppe.

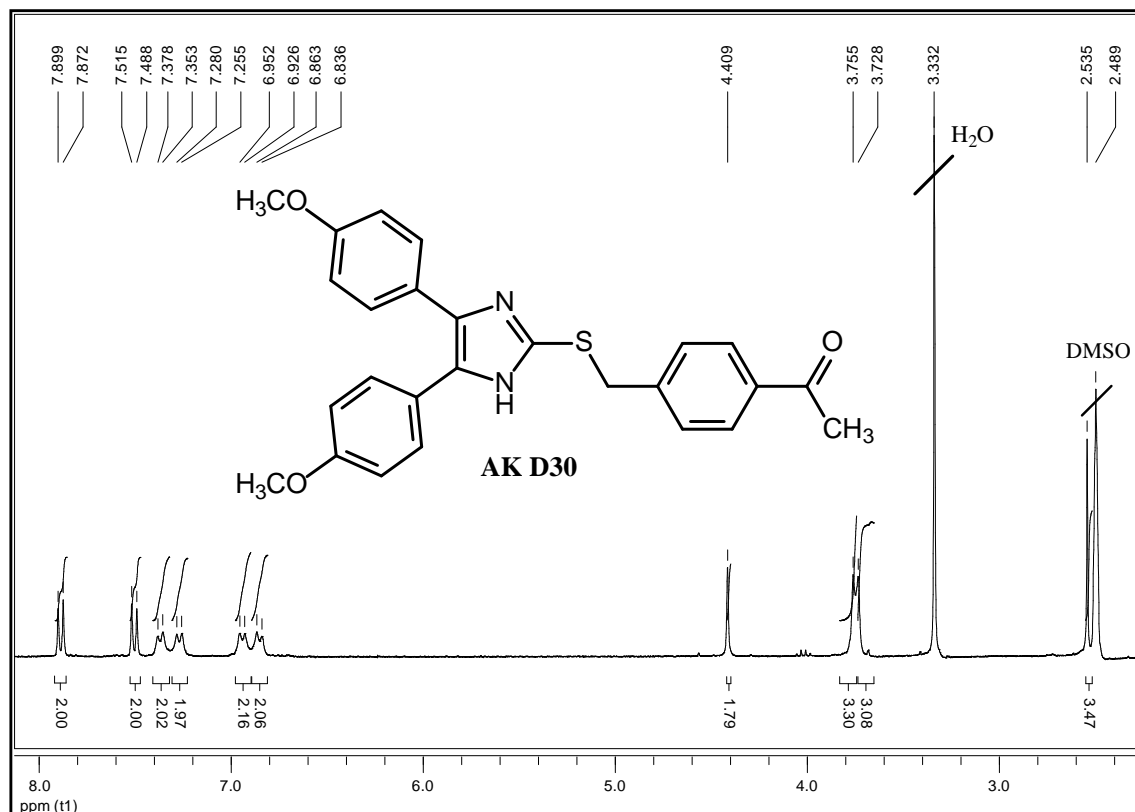


Abbildung 53: ^1H -NMR-Spektrum von 1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)ethanon (AK D30) in DMSO-d_6

Im letzten Schritt wird die Methylenkomponente AK D30 mit einer Carbonylkomponente in einer Aldolreaktion verknüpft. Der Verlauf der Reaktion ist in Kapitel 3.3.6.4 beschrieben. Als Carbonylkomponenten werden 4-Brombenzaldehyd, 4-(Trifluormethyl)benzaldehyd sowie 4-(Methylsulfonyl)benzaldehyd eingesetzt. 4-(Methylsulfonyl)benzaldehyd wird durch Oxidation von 4-(Methylmercapto)benzaldehyd dargestellt, die anderen beiden *p*-substituierten Benzaldehyde sind kommerziell verfügbar.

Synthese von 4-(Methylsulfonyl)benzaldehyd (AK D25):

Für die chemoselektive Oxidation von Sulfiden zu Sulfonen in der Gegenwart weiterer funktioneller Gruppen eignet sich die Verwendung von Oxone[®]. Das Reagenz setzt sich aus Kaliumhydrogenpersulfat, Kaliumhydrogensulfat und Kaliumsulfat im Verhältnis 2:1:1 zusammen und wird im Überschuss eingesetzt. Als reaktive Komponente fungiert Kaliumhydrogenpersulfat [162]. In Abbildung 54 ist der Verlauf der Reaktion aufgeführt, bei der sich als Zwischenprodukt ein Sulfoxid bildet. Der Reaktionsverlauf kann per DC-Kontrolle verfolgt werden.

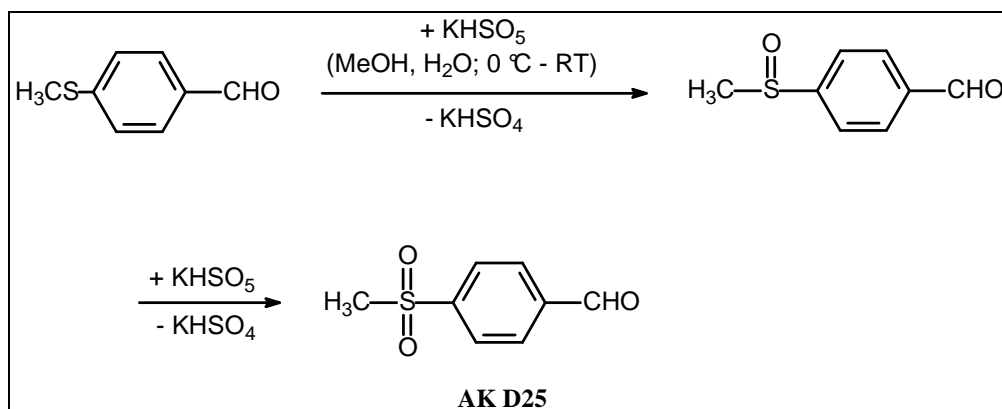


Abbildung 54: Synthese von 4-(Methylsulfonyl)benzaldehyd (AK D25)

Im Vergleich zu den in der Regel verwendeten organischen Peroxiden wie *m*-Chlorperbenzoesäure (mCPBA), die schon bei Temperaturen um den Gefrierpunkt weitere funktionelle Gruppen oxidieren können, ermöglicht Oxone[®] die Durchführung der Reaktion bei Raumtemperatur ohne die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen. Weitere Vorteile liegen in der Stabilität, der einfachen Handhabung und den geringen Kosten des Reagenz [163].

3.3.6.3 Darstellung eines Z11-B-Chalcons

In einer fünfstufigen Synthese können Z11-B-Chalcone dargestellt werden (siehe Abbildung 55). Da die Synthese des 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiols (Z11) bereits in Kapitel 3.3.6.2 beschrieben wurde, wird hierauf nicht näher eingegangen. Zunächst wird 4-Brommethylbenzaldehyd (AK D28) dargestellt, hierfür stehen zwei Varianten zur Verfügung. Ausgehend von 4-Diethoxymethylbenzaldehyd entsteht durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid 4-Hydroxymethylbenzaldehyd (AK D27), der unter Verwendung von *N*-Bromsuccinimid und Triphenylphosphin bromiert wird. Optional ist auch die Bromierung von *p*-Tolunitril über eine radikalische Substitution möglich. Das entstandene α -Brom-*p*-tolunitril kann dann mit Diisobutylaluminiumhydrid reduziert werden. Nach der Darstellung von Z11 werden AK D28 und Z11 in einer nucleophilen Substitutionsreaktion zu AK D29 verknüpft. Als letzte Stufe schließt sich eine Aldolreaktion von AK D29 und *p*-substituiertem Acetophenon an.

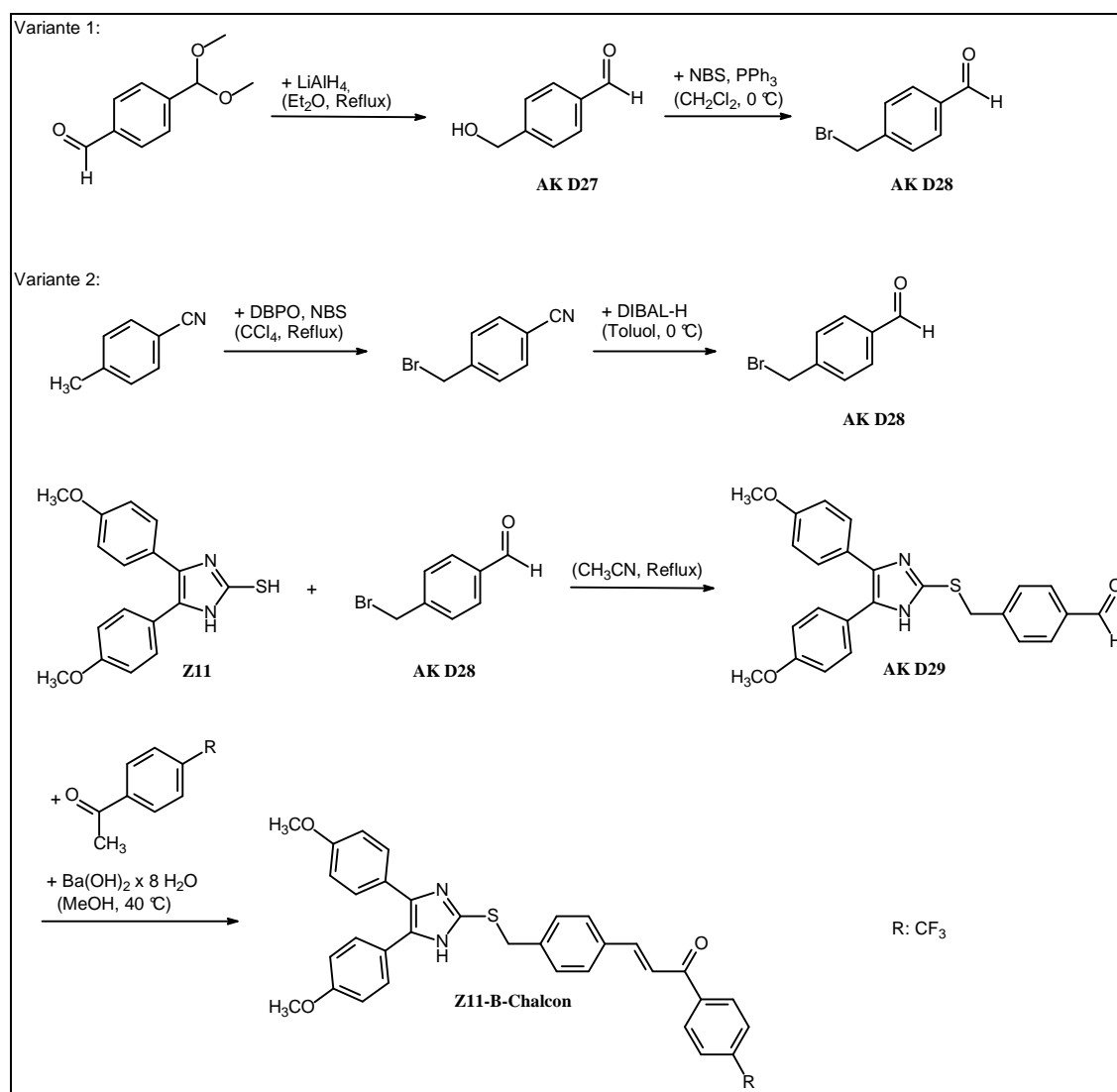


Abbildung 55: Darstellung eines Z11-B-Chalcons

Synthese von 4-Brommethylbenzaldehyd (AK D28)

Wie bereits erwähnt ist es möglich, *p*-Brommethylbenzaldehyd (AK D28) über zwei verschiedene, jeweils zweistufige Syntheseverarianten darzustellen. Nachteilig bei Variante 2 ist die tränenreizende Wirkung des Produkts der ersten Stufe, α -Brom-*p*-tolunitril. Da zur Darstellung des Z11-B-Chalcons AK D32 ausschließlich Variante 1 verwendet wurde, wird im Folgenden auf diese näher eingegangen. Details zu Variante 2 finden sich in der Diplomarbeit [159].

Variante 1

Stufe 1: Synthese von 4-Hydroxymethylbenzaldehyd (AK D27)

Die Darstellung von 4-Brommethylbenzaldehyd durch direkte Bromierung von *p*-Tolylaldehyd analog zur Bromierung von 4-Methylacetophenon (siehe Kapitel 3.3.6.2) liefert ein Produktgemisch, dessen Aufreinigung sich als schwierig erwies. Des Weiteren konnte das Produkt nur in geringen Ausbeuten erhalten werden. Deshalb wurde der Umweg über die Hydroxylgruppe gewählt, die anschließend nucleophil mit Brom substituiert wurde. In Abbildung 56 ist der Verlauf der Reaktion dargestellt.

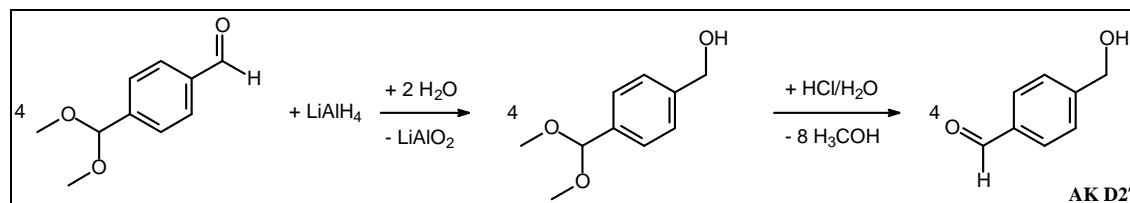


Abbildung 56: Synthese von 4-Hydroxymethylbenzaldehyd (AK D27)

Lithiumaluminiumhydrid dient als Reduktionsmittel. Es reagiert als H-Nucleophil und überträgt ein Hydridion auf den Carbonylkohlenstoff des Aldehyds. Somit wird der Aldehyd zum Alkohol reduziert [149]. Die zweite Aldehydgruppe liegt geschützt in Form eines Acetals vor. Zur Abspaltung der Schutzgruppe wird nach Ablauf der Reaktion verdünnte Salzsäure zugegeben.

Stufe 2: Synthese von 4-Brommethylbenzaldehyd (AK D28)

4-Hydroxymethylbenzaldehyd (AK D27) wird mit *N*-Bromsuccinimid in Anwesenheit von Triphenylphosphin bromiert. Der Verlauf der Reaktion ist in Abbildung 57 dargestellt.

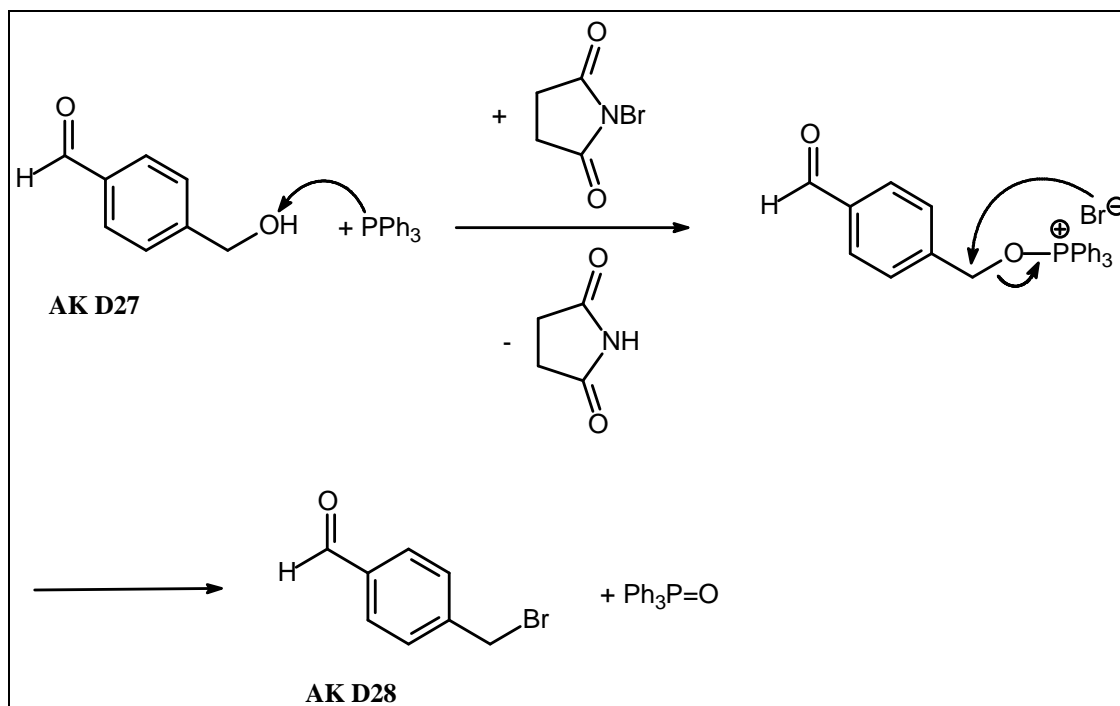


Abbildung 57: Darstellung von 4-Brommethylbenzaldehyd (AK D28)

Der Mechanismus der Substitution einer Hydroxylgruppe mit einem Halogenid unter Verwendung von NBS/PPh₃ ist in der Literatur beschrieben [164]. Es handelt sich um eine S_N2-Reaktion, bei der als Intermediat ein quartäres Phosphoniumsalz entsteht und Triphenylphosphinoxid als Abgangsgruppe fungiert.

Synthese von 4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol-2-ylthio)methyl)benzaldehyd (AK D29)

Die Verknüpfung von 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol-2-thiol (Z11) mit *p*-Brommethylbenzaldehyd verläuft analog der in Kapitel 3.3.6.2 beschriebenen nucleophilen Substitution zur Darstellung eines Z11-A-Chalcons. Man erhält die für die Aldolreaktion benötigte Carbonylkomponente.

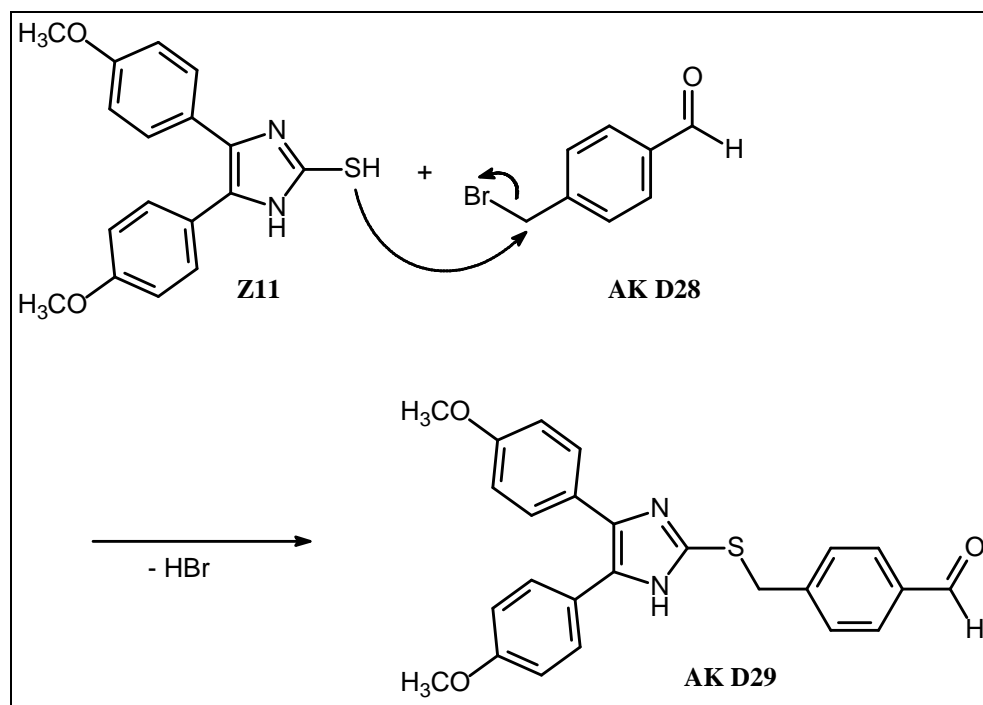


Abbildung 58: Synthese von 4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol-2-ylthio)methyl)benzaldehyd (AK D29)

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 59) sind bei 3.77 ppm die insgesamt sechs Protonen der Methoxygruppen zu erkennen. Das Signal der Methylengruppe liegt bei 4.72 ppm. Die zwölf aromatischen Protonen der drei *p*-substituierten Phenylringe sind im Bereich von 6.81 bis 7.57 ppm zu sehen. Am stärksten tieffeldverschoben sind die Signale der Protonen des Aromaten, der die Aldehydfunktion trägt. Das Singulett des aldehydischen Protons findet sich bei 9.83 ppm.

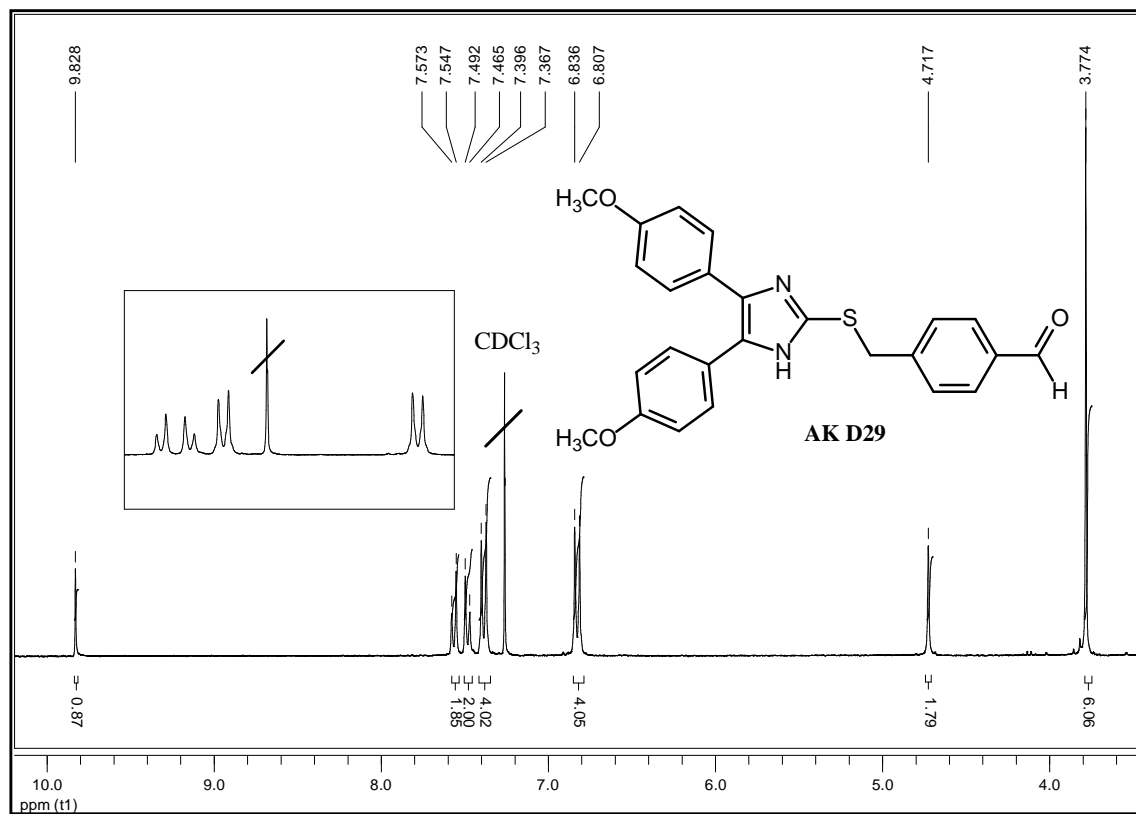


Abbildung 59: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol-2-ylthio)methyl)benzaldehyd (AK D29) in CDCl_3

3.3.6.4 Aldolreaktion

Bei einer Aldolreaktion kommt es durch Addition eines α -Kohlenstoffatoms einer enolisierbaren Carbonylverbindung (Methylenkomponente) an die Carbonylgruppe eines Aldehyds oder Ketons (Carbonylkomponente) zu einer C-C-Bindungsknüpfung. Die Reaktion verläuft im Allgemeinen *trans*- bzw. *E*-selektiv. Dies kann zwei Ursachen haben: eine thermodynamische Kontrolle oder „product-development control“ (günstigeres Energieprofil des *trans*-Isomers), wenn eine kinetische Kontrolle vorliegt. Die Synthese kann sowohl unter Basen- als auch unter Säurekatalyse erfolgen. Bei der Reaktion unter Basenkatalyse handelt es sich um den Mechanismus der E_{1cB} -Eliminierung. Bei Säurekatalyse verläuft die Reaktion nach dem E_1 -Mechanismus unter Bildung eines Carbeniumions als Zwischenprodukt. Die gekreuzte Aldolreaktion (Claisen-Schmidt-Reaktion), bei der als Edukte ein Aldehyd und ein Keton eingesetzt werden, hat den Nachteil, dass mehrere Produkte entstehen können [150, 151]. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Edukte ermöglichen einen chemoselektiven Verlauf der Reaktion, da Ketone im Allgemeinen nur als Methylenkomponente und Benzaldehyd – aufgrund fehlender acider Protonen - nur als Carbonylkomponente reagieren können. Abbildung 60 zeigt eine gekreuzte Aldolreaktion zur Darstellung eines Chalcon.

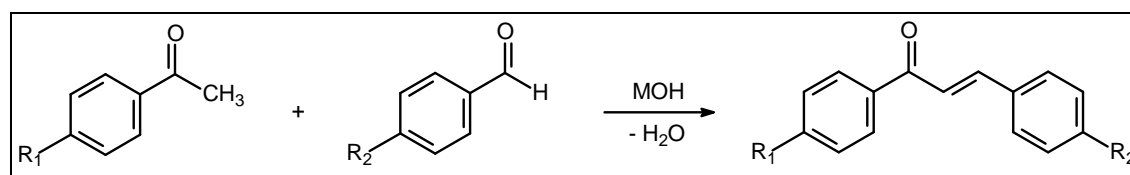


Abbildung 60: Basenkatalysierte Aldolreaktion

[M: Alkalimetall; R: Alkyl, Aryl, funktionelle Gruppen]

Zu Beginn der Reaktion wird die Methylenkomponente durch eine Base deprotoniert. Nach Angriff des Enolats an der Carbonylkomponente entsteht ein Chelatkomplex zwischen dem entstandenen Alkoholat und dem Alkalimetall-Ion. Dieser sogenannte Zimmermann-Traxler-Übergangszustand geht anschließend in ein Aldol über. Bei der nun folgenden Dehydratisierung wird die α -ständige Methylengruppe durch die Base deprotoniert und es entsteht ein Enolat. Unter Abspaltung der Hydroxylgruppe wird die Doppelbindung gebildet und das gewünschte Chalcon erhalten [150].

Als Katalysatoren verwendet man in der Regel Basen. Diese können in äquimolaren oder katalytischen Mengen eingesetzt werden. Verwendet man äquimolare Mengen, verläuft die Reaktion irreversibel. Setzt man die Base in katalytischen Mengen ein, verläuft die Aldoladdition als Gleichgewichtsreaktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurden als Katalysatoren Lithiumhydroxid und Bariumhydroxid-Octahydrat in äquimolaren Mengen verwendet.

Folgende Z11-A- und -B-Chalcone konnten synthetisiert werden:

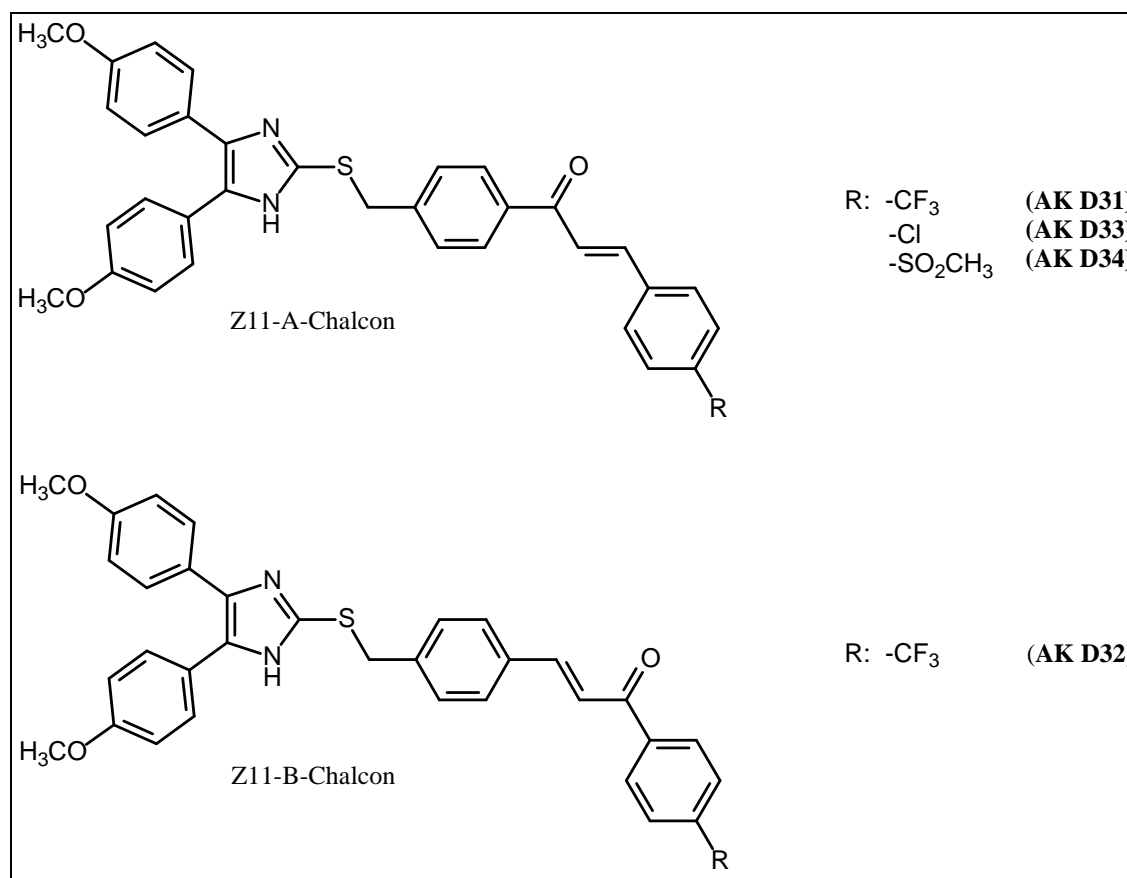


Abbildung 61: Übersicht über die Testsubstanzen der Chalcone

Der Produktnachweis kann mit Hilfe der NMR-Spektroskopie erbracht werden. Im Folgenden sind die ¹H-NMR-Spektren von AK D31 (als Beispiel für ein Z11-A-Chalcon) (Abbildung 62 und Abbildung 63) und AK D32 (Abbildung 64 und Abbildung 65) aufgeführt.

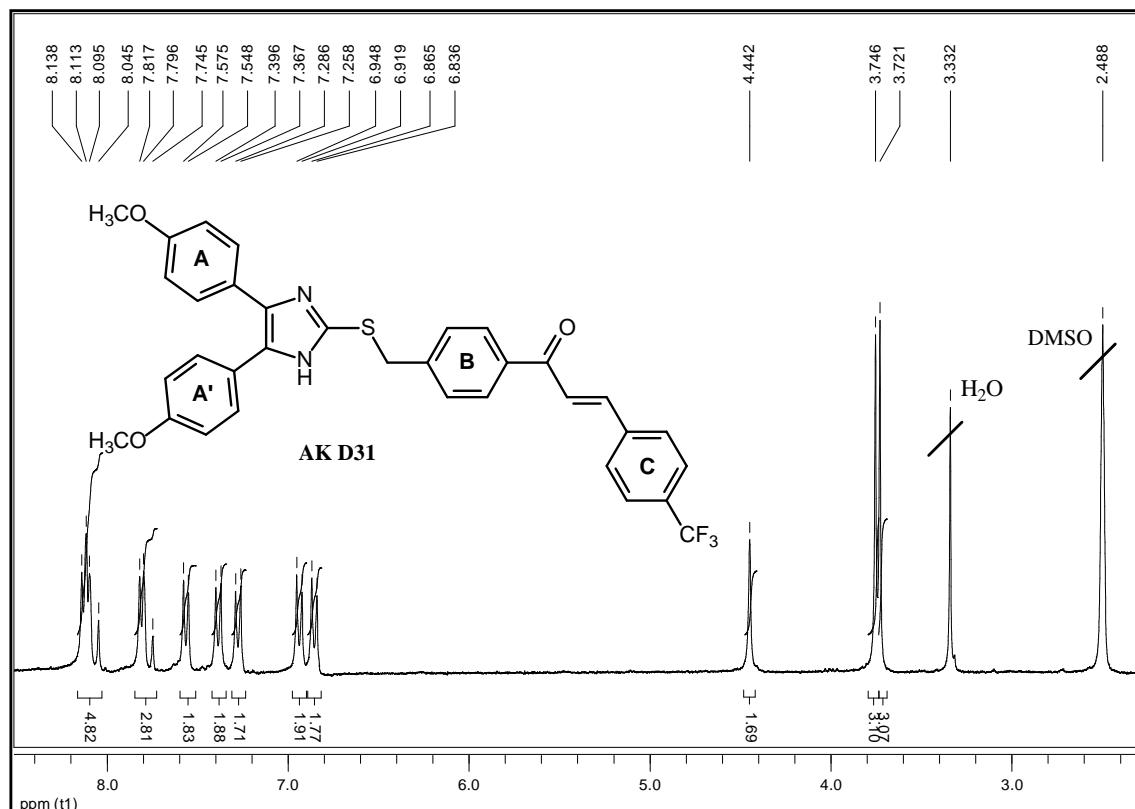


Abbildung 62: ¹H-NMR-Spektrum von (*E*)-1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)phenyl)-3-(4-(trifluormethyl)phenyl)prop-2-en-1-on (AK D31) in DMSO-*d*₆

In Abbildung 62 ist das ¹H-NMR-Spektrum von AK D31 aufgeführt. Die sechs Protonen der beiden Methoxygruppen sind als dicht nebeneinander liegende Singulets bei 3.72 und 3.75 ppm zu finden. Das Signal der Methylengruppe liegt bei 4.44 ppm. Die Signale der aromatischen sowie der olefinischen Protonen sind als Ausschnitt vergrößert in Abbildung 63 zu sehen. Die vier pseudo-Dubletts der Protonen beider Methoxy-substituierter Phenylringe (Ringe A, A') liegen bei 6.85, 6.93, 7.27 und 7.38 ppm. Die Kopplungskonstanten betragen 8.6 Hz. Bei 7.56 ppm ist das pseudo-Dublett von zwei Protonen des Trifluormethyl-substituierten Phenylrings (Ring C) zu sehen. Bei 7.75 – 7.82 ppm folgt ein Multiplett, das sich aus den Signalen von zwei Protonen von Ring B und einem olefinischen Proton zusammensetzt. Das Multiplett bei 8.05 – 8.14 ppm besteht aus den Signalen eines olefinischen Protons und jeweils zwei Protonen der Ringe B und C. Die Zuordnung der aromatischen Protonen erfolgt aufgrund eines Simulationsprogramms (ChemDraw 9.0, Firma CambridgeSoft®).

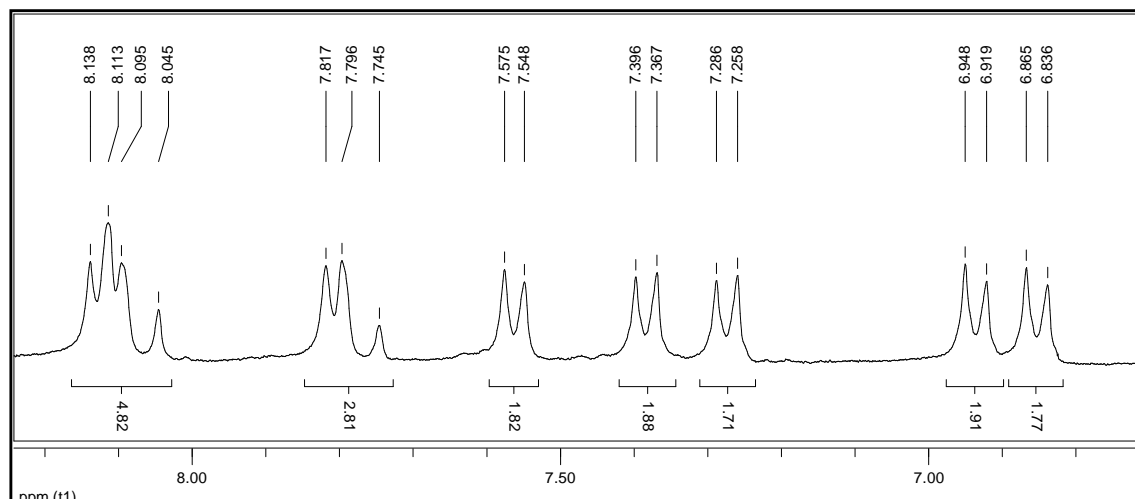


Abbildung 63: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von (*E*)-1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)phenyl)-3-(4-(trifluormethyl)phenyl)prop-2-en-1-yl)on (AK D31) in DMSO-d_6

Im ^1H -NMR-Spektrum von AK D32 (Abbildung 64) liegen die sechs Protonen der beiden Methoxygruppen als Singulets dicht nebeneinander bei 3.73 und 3.75 ppm. Das Signal der Methylengruppe ist bei 4.39 ppm zu finden. Die acht Protonen der beiden Phenylringe A und A' sind als pseudo-Dubletts bei 6.87, 6.95, 7.47 und 7.84 ppm zu sehen. Die Kopplungskonstanten betragen 8.1 Hz. Die beiden pseudo-Dubletts der Protonen von Ring B bei 7.26 und 7.37 ppm liegen aufgrund des Fehlens der ringgebundenen Carbonylgruppe stärker im hohen Feld als bei AK D31. Das Dublett eines olefinischen Protons ist bei 7.75 ppm zu sehen, die Kopplungskonstante beträgt 15.6 Hz. Bei 7.92 – 7.94 ppm befindet sich ein Multiplett, das sich aus den Signalen eines olefinischen Protons sowie zweier aromatischen Protonen von Ring C zusammensetzt. Das pseudo-Dublett der anderen zwei Protonen von Ring C liegt stark im Tieffeld bei 8.30 ppm. Die Zuordnung der aromatischen Protonen basiert wiederum auf dem Simulationsprogramm ChemDraw 9.0.

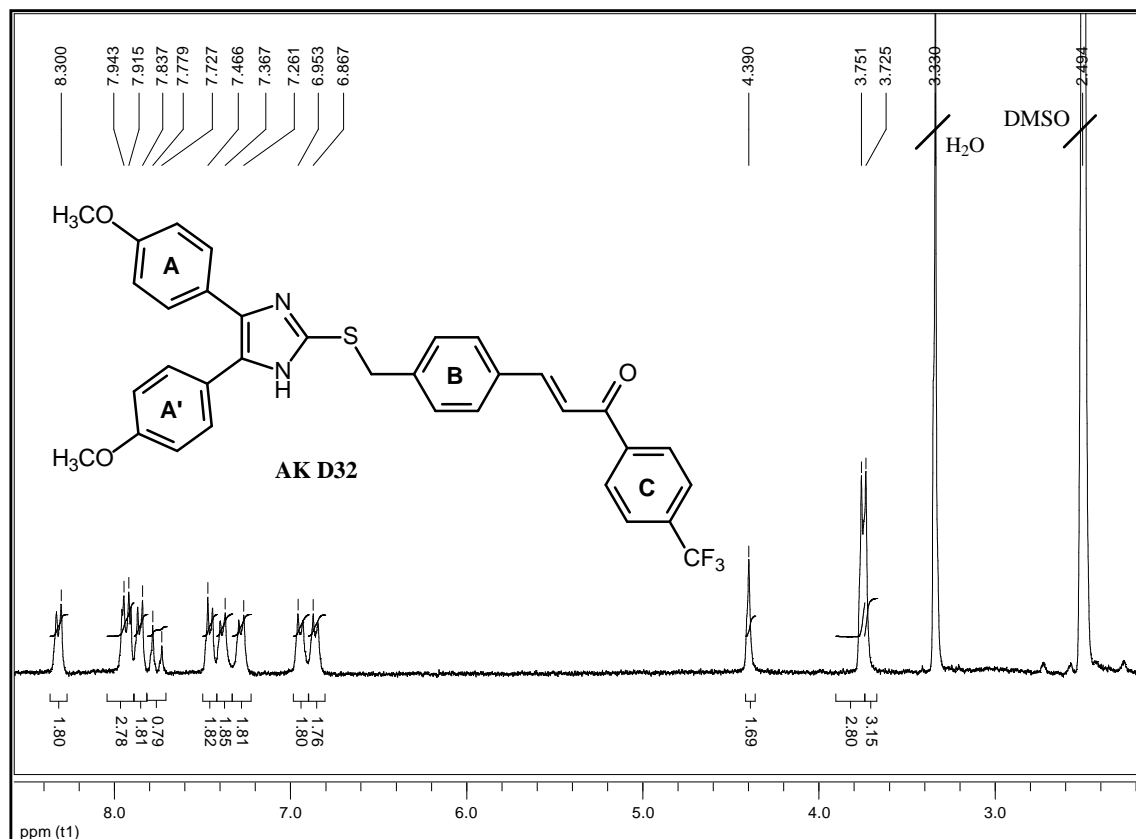


Abbildung 64: ¹H-NMR-Spektrum von (*E*)-3-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)prop-2-en-1-on (AK D32) in DMSO-d₆

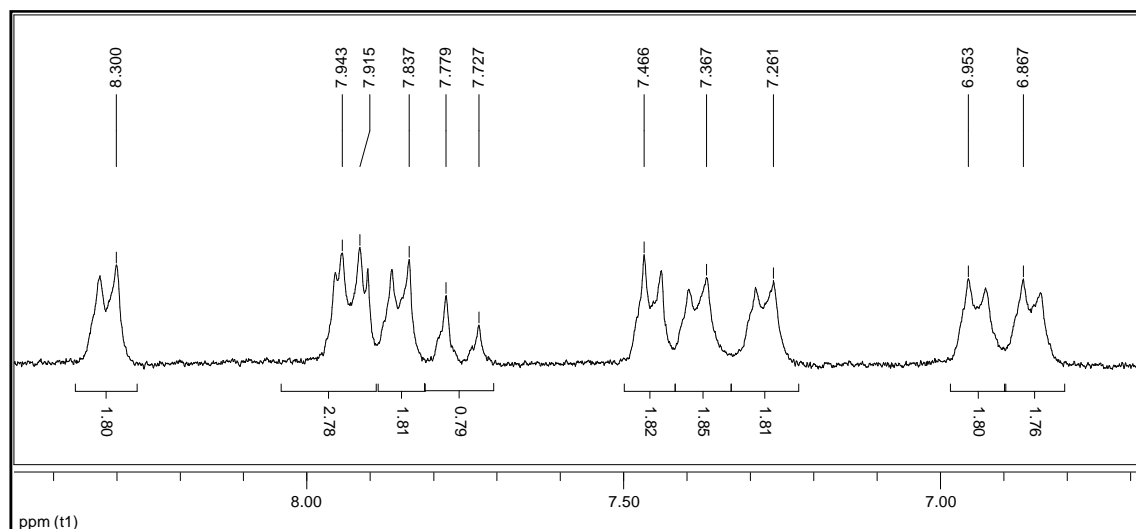


Abbildung 65: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von (*E*)-3-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)prop-2-en-1-on (AK D32) in DMSO-d₆

3.3.7 Konfiguration und Konformation der Enon-Struktur

Chalcone sind infolge des delokalisierten π -Elektronensystems weitestgehend planare Moleküle [128]. Die C_{α} - C_{β} -Doppelbindung der Enon-Teilstruktur kann die *E*- oder *Z*-Konfiguration annehmen. Da das *E*-Isomer jedoch thermodynamisch stabiler ist, liegen fast alle Chalcone in der *E*-Konfiguration vor. Zudem verläuft die Aldolreaktion im Allgemeinen ebenfalls *trans*- bzw. *E*-selektiv [150].

Diese These kann durch $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Untersuchungen der Testsubstanzen bestätigt werden. Bei den Spektren von AK D32 und AK D34 ist es möglich, die Kopplungskonstanten der olefinischen Protonen zu bestimmen. Sie liegen bei $^3J = 15.6$ Hz (AK D32) und $^3J = 15.7$ Hz (AK D34). Bei Kopplungskonstanten zwischen 14 – 20 Hz liegt in der Regel eine *E*-Konfiguration vor [165].

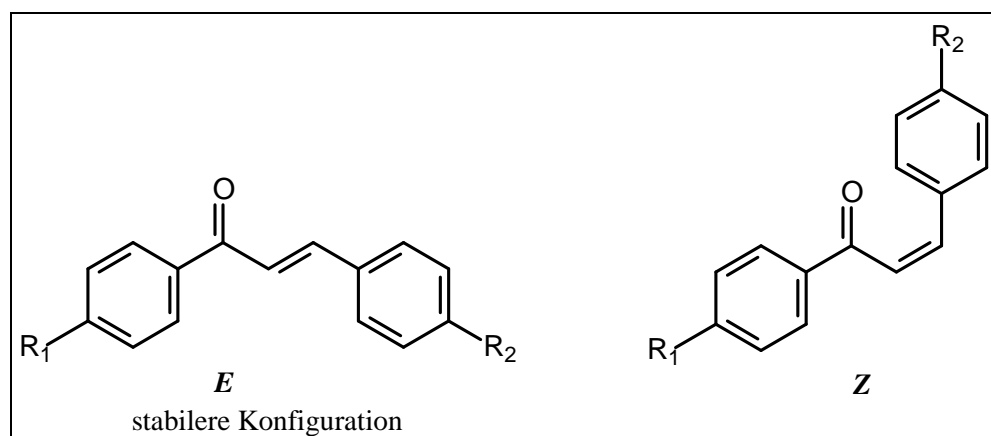


Abbildung 66: *E*- und *Z*-Konfiguration eines Chalcons

Neben den beiden möglichen Konfigurationen sind auch zwei verschiedene Konformationen der α,β -ungesättigten Carbonylstruktur denkbar. Die räumliche Anordnung der beiden konjugierten Doppelbindungen wird bei einer synperiplanaren Anordnung als *s-cis* und bei einer antiperiplanaren Anordnung als *s-trans* bezeichnet [166]. Kristallstrukturen verschiedener Chalcone zeigen, dass das *s-cis*-Konformer um 3.9 kJ/mol stabiler ist als das *s-trans*-Konformer. Dies gilt nur für Chalcone, die am α -Kohlenstoffatom nicht substituiert sind [167].

Die höhere Stabilität der *s-cis*-Konformation kann am Beispiel von AK D31 durch ein Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy-Experiment (NOESY) nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um ein 2D-Verfahren, bei dem Dipol-Dipol-Wechselwirkungen durch den Raum sichtbar gemacht werden. Es wurde ein H, H-NOESY-Experiment durchgeführt, um Kopplungen zwischen Protonen aufzudecken, die in enger räumlicher Nachbarschaft zueinander stehen. Auf den beiden Achsen sind die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zu sehen [165].

Betrachtet man die beiden möglichen Konformationen so wird deutlich, dass im Falle einer *s-cis*-Konformation eine Kopplung zwischen H- α und H-2 im NOESY-Spektrum zu sehen sein sollte. Beim Vorliegen der *s-trans*-Konformation sollte eine Kopplung zwischen H- β und H-2 zu beobachten sein.

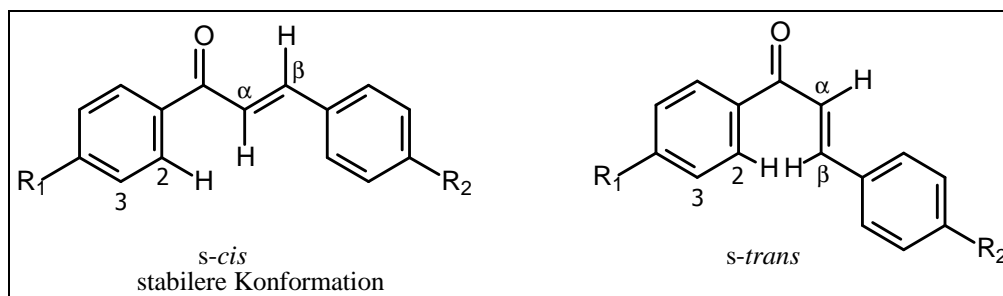


Abbildung 67: *s-cis*- und *s-trans*-Konformation eines Chalcones

Im NOESY-Spektrum (Abbildung 68) ist eine H- α , H-2-Kopplung zu erkennen, eine H- β , H-2-Kopplung liegt nicht vor. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass aufgrund der geringeren sterischen Hinderung die *s-cis*-Konformation bei Chalconen dieses Typs die stabilere ist.

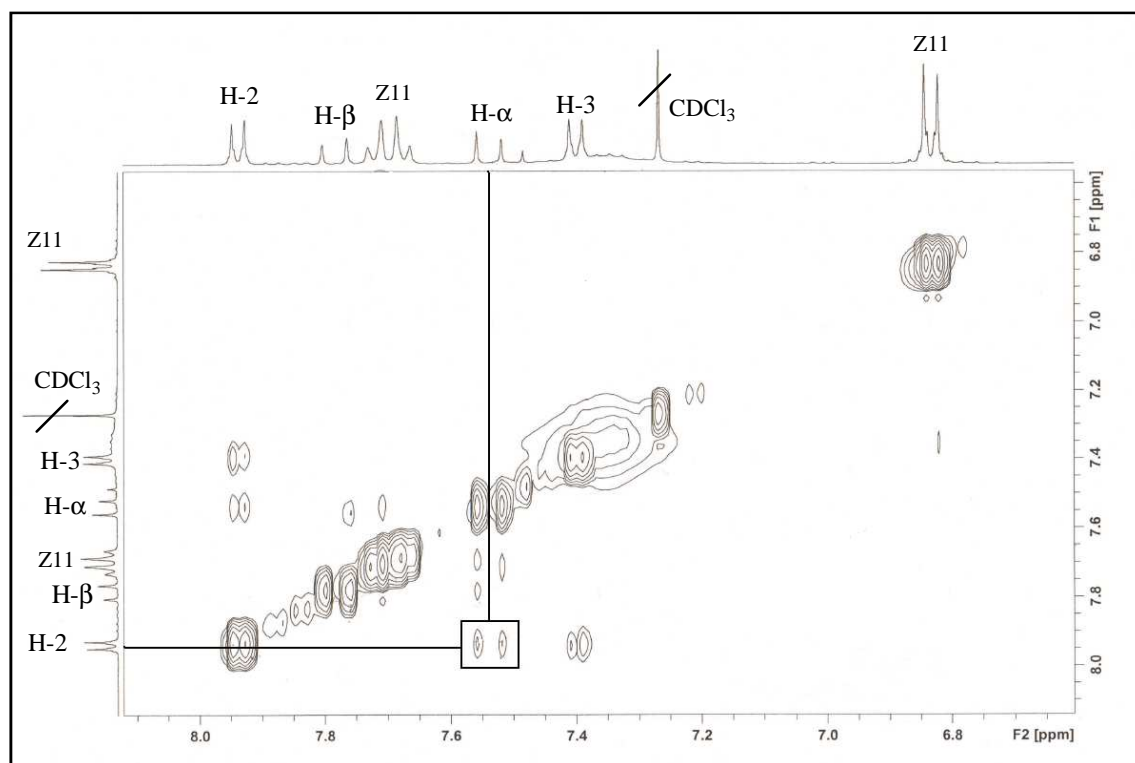


Abbildung 68: NOESY-Spektrum von AK D31 in CDCl_3

4 Pharmakologischer Teil

4.1 Einführung

Zur Bestimmung der pharmakologischen Wirksamkeit und Cytotoxizität der Testverbindungen wurden mehrere *in vitro* Testungen durchgeführt. Von besonderer Bedeutung war die pharmakologische Charakterisierung der Testsubstanzen hinsichtlich der COX-1-, COX-2- und 5-LOX-Inhibition. Zudem wurde die pharmakologische Wirksamkeit gegenüber TNF- α in einem kommerziell verfügbaren Immunassay untersucht. Die Toxizität wurde über den XTT-Viabilitätsassay gemessen. Zur Vervollständigung des pharmakologischen Profils wurden die log P-Werte der Testsubstanzen mit der RP-HPLC-Methode bestimmt.

4.2 COX-1

4.2.1 Einführung

Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Testsubstanzen gegenüber der Cyclooxygenase 1 stehen verschiedene *in vitro* Testsysteme zur Verfügung. Sie beruhen in der Regel auf der Quantifizierung von Produkten der Arachidonsäure-Kaskade.

So kann die Konzentration des Prostaglandins $F_{2\alpha}$ mit Hilfe eines Enzym-Immuno-Assays (EIA) bestimmt werden. Hierfür wird PGH_2 nach Ablauf der Enzymreaktion durch $SnCl_2$ zu $PGF_{2\alpha}$ reduziert [168, 169, 170]. Des Weiteren kann die Peroxidase-Aktivität der Cyclooxygenasen durch Bestimmung der Konzentration von N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-phenylendiamin (TMPD) gemessen werden. TMPD wird durch die Peroxidase oxidiert und das entstehende farbige Produkt vermessen [171]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Konjugation von PGG_2 mit 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin (ADHP) zu Resorufin. Das fluoreszierende Produkt wird quantitativ bestimmt [172]. Darüber hinaus ist eine Bestimmung des O_2 -Verbrauchs, der bei der Oxidation der Arachidonsäure zu PGG_2 entsteht, mit einer Clark- O_2 -Elektrode möglich [170]. Als weitere Option kann ein radiochemischer Assay durchgeführt werden, bei dem [$1-^{14}C$]Arachidonsäure eingesetzt wird und die entstandenen Metabolite nach HPLC-Trennung spektrophotometrisch vermessen werden [173, 174].

Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei Testsysteme zum Einsatz. Beide Assays beruhen auf der UV-Detektion von Metaboliten, die bei der Synthese von Thromboxan A_2 entstehen.

4.2.2 12-HHT-Assay

4.2.2.1 Prinzip des 12-HHT-Assays

Das Testsystem wurde von Lehr [175] im Arbeitskreis entwickelt. Es beruht auf einer Messung der Konzentration von 12-Hydroxyheptadeca-5,8,10-triensäure (12-HHT), die im Verlauf der Arachidonsäure-Kaskade als Nebenprodukt entsteht. Prostaglandin H₂ (PGH₂) wird durch die Thromboxan-Synthase in Thromboxan A₂ (TXA₂), Malondialdehyd (MDA) und 12-Hydroxyheptadeca-5,8,10-triensäure (12-HHT) im Verhältnis 1:1:1 metabolisiert (siehe Abbildung 69) [176, 177].

Für diesen *in vitro* Assay werden Rinderthrombozyten eingesetzt, da diese nur das COX-1-Isoenzym exprimieren. Eine Aktivierung der Cyclooxygenase ist hier nicht notwendig; Voraussetzung für eine Enzymreaktion ist lediglich das Vorhandensein freier Arachidonsäure. Zur Aktivierung der Phospholipase A₂ wird das Ca-Ionophor A23187 zugegeben. Hierbei handelt es sich um ein Antibiotikum, das die Öffnung der Ca²⁺-Kanäle bewirkt. Als interner Standard dient 3-(2,2-Dimethyl-5,6-diphenyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizin-7-yl)buttersäure und als Referenzsubstanz Indometacin. Nach Ablauf der enzymatischen Reaktion werden die entstandenen Metabolite über eine Reverse Phase (RP)-HPLC getrennt. Eine UV-Detektion von 12-HHT ist anschließend bei 232 nm möglich [175, 178].

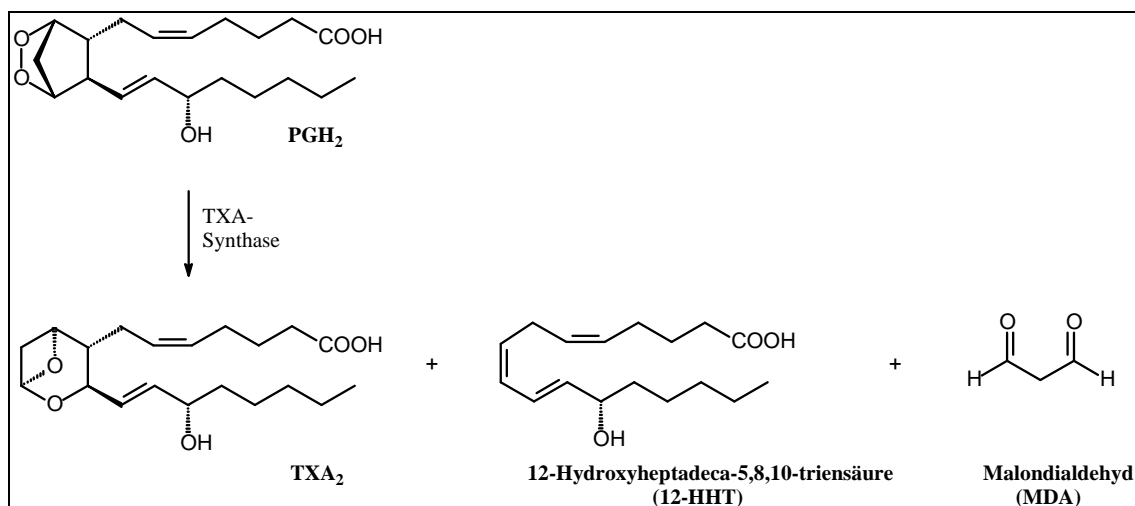


Abbildung 69: Synthese von TXA₂ als Teilschritt der Arachidonsäure-Kaskade

Um die Enzymhemmung korrekt ermitteln zu können, muss die Konzentration der Enzymprodukte während der Inkubationszeit linear ansteigen. Die Inkubationsdauer bei diesem Testsystem liegt bei einer Minute, da die Zunahme der Reaktionsprodukte nur in der ersten Minute der Enzymreaktion annähernd linear ist. Die Enzymreaktion wird mit

einer Stopplösung beendet, die aus Methanol, Acetonitril und dem Antioxidans NDGA (Nordihydroguariatsäure) besteht. Neben den Proben mit den Testsubstanzen werden zum Vergleich Stimulationen getestet, die nur DMSO und das Ca-Ionophor enthalten (Positiv-Kontrolle). Als Negativ-Kontrolle dient eine unstimulierte Probe. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgt mit der Software ENZFIT (Firma Elsevier-Biosoft) [175].

Nachteilig ist, dass eine verminderte Bildung von 12-HHT nicht immer ausschließlich auf eine Hemmung der Cyclooxygenase zurückgeführt werden kann. Auch eine Hemmung der Thromboxansynthase (TXAS) verringert die 12-HHT-Konzentration. Der Einfluss der Thromboxansynthase kann durch Verwendung des Thromboxansynthase-Inhibitors CV-4151 und einem Vergleich der Proben mit und ohne TXAS-Inhibition bestimmt werden. Des Weiteren ist zu beachten, dass 12-HHT nicht nur enzymatisch sondern auch nicht-enzymatisch aus PGH_2 gebildet wird. Eine vollständige Hemmung der Synthese ist somit nicht möglich. Ebenfalls denkbar wäre eine Beeinflussung der Arachidonsäure-Freisetzung aus den Phospholipiden, entweder durch direkte Einwirkung auf die Phospholipide, eine Hemmung der Phospholipasen oder eine Blockade der Aktivierung der Phospholipasen [175].

4.2.2.2 Durchführung des 12-HHT-Assays

Für die Testung wird frisches Rinderblut benötigt, das durch Zugabe von Na_2 -EDTA (0,077 M) direkt nach der Entnahme vor der Gerinnung geschützt ist. Nach Verdünnung des Blutes mit PBS-Puffer - im Verhältnis 2,1:1 - wird zentrifugiert, um die Thrombozyten zu isolieren. Diese befinden sich nach der Zentrifugation im Überstand. Nach erneuter Zentrifugation befinden sich die Thrombozyten im Pellet, der Überstand wird verworfen. Es folgt die Zugabe von isotonischem Puffer. Die Probengefäße, in denen sich die in DMSO gelösten Testsubstanzen befinden, werden bei 37 °C im Wasserbad mit den Zellen präinkubiert. Nun werden Ca^{2+} -Ionen und das Ca-Ionophor A23187 zugegeben. Nach einer Minute erfolgt die Zugabe der Stopplösung. Dann werden die Proben zentrifugiert, der Überstand isoliert und mit Wasser verdünnt. Zur Vorreinigung der Proben werden RP_{18} -Säulen eingesetzt, als Elutionsmittel dient Methanol. Die Proben werden anschließend auf die HPLC aufgegeben. Als Fließmittel wird ein Gemisch aus Methanol (1540 ml), Wasser (460 ml), Na_2 -EDTA (460 mg) und Essigsäure (2 ml) (pH 5,5; eingestellt mit NH_3) eingesetzt. Die 12-HHT-Detektion erfolgt bei 232 nm [23, 175].

4.2.3 MDA-Assay

4.2.3.1 Prinzip des MDA-Assays

Dieser Assay wird nach einer Methode von Ledergerber und Hartmann [176], die von Dannhardt et al. [179] modifiziert wurde, im Arbeitskreis routinemäßig durchgeführt. Es werden Thrombozyten tierischen Ursprungs verwendet, die nur das COX-1-Isoenzym exprimieren. Malondialdehyd (MDA) entsteht als Metabolit im Verlauf der Arachidonsäure-Kaskade bei der Synthese von TXA₂ (siehe Abbildung 69). Unter sauren Bedingungen reagiert MDA mit Thiobarbitursäure zu einem roten Polymethinfarbstoff, der fluorometrisch detektiert werden kann. In Abbildung 70 ist die Aldolkondensationsreaktion von MDA mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure aufgeführt.

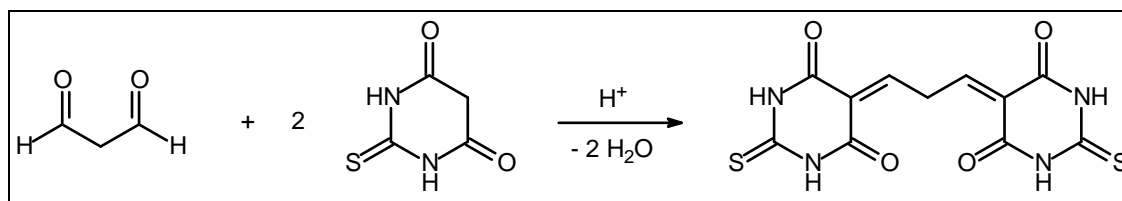


Abbildung 70: Aldolkondensation von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure

Zur Aktivierung der Phospholipase A₂ wird das Ca-Ionophor A23187 zugegeben. Um die Enzymreaktion nach der vorgegebenen Reaktionszeit zu stoppen, wird Trichloressigsäure-Lösung verwendet. Nach der Kopplung von MDA mit Thiobarbitursäure kann die Konzentration des entstandenen roten Farbstoffs fluorimetrisch bestimmt werden. Als Positiv-Kontrolle dient eine Probe mit reinem DMSO. Als Negativ-Kontrolle wird eine Probe zuerst mit Trichloressigsäure und danach mit Ca-Ionophor versetzt, somit ist eine COX-1-Aktivierung nicht mehr möglich. Die IC₅₀-Werte werden mit der Software ENZFIT berechnet [179].

Die Vorteile dieses modifizierten Testsystems liegen in den geringeren Kosten und dem niedrigeren Risiko bei der Verwendung von tierischen Zellen gegenüber humanem Blut sowie dem Einsatz des preiswerteren Ca-Ionophors gegenüber Collagen. Die Nachteile der Methode entsprechen den Nachteilen des 12-HHT-Assays. Eine verminderte MDA-Bildung ist nicht unbedingt auf eine Hemmung der Cyclooxygenase 1 zurückzuführen [179].

4.2.3.2 Durchführung des MDA-Assays

Für die Testung wird Schweineblut verwendet, das durch Zugabe von Na₂-EDTA (0,077 M) vor Gerinnung geschützt ist. Die Thrombozyten werden durch Zentrifugation isoliert und mit PBS-Puffer verdünnt, so dass eine Konzentration von $8 \cdot 10^8$ Zellen/ml vorliegt. Die Testsubstanzen werden in DMSO gelöst und in Konzentrationen von 10, 1 und 0.1 μ M eingesetzt. Zunächst werden die Testsubstanzen mit der Thrombozytensuspension im Wasserbad bei 37 °C für zehn Minuten präinkubiert. Durch Zugabe des Ca-Ionophors wird die Arachidonsäure-Kaskade aktiviert. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten bei 37 °C wird durch Zugabe der Trichloressigsäure-Lösung die Enzymreaktion gestoppt. Nach Zentrifugation wird der Überstand, der neben MDA auch 12-HHT und TXB₂ enthält, mit Thiobarbitursäure-Lösung versetzt. Die Proben werden anschließend für 30 Minuten bei 70 °C inkubiert. Es entsteht ein roter Polymethinfarbstoff, der nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur fluorimetrisch vermessen wird ($\lambda_{\text{Excitation}}$ 533 nm, $\lambda_{\text{Emission}}$ 550 nm) [179].

4.3 COX-2

4.3.1 Einführung

Die in Abschnitt 4.2.1 genannten Assays zur Untersuchung der pharmakologischen Wirksamkeit von Testsubstanzen können größtenteils nicht nur zur Bestimmung der COX-1- sondern auch der COX-2-Aktivität verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung eines Enzym-Immuno-Assays mit einem monoklonalen COX-2-Antikörper, der auf einer Mikrotiterplatte fixiert ist. Als Chromogen dient zum Beispiel Tetramethylbenzidin (TMB), wobei die gemessene Absorption direkt proportional zur COX-2-Konzentration ist [180, 181].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein humaner Vollblut-Assay eingesetzt, der auf der quantitativen Bestimmung von Prostaglandin E₂ via ELISA (engl. enzyme linked immuno sorbent assay) beruht.

4.3.2 Prinzip des Humanvollblutassays

Die Testung wird nach einer Arbeitsanweisung des Arbeitskreises durchgeführt [182]. Um eine COX-1-Aktivität ausschließen zu können, wird Acetylsalicylsäure zugesetzt. Zudem wird durch Zugabe des Thromboxansynthase-Hemmers (TSH) CV 4151 die Thromboxansynthase inhibiert. Zur Stimulation der COX-2-Aktivität wird Lipopolysaccharid (LPS) zugegeben. Neben den Proben, die Testsubstanzen in

unterschiedlichen Konzentrationen enthalten, werden eine Negativ-Kontrolle mit reinem Gentamicin-DBPS-Puffer, die nicht stimuliert wird, und eine Positiv-Kontrolle, die mit LPS stimuliert wird, verwendet. Als Referenzsubstanz dient Celecoxib. Nach Ablauf der Enzymreaktion wird die Konzentration von PGE₂ über ELISA bestimmt. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgt mit der Software ENZFIT.

4.3.3 Durchführung des Humanvollblutassays

Für die Testung werden je 50 ml Humanblut von zwei gesunden Spendern benötigt. Das Blut wird, zum Schutz vor Gerinnung, in Heparin-Monovetten abgefüllt. Blutentnahme und Testung müssen am selben Tag erfolgen.

Von jeder Testsubstanz wird eine Stammlösung in der Konzentration 10 mM hergestellt, hierbei sind die Substanzen in 1 ml Cremophor-EL/Ethanol gelöst. In Eppendorf-Caps werden je 900 µl Gentamicin-DBPS-Puffer vorgelegt und Verdünnungsreihen für die gewünschten Konzentrationen aus den Stammlösungen hergestellt. In weiteren Eppendorf-Caps werden je 800 µl Vollblut, 10 µl TSH-Lösung und 50 µl ASS-Lösung vorgelegt und je 100 µl Testsubstanz-Stammlösung bzw. 100 µl Gentamicin-DBPS-Puffer (als Negativ-Kontrolle) hinein pipettiert. Zusätzlich werden Proben ohne Testsubstanzen vorbereitet, die als Positiv-Kontrolle dienen. Die Caps werden für 15 Minuten offen im CO₂-Inkubator präinkubiert. Anschließend werden zu den Proben mit den Testsubstanzen je 50 µl LPS-Lösung hinzugegeben. In die Kontrollproben wird 50 µl Gentamicin-DBPS-Puffer pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen werden die Proben für fünf Stunden offen in den CO₂-Inkubator gestellt. Anschließend wird auf Eis gekühlt und in jedes Cap 1000 µl auf 4 °C gekühlter isotonischer DBPS-Puffer pipettiert. Es wird 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und 100 µl des Überstands entnommen [182].

Am darauffolgenden Tag wird zur Bestimmung der PGE₂-Konzentration ein PGE₂-ELISA-Kit eingesetzt. Die Durchführung erfolgt nach Vorschrift [183]. Auf der Mikrotiter-Platte befindet sich ein monoklonaler Antikörper gegen PGE₂, um dessen Bindung das PGE₂ der Proben und enzymmarkiertes PGE₂ konkurrieren. Bei dem Enzym handelt es sich um eine Alkalische Phosphatase, die das Substrat *p*-Nitrophenolphosphat zu der gelben Verbindung *p*-Nitrophenol spaltet. Anschließend wird die Platte bei einer Wellenlänge von 450 nm vermessen. Die Intensität der gelben Farbe ist umgekehrt proportional zu der PGE₂-Konzentration.

4.4 5-LOX

4.4.1 Einführung

Zur Bestimmung der 5-LOX-Aktivität stehen verschiedene Testsysteme zur Verfügung. Möglich ist beispielsweise die Messung des Hydroperoxidprodukts, das bei der Einwirkung der 5-LOX auf ein 1,4-Pentadiensystem entsteht [184]. Auch mit dem FOX-Assay (engl. ferrous oxidation-xylenol orange) kann die Aktivität von 5-LOX-Inhibitoren bestimmt werden. Dieses Testsystem basiert auf der Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} , wobei Fe^{3+} mit Xylenol-Orange einen stabilen farbigen Komplex bildet, der spektrophotometrisch vermessen werden kann [185]. Eine andere Methode beruht auf der Messung des O_2 -Verbrauchs der Enzymreaktion [186]. Die spektrophotometrische Messung des Metaboliten 5-HETE, der im Rahmen des Lipoxygenasewegs entsteht, dient ebenfalls der Bestimmung der 5-LOX-Aktivität [187]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Testsystem eingesetzt, das auf der spektrophotometrischen Messung von Leukotrien B_4 beruht.

4.4.2 Prinzip des LTB_4 -Assays

Die Testung erfolgt nach dem Arbeitsprotokoll aus der Dissertation von Lehr [175]. Die Aktivität der 5-LOX wird über die Konzentration des Leukotriens B_4 (LTB_4) bestimmt, das im Verlauf der Arachidonsäure-Kaskade entsteht. Nach einer RP-HPLC kann die Menge des Metaboliten mittels UV-Detektion bestimmt werden. Arachidonsäure wird im Lipoxygenaseweg der Arachidonsäure-Kaskade zu LTA_4 metabolisiert. LTA_4 kann unter anderem in LTC_4 und LTB_4 umgewandelt werden (siehe Abbildung 71).

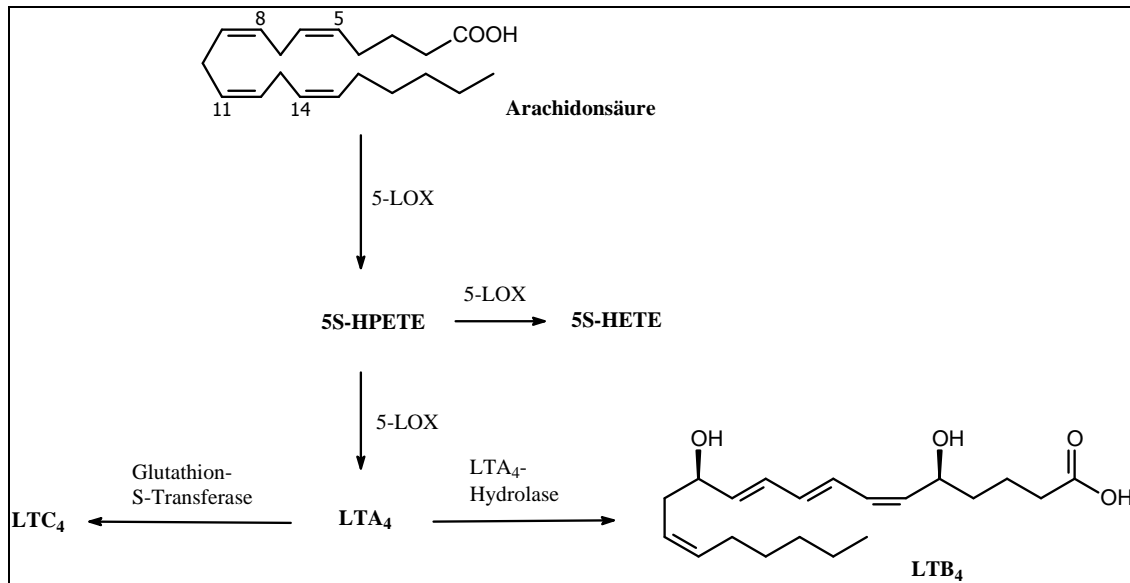


Abbildung 71: Synthese von LTB₄ als Teilschritt der Arachidonsäure-Kaskade

Für die Testung werden Rindergranulozyten verwendet. Zur Aktivierung der Phospholipasen und der 5-LOX ist eine erhöhte Ca²⁺-Konzentration notwendig, deshalb wird das Ca-Ionophor A23187 zugegeben. Voraussetzung für eine korrekte Ermittlung der Enzymhemmung ist ein linearer Anstieg der Konzentration der Enzymprodukte während der Inkubationsdauer. Die Produktbildung wird in An- und Abwesenheit der Testsubstanzen bestimmt. Die Hemmung der LOX ergibt sich aus dem Verhältnis der beiden Mittelwerte. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgt mit der Software ENZFIT.

Es ist zu beachten, dass eine Verringerung der LTB₄-Konzentration auch durch eine Beeinflussung der Arachidonsäure-Freisetzung aus den Phospholipiden oder eine Hemmung der LTA₄-Synthetase bzw. -Hydrolase zustande kommen kann. Die Hemmung der LTA₄-Enzyme kann als unwahrscheinlich angesehen werden, wenn die LTB₄- und 5-HETE-Konzentration annähernd gleich sind [175].

4.4.3 Durchführung des LTB₄-Assays

Für die Testung wird frisches Rinderblut verwendet, das durch Zugabe von Na₂-EDTA (0,077 M) direkt nach der Entnahme vor der Gerinnung geschützt ist. Die Isolierung der Granulozyten und die Durchführung der Enzymreaktion erfolgt nach einer Vorschrift von Walstra et al. [188]. Das Rinderblut wird zunächst mit PBS-Puffer - im Verhältnis 2,1:1 - versetzt. Anschließend wird zentrifugiert. Eine Abtrennung der Lympho- und Monozyten von den Granulozyten ist nun aufgrund des Ficoll-Gradienten möglich. Diese Methode basiert auf der Grundlage der geringeren Dichte von Mono- und Lymphocyten im Vergleich zu Erythro- und Granulozyten [189]. Die Erythro- und Leukozyten befinden sich aufgrund ihrer hohen Dichte im Pellet. Der Rückstand wird

mit Wasser sowie hypertonischem Puffer versetzt, dabei kommt es zu einer Lyse der Erythrocyten. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand verworfen und der Rückstand mit Puffer resuspendiert. Dieser Aufreinigungsschritt wird noch zweimal wiederholt. Die Granulozyten werden mit einer Zielkonzentration von $4 \cdot 10^7$ Zellen/ml in PBS-Puffer suspendiert.

Die Testsubstanzen werden in DMSO gelöst und in Reagenzgläsern vorgelegt. Die Konzentration beträgt $10 \mu\text{M}$, es wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Referenz dienen Proben mit reinem DMSO. Die Proben werden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad mit der Zellsuspension präinkubiert. Die Enzymreaktion wird nach Zugabe von Ca^{2+} - in Form von CaCl_2 - sowie dem Ca-Ionophor A23187 gestartet. Nach fünf Minuten wird die Synthese der Leukotriene durch eine Mischung aus Methanol, Acetonitril und dem Antioxidans NDGA gestoppt. Als interner Standard dient PGB_2 . Die Proben werden für 10 Minuten auf Eis gestellt, dann wird wieder zentrifugiert. Anschließend werden die enthaltenen Leukotriene mit RP_{18} -Extraktionssäulen isoliert [190]. Die Elution erfolgt nach Zugabe von Methanol. Auf ein Einengen der Lösung und die damit verbundene Wärmebelastung kann verzichtet werden, wenn man das Eluat vor der HPLC-Analyse mit der gleichen Menge Wasser verdünnt.

Am folgenden Tag wird die im Methanoeluat (3 ml) vorhandene Menge an LTB_4 nach HPLC-Trennung an RP_{18} -Material durch UV-Detektion bestimmt. Als Fließmittel dient eine Mischung aus 500 ml THF, 600 ml Methanol, 900 ml Wasser, 2 ml CH_3COOH und 900 mg Na-EDTA (pH 5,5). Die UV-Detektion erfolgt bei 270 nm.

4.5 TNF- α

4.5.1 Einführung

Der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) ist ein proinflammatorisches Cytokin, das vielfältige biologische Aufgaben besitzt. TNF- α ist unter anderem an Entzündungsprozessen und Immunreaktionen, Zellproliferation und Apoptose beteiligt. Die Bindung von TNF- α an die Rezeptoren TNF-R1 und -R2 führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κB , die für die Genexpression inflammatorisch wichtiger Substanzen verantwortlich sind [191]. Mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren ELISA-Testkits wird die inhibitorische Potenz der Testsubstanzen gegenüber TNF- α gemessen.

4.5.2 Prinzip des TNF- α -Assays

Die TNF- α -Konzentration wird nach einer Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen über ein ELISA-Kit bestimmt. Hierbei handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Auf der Mikrotiter-Platte ist ein Antikörper fixiert, an den das Antigen der Proben – in diesem Fall TNF- α – bindet. Es wird ein weiterer Antikörper zugegeben, an den ein Enzym gebunden ist. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, das sogenannte Sandwich. Nun wird ein chromogenes Substrat zugegeben, das vom Enzym zu einem Enzymprodukt umgesetzt wird. Dieses Produkt wird anschließend vermessen [192].

4.5.3 Durchführung des TNF- α -Assays

Für dieses Testsystem werden die Testsubstanzen in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Die Vorbereitung der Proben erfolgt analog zum humanen Vollblutassay zur Bestimmung der COX-2-Inhibition (siehe Kapitel 4.3). Bei der Inkubation der Zellsuspension mit den Testsubstanzen wird LPS zugegeben, um die TNF- α -Produktion anzuregen. Dann werden die Proben auf die Mikrotiter-Platte gegeben. Ein monoklonaler Antikörper gegen humanes TNF- α ist auf der Mikrotiter-Platte fixiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit mit den Testsubstanz-Lösungen wird der Überschuss abgewaschen und ein biotinylierter polyklonaler Antikörper gegen humanes TNF- α hinzugegeben. Der überschüssige Antikörper wird nach einer kurzen Inkubation abgewaschen und es wird Streptavidin zugegeben, das mit einer Merrettich-Peroxidase konjugiert ist. Dieses bindet an den biotinylierten humanen TNF- α -Antikörper. Nach Abwaschen des Überschusses wird das Substrat der Peroxidase, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), zugegeben. Die Enzymreaktion wird nach einer kurzen Inkubationszeit gestoppt und die Wells werden bei 450 nm vermessen. Die optische Dichte ist direkt proportional zur TNF- α -Konzentration [193].

4.6 Bestimmung der Cytotoxizität

4.6.1 Einführung

In vitro Untersuchungen zur Toxizität von Wirkstoffen sind bereits in frühen präklinischen Phasen der Arzneistoffentwicklung erforderlich. Die Bestimmung der Zellviabilität erfordert eine sensitive, quantitative und verlässliche Methode. Dies hat zu der Entwicklung einiger Standard-Assays geführt. So kann die Fähigkeit von Zellen, radioaktiv markierte Substanzen aufzunehmen (^3H -Thymidin) oder nach Lyse freizusetzen (^{15}Cr) genutzt werden. Die Tetrazoliumsalze XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) und MTT (3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) sind für die Quantifizierung der viablen Zellen in kolorimetrischen Assays geeignet [194]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der XTT-Assay verwendet [195]. Gegenüber MTT hat XTT den Vorteil, dass sich bei der Metabolisierung ein wasserlösliches Formazan bildet, das direkt photometrisch vermessen werden kann. Beim MTT-Assay ist ein zusätzlicher Schritt notwendig, um das entstandene Formazan in Lösung zu bringen. Somit verringert sich der Arbeitsaufwand bei gleichbleibender Sensitivität. Gegenüber Testsystemen mit radioaktiv markierten Substanzen liegen die Vorteile des XTT-Assays in einer Kostenersparnis und einem geringeren Risiko im Umgang mit den Reagenzien [196].

4.6.2 Prinzip des XTT-Viabilitätsassays

Das Testsystem basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalses XTT und der Bildung eines orangen Formazans durch metabolisch aktive Zellen (siehe Abbildung 72). Deshalb kann die Umwandlung nur durch viable Zellen erfolgen.

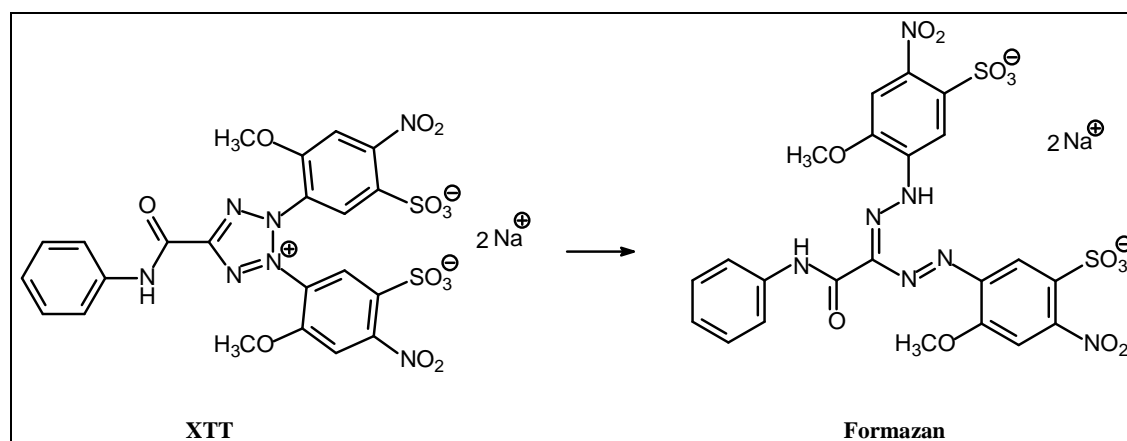


Abbildung 72: Metabolisierung von XTT zum Formazan [194]

Das entstehende Formazan ist wasserlöslich und kann direkt spektrophotometrisch vermessen werden. Eine hohe Anzahl lebender Zellen korreliert mit einer hohen Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen. Daraus resultiert wiederum eine große Menge Formazan [194]. Durch die Zugabe des Elektronen-Kupplungs-Reagenz PMS (*N*-Methylphenaziniummethylsulfat) wird die Elektronenübertragung auf XTT erleichtert.

4.6.3 Kultivierung von Mono Mac 6- Zellen (MM6)

Bei Mono Mac 6-Zellen handelt es sich um eine humane monocytische Zelllinie. Sie wurden 1985 aus dem peripheren Blut eines 64-jährigen Mannes entnommen, der an akuter myeloischer Leukämie (AML) FAB M5 litt [197]. Die Zellen wurden von Prof. Dr. Werz, Tübingen, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgt in 75 cm² Zellkulturflaschen in 40 ml Standardmedium für MM6 (siehe Kapitel 4.8.3). Die Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und zweimal wöchentlich passagiert. Nach sechs Monaten werden die Zellen verworfen und gegen kryokonservierte Zellen ausgetauscht.

Zellzählung:

Es werden eine Neubauer-Zählkammer und ein Coulter-CounterTM eingesetzt, um die Zellzahl vor der Passage zu bestimmen. Mit der Neubauer-Zählkammer ist eine Aussage über die Viabilität der Zellen möglich. Der Coulter-CounterTM kann nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden, vorteilhaft ist hier die deutlich schnellere Zellzählung.

1. Neubauer-Zählkammer

20 µl Zellsuspension und 20 µl Trypanblau werden in einem Eppendorf-Cap sorgfältig miteinander vermischt. Dann werden 20 µl der Suspension unter das Deckglas der Neubauer-Zählkammer pipettiert. Mit Hilfe des Mikroskops werden in den vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer die lebenden und toten Zellen gezählt. Die Anzahl der lebenden Zellen multipliziert mit dem Faktor 5000 ergibt die Zelldichte pro ml. Die Anzahl der lebenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen ist die Viabilität. Die Viabilität sollte bei mindestens 80% liegen.

2. Coulter CounterTM

200 µl Zellsuspension und 9,8 ml Isoton II werden in einem Zählgefäß vorsichtig miteinander vermischt. Der Coulter CounterTM zählt die Zellen in 0,5 ml dieser Suspension. Die Zelldichte ergibt sich durch Multiplikation mit dem Faktor 100.

Zellpassage:

Zweimal pro Woche werden zwei Zellkulturschalen der MM6-Zellen passagiert. Zunächst wird die Zellsuspension mit Hilfe einer Pipette vorsichtig durchgemischt. Dann erfolgt die Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer oder dem Coulter CounterTM. Etwa $8 \cdot 10^6$ Zellen werden in eine neue Zellkulturflasche gefüllt und mit Standardmedium auf 40 ml aufgefüllt.

4.6.4 Durchführung des XTT-Viabilitätsassays

Alle Testsubstanzen werden in zwei Konzentrationen (100 μM und 10 μM) auf ihr cytotoxisches Potential getestet. Als Lösungsmittel dient DMSO. Zur Bestimmung der Blindwerte wird reines DMSO verwendet. Bei der verwendeten Zelllinie handelte es sich um MM6-Zellen.

Zunächst wird die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau bestimmt. Es wird eine definierte Menge Zellsuspension entnommen, die $1,88 \cdot 10^7$ Zellen enthält. Aus den Testsubstanz-Stammlösungen werden Verdünnungen (1:400) mit der Zellsuspension hergestellt. Je 2,5 μl Testsubstanz-Stammlösung und 1000 μl Zellsuspension werden in ein Cap pipettiert. Nach vorsichtigem Homogenisieren werden aus jedem Cap 100 μl in ein Well auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Jede Substanz wird pro Konzentration achtmal vermessen, die DMSO-Blindwerte werden sechszehnmals bestimmt. Die Platte wird für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wird eine Mischung aus 100 μl Elektronenkupplungs-Reagenz und 5 ml XTT hergestellt und jeweils 50 μl pro Well auf die Platte pipettiert. Um unverfälschte Messergebnisse zu gewährleisten, wird vorsichtig homogenisiert und es werden sämtliche Blasen auf der Platte mit einer Kanüle zerstoßen. Die erste Messung der Absorption bei 450 nm im ELISA Reader erfolgt direkt im Anschluss. Danach wird die Platte zurück in den Brutschrank gestellt und alle 30 Minuten für zwei Stunden vermessen. Der Wert nach 90 Minuten ist hinsichtlich der Zellviabilität entscheidend [194].

4.7 Log P-Wert-Bestimmung

4.7.1 Bedeutung des Verteilungskoeffizienten log P

Die Penetration einer Substanz in die Haut ist sowohl vom Aufbau der Haut als auch von den physikochemischen Eigenschaften des Moleküls abhängig. Dabei spielt neben dem Molekulargewicht und der Ladung auch die Lipophilie der Verbindung eine entscheidende Rolle. Als Maß für die Lipophilie von Substanzen dient der log P-Wert [104].

Der Verteilungskoeffizient P ist definiert als das Verhältnis der Konzentration einer gelösten Substanz in einem Zwei-Phasen-System von zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln. Man geht in der Regel von einem Octanol/Wasser-Gemisch aus. P ist dimensionslos und wird als \log_{10} angegeben [198]. Von Fujita et al. wurde der Verteilungskoeffizient erstmals als Modell für die biologische Verteilung von Substanzen vorgeschlagen [199]. Mit Hilfe des log P-Werts kann eine Aussage über die

Lipophilie von Substanzen getroffen werden. Dies ist ein wichtiger Parameter für Struktur-Reaktivitäts- und Struktur-ADME-Beziehungen (Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion) [200].

Der log P-Wert kann mit verschiedenen experimentellen Methoden bestimmt werden. Die Shake Flask-Methode ist zeitaufwändig und nur für Substanzen mit einem log P zwischen -3 und 4 geeignet. Des Weiteren kann der log P-Wert potentiometrisch bestimmt werden. Eine vielversprechende Alternative stellt die RP-HPLC-Methode dar, da sie weniger zeitintensiv ist und sich log P-Werte zwischen 0 und 6 bestimmen lassen. Zudem ist sie weniger empfindlich gegenüber Verunreinigungen [200, 201].

4.7.2 Rechnerische Bestimmung der log P-Werte

Der Verteilungskoeffizient kann nicht nur experimentell sondern auch rechnerisch mit Hilfe verschiedener Programme näherungsweise ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die log P-Werte mit ChemDraw Ultra 9.0 (Firma CambridgeSoft[®]) berechnet.

Die Kalkulationen beruhen auf der Zerlegung des Moleküls in geeignete Fragmente, für die bereits log P-Werte bekannt sind. Durch Aufsummierung dieser Werte unter Einrechnung von Korrekturtermen zur Berücksichtigung intramolekularer Wechselwirkungen erhält man eine Voraussage über den log P-Wert. Die Zuverlässigkeit der berechneten Werte nimmt mit steigender Komplexität der Moleküle ab [190].

Mit ChemDraw kann der log P-Wert über zwei verschiedene Methoden ermittelt werden.

1. Zur Berechnung des log(p)-Werts gibt es drei Fragmentierungsmethoden. Die Auswahl der verwendeten Methode ist von der atomaren Zusammensetzung des Moleküls abhängig. Für die Testsubstanzen dieser Arbeit wurde Methode 1 eingesetzt: Diese basiert auf 94 atomaren Beiträgen, die mithilfe einer Analyse nach der Methode der kleinsten Quadrate aus 830 Molekülen ausgewertet werden. Die Standardabweichung beträgt 0,47 log(p) Einheiten und es können Moleküle bearbeitet werden, die Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Halogene enthalten [202].
2. Die Berechnung des CLogP-Werts wird mit dem Programm CLogP 4.0 (Firma BioByte Corporation) durchgeführt. Das Programm zerlegt die Struktur in chemisch-sinnvolle Fragmente. Anschließend werden, abhängig vom Bindungstyp der Fragmente, Datenbanken durchsucht. Dann werden die Werte aller Fragmente zusammengefügt und bestimmte Korrekturterme einberechnet, die die Interaktionen zwischen den Fragmenten berücksichtigen [203].

4.7.3 Ermittlung der log P-Werte über HPLC

4.7.3.1 Theoretische Einführung

Mit der HPLC-Methode können log P-Werte bestimmt werden, die sich in der Größenordnung 0-6 befinden. Die Substanzen werden in einem geeigneten Fließmittel gelöst und auf eine RP-HPLC aufgegeben. Sie verteilen sich auf der Säule zwischen der hydrophilen mobilen und der unpolaren stationären Phase. Die Elution von der Säule erfolgt anhand des hydrophoben Charakters der Substanzen, wobei hydrophile Substanzen schnell eluieren. Deshalb kann eine Beziehung zwischen der Retentionszeit und dem Verteilungskoeffizienten der Substanzen aufgestellt werden. Der Verteilungskoeffizient leitet sich aus dem Kapazitätsfaktor k ab, dieser wird mit folgender Formel berechnet.

Formel 4: Berechnung des Kapazitätsfaktors

$$k = (t_r - t_0) / t_0$$

k : Kapazitätsfaktor, t_r : Retentionszeit Substanz, t_0 : Totzeit

Unter einer Totzeit versteht man die Retentionszeit, die eine Substanz benötigt, um die Säule ohne jegliche Wechselwirkungen zu passieren. Für die Bestimmung verwendet man üblicherweise Thioharnstoff oder Formamid.

Um die ermittelten Messergebnisse mit den log P-Werten korrelieren zu können, wird eine Regressionsgerade mit mehreren Referenzsubstanzen erstellt. Die Referenzsubstanzen sollten strukturell den zu vermessenden Substanzen ähneln. Es ist darauf zu achten, dass mindestens zwei der Referenzsubstanzen einen niedrigeren und einen höheren log P-Wert aufweisen als die Testsubstanzen. Dazu ist eine vorherige rechnerische Ermittlung der log P-Werte der Testsubstanzen nötig. Nach der Messung der Retentionszeiten wird der Kapazitätsfaktor mit Hilfe der oben genannten Formel berechnet. Anschließend wird der Logarithmus des Kapazitätsfaktors ermittelt und gegen die log P-Werte der Referenzsubstanzen, die in den OECD-Guidelines [198] zu finden sind, aufgetragen. Nach Durchführung einer Regressionsrechnung wird eine Regressionsgerade mit Geradengleichung erhalten. In diese Gleichung können die $\log(k)$ -Werte der Testsubstanzen eingesetzt und die log P-Werte erhalten werden [190].

4.7.3.2 Durchführung der HPLC-Messung

Die Bestimmung der log P-Werte erfolgt über eine RP-HPLC-Anlage mit Festwellendetektor. Die Auswertung der Chromatogramme wird mit der Software Borwin (Firma Jasco) durchgeführt. Diese Methode basiert auf den OECD-Guidelines [198].

HPLC-Parameter:

Probenkonzentration	ca. 500 µg/ml
Flussrate	0,5 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Trennsäule	RP C18 Nucleosil, 250x4,6 mm, Partikelgröße 5 µm
Detektorwellenlänge	254 nm

Folgende Referenzsubstanzen werden zur Erstellung der Regressionsgeraden eingesetzt:

Tabelle 7: Referenzsubstanzen [198]

Referenzsubstanz	log P
Phenol	1,5
Benzoessäure	1,9
Napht-2-ol	2,7
Diphenylamin	3,4
Biphenyl	4,0
Phenanthren	4,5

Fließmittel:

Es ist zu beachten, dass saure oder basische Substanzen in ihrer nicht-ionischen Form gemessen werden. Deshalb wird bei der Messung der sauren Imidazothiazole ein essigsäurehaltiges Fließmittel verwendet, so dass der pH des Fließmittels bei 4 liegt. Zur Ermittlung der log P-Werte der freien Säuren AK D19, 20, 21, 22, 23 und 24 wird als Fließmittel H₂O/Methanol (1:1) + 10% CH₃COOH eingesetzt; zur log P-Wert-

Bestimmung der Chalone AK D31, 32, 33 und 34 sowie des Esters AK D14 wird eine Mischung aus H₂O/Acetonitril (1:2) verwendet.

Die Test- und Referenzsubstanzen werden in 1 ml des Fließmittels gelöst. Die Totzeitbestimmung t_0 erfolgt mit Thioharnstoff.

4.8 Materialien und Geräte

4.8.1 Geräte

Analysenwaage	PB 210 D (Sartorius AG, Göttingen, D)
Autoklav	SANOclav (Firma Adolf Wolf, Bad Überkingen-Hausen, D)
Brutschränke	Heraeus BB15 (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, D)
Computer	Dimension 4600 mit Pentium 4, Prozessor 3,2 GHz (Dell GmbH, Frankfurt a. M., D)
Coulter-Counter [®]	Z 2TM (Beckmann, München, D)
HPLC-Anlage:	
Pumpen	Waters 510
UV-Detektor	Waters 484
PDA-Detektor	Waters PDA 996
Autosampler	Waters 717 plus
Extraktionssäulen RP 18	Octadecyl C 18 500 mg; Baker
HPLC-Säule	Nucleosil 7 C 18, ESF
EDV	Millenium, 2.15
Kühl-/Gefrierkombination	KGK 3955-23 (Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, D)
Laminar-Flow-Box	L12, Gaz-vidé (Firma Jouan, Unterhaching, D)
Mikroskop	DMIRB mit Digitalkamera DC 200 (Firma Leica, Bensheim, D)
Mikrotiterplatten-Photometer	Spectrafluor Plus (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D)
Mikrotiterplatten-Schüttler	Titramax 100 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D)
Monitor	Flatron L1950SQ (LG Electronics Deutschland GmbH, Willich, D)
Neubauer-Zählkammer	VWR GmbH, Darmstadt

Reagenzglasschüttler	Reax 2000 (Heidolph Instruments GmbH und Co.KG, Schwabach, D)
Reinstwasseranlage	Direct-Q (Millipore GmbH, Schwalbach, D)
Spektralfluorimeter	Hitachi F-200
Trockenschrank	EU 170 (Firma Jouan, Unterhaching, D)
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 514 BH (Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin, D)
UV-Meter	Typ No. 37, Dr. Höhle, Planegg
Wasserbad	Certomat WR (Firma Braun, Melsung, D)
Zählhilfe	VWR GmbH, Darmstadt
Zentrifugen	C 12 (Firma Jouan, Unterhaching, D) Centrifuge 5155R (Eppendorf AG, Hamburg, D) Heraeus Omnifuge 2.0 RS (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, D)

4.8.2 Materialien

Aluminiumfolie, extra stark	VWR International, Darmstadt, D
Autoklavierbeutel	VWR International, Darmstadt, D
Bechergläser	VWR International, Darmstadt, D
Caps	Eppendorf AG, Hamburg, D
Einmalpipetten	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D 10 ml: Art.Nr. 607180 25 ml: Art.Nr. 760180 50 ml: Art.Nr. 768180
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mikrotiterplatte (96 well)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D Art.Nr. 655180
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, D
Multipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, D

Nalgene [®] Cryobox TM	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Nalgene [®] Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Pipetten	(10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) Eppendorf AG, Hamburg, D)
Pipettenspitzen	(10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) Eppendorf AG, Hamburg, D)
<u>Testkits</u>	
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, D Art.Nr. 11 465 015 001
Prostaglandin E ₂ Enzyme Immunoassay Kit	Assay Designs, Inc., Ann Arbor, USA Art.Nr. 900.001
Human TNF-α Enzyme Immunometric Assay Kit	Assay Designs, Inc., Ann Arbor, USA Art.Nr. 900-099
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D Art.Nr. 353136
Zentrifugenröhrchen	Glas: Schott Glas, Mainz, D Kunststoff 15 ml: Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D; Art,Nr. 188271 Kunststoff 50 ml: Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D; Art,Nr. 227261

4.8.3 Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien

Acetonitril LiChroVosolv [®]	Merck KgaA, Darmstadt, D Art.Nr. 1.00030.1000
Acetylsalicylsäure	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. 01459
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt, D Art.Nr. 1.02382.1000

Ca-Ionophor A23187	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. 21045
Cremonphor-EL	BASF, Ludwigshafen, D Art.Nr. 27963
DMSO	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. 41639 Merck KgaA, Darmstadt, D Art.Nr. 1.02931.0500
DPBS-Puffer	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. D5652
Ethanol LiChrosolv [®]	Merck KgaA, Darmstadt, D Art.Nr. 1.11727.1000
FCS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D Art.Nr. A11-151
Gentamicin	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, D Art.Nr. 5245
Humanblut	freiwillige, gesunde Spender
Isoton II-Lösung	Firma Beckmann Coulter, Krefeld, D Art.Nr. 8546719
L-Glutamin-Lösung	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. G7513
MEM non-essentiell AAS	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. M7145
Methanol LiChrosolv [®]	Merck KgaA, Darmstadt, D Art.Nr. 1.06018.1000
NaCl	Merck KgaA, Darmstadt, D Art.Nr. 1.06404.1000

Na ₂ EDTA	Merck KgaA, Darmstadt, D Art.Nr. 1.08418.0250
NDGA	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. 74540
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt, D Art.Nr. 1.05833.1000
MM6-Zellen	Hr. PD Dr. Werz, Universität Tübingen, D
OPI Media Supplement	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. O5003
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D Art.Nr. P11-010
Rinderblut	Metzgerei Zimmermann, Bauschheim, D
RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D Art.Nr. E15-840
RPMI-1640 Medium ohne Phenolrot	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D Art.Nr. E15-848
Schweineblut	Schlachthof Nieder-Olm, D
THF LiChrosolv [®]	Merck KgaA, Darmstadt, D Art.Nr. 1.08101.1000
TNF- α	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. T6674 Biotrend GmbH, Köln, D Art.Nr. CYT-223-10
Trichloressigsäure	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. 91228
Trypanblau-Lösung	Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D Art.Nr. T8154

Trypsin-EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D Art.Nr. L11-004	
<u>ASS-Lösung</u>	ASS	2,0 mg
	Gentamicin / DBPS-Lsg.	ad 10,0 ml
<u>Calciumchlorid-Lösung</u>	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,147 g
	NaCl	0,800 g
	dest. H ₂ O	ad 100 ml
<u>Calcium-Ionophor-Lösung</u>		
Stammlösung	4,2 mg/ml in DMSO (8,02 nM)	
Simulationslösung	8,6 µl Stammlösung + 891,4 µl Phosphatpuffer pH 7,4 (5 µM Calcium-Ionophor im Ansatz)	
<u>Chremophor-EL / Ethanol-Lösung</u>	Chremophor-EL (BASF)	116,9 g
	Ethanol 99 %	50,0 g
<u>DPBS-Puffer</u>	KH ₂ PO ₄	0,10 g
	Na ₂ HPO ₄	0,575 g
	KCl	0,10 g
	NaCl	4,0 g
	D-Glucose	0,5 g
	dest. H ₂ O	ad 500 ml
<u>Gentamicin / DPBS-Lösung</u>	Gentamicin-Sulfat	12,5 mg
	DPBS-Puffer	ad 50 ml

<u>isotonische PBS-Lösung</u>	NaCl	8,00 g
	KCl	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,39 g
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,20 g
	dest. H ₂ O	ad 1000 ml
<u>LPS-Lösung</u>	LPS	1,0 mg
	Gentamicin / DPBS-Lsg.	ad 5,0 ml
<u>Kulturmedium für MM6-Zellen</u>	500 ml	RPMI-1640 mit L-Glutamin
	55 ml	FCS
	10 ml	Aqua dest.
	5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung
	5 ml	MEM nicht-essentielle Aminosäuren
	5 ml	OPI Media Supplement (Pyruvat, Rinderinsulin, Oxalacetat)
<u>Na₂EDTA-Lösung (0,077 M)</u>	Na ₂ EDTA	2,87 g
	NaCl	0,21 g
	dest. H ₂ O	ad 100 ml
<u>Phosphatpuffer pH 7,4</u>	KH ₂ PO ₄	1,36 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	17,91 g
	dest. H ₂ O	ad 1000 ml

<u>Trichloressigsäure-Lösung</u>	Trichloressigsäure	10,0 g
	HCl 0,6 M	40,0 g
<u>Thiobarbitursäure-Lösung</u>	Thiobarbitursäure	0,532 g
	Phosphatpuffer pH 7,4	ad 100 ml
<u>Thromboxan-Synthase-Hemmstoff (TSH) CV-4151-Lösung</u>		
Stammlösung	TSH	1,4 mg
	Chremophor-EL / Ethanol-Lsg.	ad 5,0 ml
Testlösung	Stammlösung	0,5 ml
	Gentamicin / DPBS-Lsg.	ad 5,0 ml

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Überblick

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der pharmakologischen Testungen - geordnet nach Substanzklassen - aufgeführt und in Bezug zu anderen antiinflammatorischen Wirkstoffen diskutiert. Die Ergebnisse der COX-1-, COX-2-, 5-LOX- und TNF- α -Testungen werden als prozentuale Hemmung der Enzyme sowie, soweit möglich, als IC₅₀-Werte angegeben. Der IC₅₀-Wert (engl. inhibitory concentration) ist definiert als die Konzentration der Substanz, bei der eine halbmaximale Hemmung des Enzyms erreicht ist [204]. Als Referenzsubstanz für die Imidazothiazole dient Licofelon, dessen IC₅₀-Werte in Abschnitt 5.2.7.2 (Tabelle 21) den Testergebnissen der Imidazothiazole gegenübergestellt sind. Für die Chalone wurden als Referenzsubstanzen der Naturstoff Licochalcon A sowie das Z11-Derivat D4 ausgewählt (siehe Abschnitt 5.3.7.2, Tabelle 31).

5.2 Testergebnisse und Diskussion der Imidazothiazole

5.2.1 Ergebnisse der COX-1-Assays

5.2.1.1 Überblick

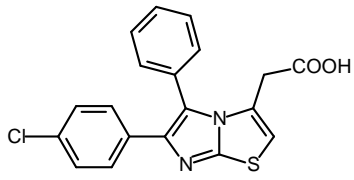
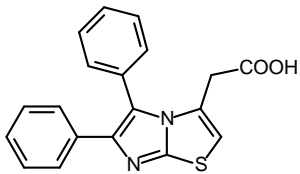
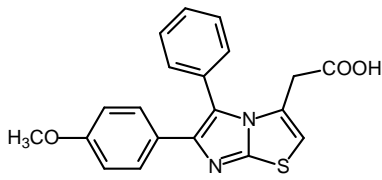
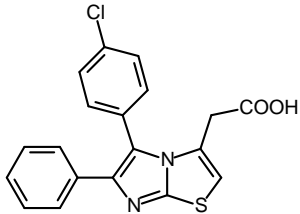
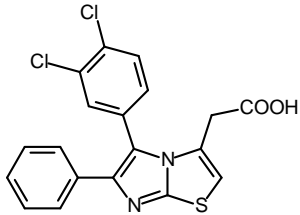
Zur Bestimmung der COX-1-Inhibition der synthetisierten Testsubstanzen wurden zwei Testsysteme eingesetzt und miteinander verglichen: Der 12-HHT- und der MDA-Assay. Alle Imidazothiazole wurden im 12-HHT-Assay auf ihre Wirksamkeit getestet. Der MDA-Assay wurde nur mit einer Testsubstanz aus der Gruppe der Imidazothiazole durchgeführt.

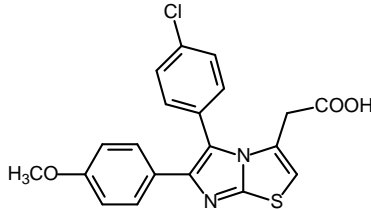
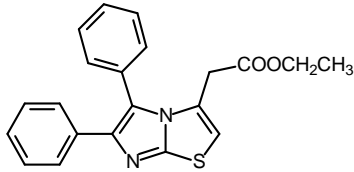
5.2.1.2 Testergebnisse des 12-HHT-Assays

Die biologische Aktivität der Testverbindungen gegenüber der Cyclooxygenase 1 wurde durch UV-Detektion von 12-HHT, einem Metaboliten, der im Verlauf der Arachidonsäurekaskade bei der Synthese von Thromboxan A₂ entsteht, bestimmt. Hierfür wurden Rinderthrombozyten mit den Testsubstanzen in den Konzentrationen 10 und 1 μ M inkubiert. Erwiesen sich die Testsubstanzen als potent, wurde die Testung mit niedrigeren Konzentrationen wiederholt.

Neben den sechs Imidazothiazolen AK D19 bis AK D24 wurde auch der Ester AK D14 auf seine inhibitorische Wirksamkeit untersucht. Bei AK D14 handelt es sich um die Ethylester-Variante von AK D20. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Testung zusammengefasst.

Tabelle 8: Ergebnisse der 12-HHT-Testung der Imidazothiazole

Struktur	Bezeichnung	Konzentration [μ M]	Hemmung [%]	
	AK D19	10	74	71
		1	12	18
		0,1	0	n.t.
	AK D20	10	100	100
		1	48	61
		0,1	25	24
	AK D21	10	100	100
		1	79	84
		0,1	46	51
		0,01	5	12
	AK D22	10	100	100
		1	81	86
		0,1	52	44
		0,01	31	24
	AK D23	10	35	
		1	2	

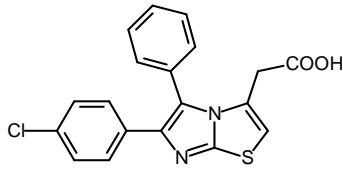
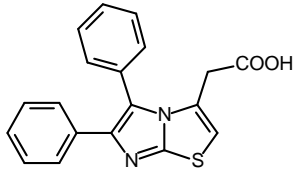
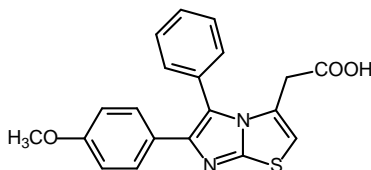
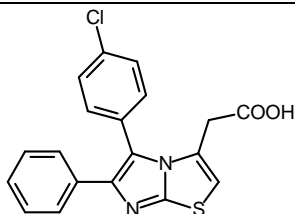
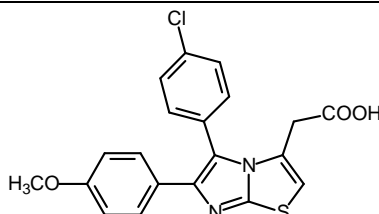
Struktur	Bezeichnung	Konzentration [μM]	Hemmung [%]
	AK D24	10	100
		1	85
		0,1	56
		0,01	16
		0,001	0
	AK D14	10	41
		1	4
		0,1	n.t

n.t. = not tested

Alle Imidazothiazole zeigen eine inhibitorische Aktivität. Bei AK D19, AK D20, AK D21, AK D22 und AK D24 ist die Hemmung deutlich. AK D23 und AK D14 weisen eine moderate Hemmung der Cyclooxygenase 1 auf.

Mittels der in Tabelle 8 aufgeführten Testergebnisse wurden mit Hilfe des Programms ENZFIT die IC_{50} -Werte der Testverbindungen berechnet. Eine Berechnung des IC_{50} -Werts kann nur erfolgen, wenn die prozentuale Hemmung bei mindestens einer der getesteten Konzentration über 50% liegt. Folglich konnten für AK D23 und AK D14 keine IC_{50} -Werte bestimmt werden. In Tabelle 9 sind die ermittelten Werte mit Standardabweichungen angegeben.

Tabelle 9: IC₅₀-Werte der Imidazothiazole (COX-1)

Struktur	Bezeichnung	IC ₅₀
	AK D19	6880 nM ± 80 nM (n = 2)
	AK D20	708 nM ± 178 nM (n = 2)
	AK D21	119 nM ± 19 nM (n = 2)
	AK D22	93 nM ± 17 nM (n = 2)
	AK D24	78 nM (n = 1)

n = Anzahl der Testungen

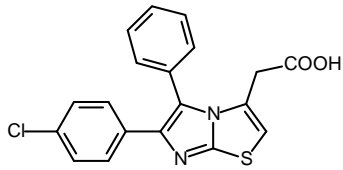
AK D24 erweist sich mit einem IC₅₀-Wert von 78 nM als potenteste Substanz aus der Reihe der Imidazothiazole. Die Testung sollte jedoch noch ein zweites Mal durchgeführt werden, um die Aussagekraft des Ergebnisses zu erhöhen. Am wenigsten wirksam ist AK D23, das in einer Konzentration von 10 µM die Cyclooxygenase 1 zu 35% hemmt. Des Weiteren fällt auf, dass der Ester AK D14 mit einer Hemmung von 41% bei 10 µM viel schwächer wirksam ist als die analoge freie Säure AK D20 mit einem IC₅₀-Wert von 708 nm. Im Vergleich mit der Leitstruktur AK D19 zeigen alle Imidazothiazole außer AK D23 eine verbesserte Wirksamkeit im nanomolaren Bereich.

5.2.1.3 Testergebnis des MDA-Assays

Um die Aussagekraft der Testergebnisse des 12-HHT-Assays zu bestätigen, wurde der MDA-Assay - mit jeweils einer Testverbindung aus der Gruppe der Imidazothiazole und der Chalcone - durchgeführt. Als Vertreter der Imidazothiazole wurde die Leitsubstanz AK D19 ausgewählt.

Bei diesem Testsystem wurde die inhibitorische Potenz der Substanzen über eine spektrofluorometrische Messung des Konjugationsprodukts von MDA und Thiobarbitursäure bestimmt. MDA entsteht bei der Synthese von Thromboxan A₂ als Nebenprodukt. Die Substanz wurde in Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 µM mit Schweinethrombozyten inkubiert. Das Ergebnis der Testung ist in Tabelle 10 aufgeführt, zum Vergleich ist das Ergebnis des 12-HHT-Assays gegenübergestellt.

Tabelle 10: Testergebnis des MDA-Assays des Imidazothiazols AK D19

Struktur	Bezeichnung	MDA-Assay	12-HHT-Assay
		IC ₅₀	IC ₅₀
	AK D19	5,2 µM (n = 1)	6,88 µM ± 0,08 µM (n = 2)

n = Anzahl der Messungen

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Testungen von AK D19 miteinander wird deutlich, dass die IC₅₀-Werte um 1,6 µM - das heißt um einen Faktor von 1,3 - voneinander abweichen. Die Werte liegen jedoch beide in einem ähnlichen, niedrigen mikromolaren Bereich. Auch die Testergebnisse des MDA- und 12-HHT-Assays der Referenzsubstanzen Indometacin und Diclofenac, die in Tabelle 11 aufgeführt sind, unterscheiden sich in einem ähnlichen Maße voneinander. Es fällt auf, dass die IC₅₀-Werte des MDA-Assays sowohl bei der Testsubstanz AK D19 als auch bei den Referenzsubstanzen niedriger sind als die Ergebnisse des 12-HHT-Assays. Abweichungen, die unter dem Faktor 10 liegen, können jedoch vernachlässigt werden [205], da die IC₅₀-Werte der Testverbindungen nicht absolut betrachtet, sondern mit den Werten der Referenzsubstanzen verglichen werden.

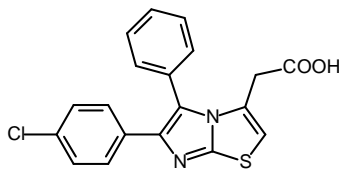
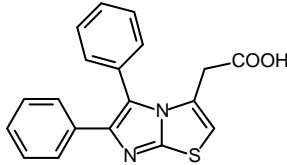
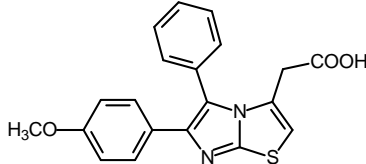
Tabelle 11: Vergleich der Testergebnisse des MDA- und 12-HHT-Assays von zwei Referenzsubstanzen

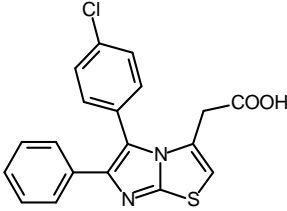
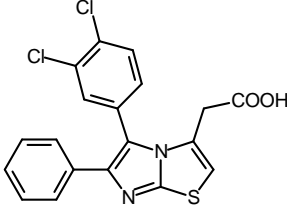
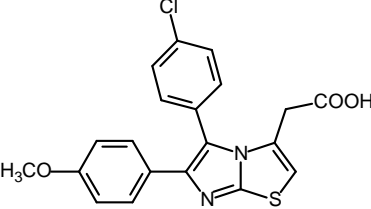
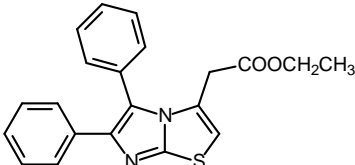
Bezeichnung	MDA-Assay	12-HHT-Assay
	IC ₅₀	IC ₅₀
Indometacin	4,0 nM	4,1 nM
Diclofenac	1,2 nM	2,8 nM

5.2.2 Ergebnisse des COX-2-Assays

Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Testsubstanzen gegenüber der Cyclooxygenase 2 wurde ein humaner Vollblut-Assay durchgeführt. Die COX-2-Aktivität wurde durch Zugabe von LPS stimuliert und nach Ablauf der Enzymreaktion die PGE₂-Konzentration via ELISA bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Celecoxib, bei dessen Testung sich ein IC₅₀-Wert von 140 nM ergab. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Testung aufgeführt.

Tabelle 12: Testergebnisse des COX-2-Assays der Imidazothiazole

Struktur	Bezeichnung	Konzentration [μM]	Hemmung [%]
	AK D19	10	k.A.
		1	k.A.
	AK D20	10	k.A.
		1	k.A.
		0,1	k.A.
	AK D21	10	k.A.

Struktur	Bezeichnung	Konzentration [μM]	Hemmung [%]	
	AK D22	10	26	26
		1	0	0
	AK D23	10	k.A.	
	AK D24	10	51	
		1	0	
	AK D14	10	24	

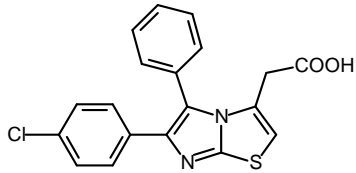
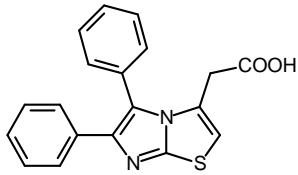
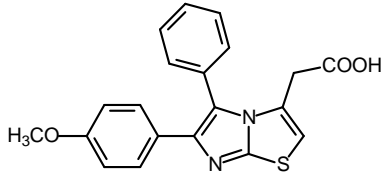
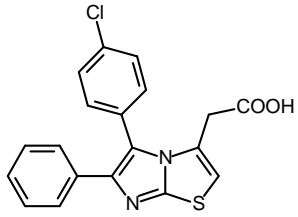
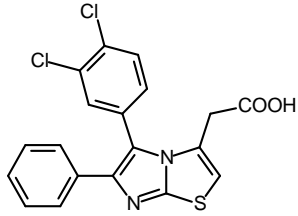
k.A. = keine Aktivität

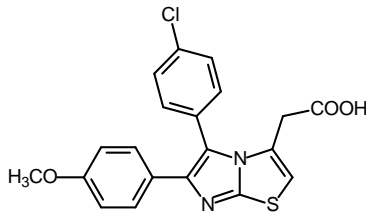
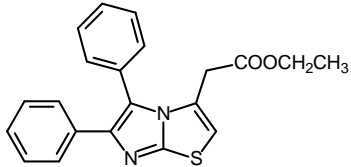
AK D24 zeigt eine moderate Hemmung der Cyclooxygenase 2. AK D22 und AK D14 weisen eine sehr geringe COX-2-Hemmung auf. Die übrigen Imidazothiazole hemmen die Cyclooxygenase 2 nicht. Eine Berechnung der IC_{50} -Werte ist hier nicht möglich.

5.2.3 Ergebnisse des 5-LOX-Assays

Zur Bestimmung der 5-LOX-Inhibition der Testsubstanzen wurde die LTB₄-Konzentration von Rindergranulozyten nach Inkubation mit den Testverbindungen mittels UV-Detektion bestimmt. Alle Testsubstanzen wurden in einer Konzentration von 10 μM getestet. Bei einer signifikanten Aktivität wurde die Testung mit einer weiteren Konzentration wiederholt.

Tabelle 13: Testergebnisse des 5-LOX-Assays der Imidazothiazole

Struktur	Bezeichnung	Konzentration [μM]	Hemmung [%]
	AK D19	10	k.A.
	AK D20	10 3,3	28 0
	AK D21	10	k.A.
	AK D22	10	14
	AK D23	10	k.A.

Struktur	Bezeichnung	Konzentration [μM]	Hemmung [%]
	AK D24	10	k.A.
	AK D14	10	k.A.

Es ist zu beachten, dass ein Testergebnis erst dann als signifikant angesehen werden kann, wenn die Hemmung mindestens 15% beträgt [175]. Eine inhibitorische Aktivität gegenüber der 5-Lipoxygenase zeigen AK D20 (28% bei 10 μM) und AK D22 (14% bei 10 μM), wobei die Hemmung durch AK D20 sehr gering und durch AK D22 nicht signifikant ist. Eine Berechnung der IC_{50} -Werte ist hier nicht möglich.

5.2.4 Ergebnis des TNF- α -Assays

Über einen Sandwich-ELISA wurde die inhibitorische Potenz der Testsubstanzen gegenüber TNF- α bestimmt. Die Substanzen wurden in Konzentrationen von 10 μM eingesetzt. Als Enzymquelle diente humanes Vollblut. Die Testung wurde zunächst als Vorscreening mit je einer Testverbindung pro Substanzgruppe durchgeführt. Als Vertreter der Imidazothiazole wurde AK D20 getestet. Eine Hemmung von TNF- α durch AK D20 in einer Konzentration von 10 μM ist nicht festzustellen.

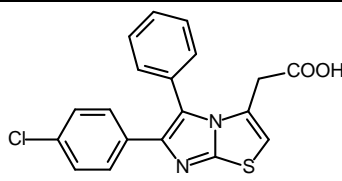
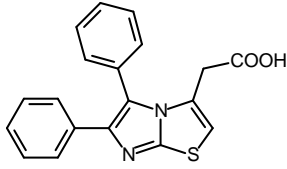
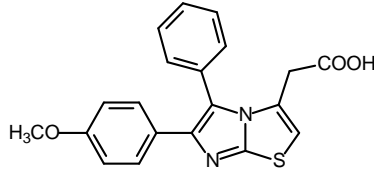
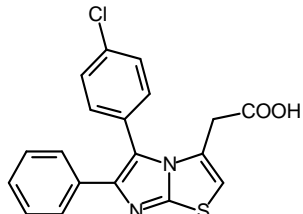
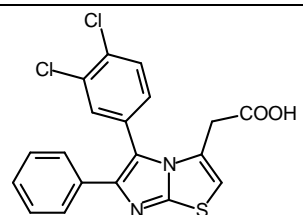
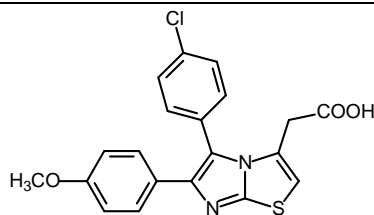
5.2.5 Ergebnisse des XTT-Assays

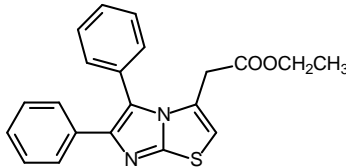
Die Cytotoxizität der Testsubstanzen wurde mithilfe des XTT-Viabilitätsassays an MM6-Zellen bestimmt. Hierbei wurde die Absorption des Formazans gemessen, das sich bei der Inkubation von XTT mit metabolisch aktiven Zellen unter Einwirkung der Testverbindungen bildet. Die Messungen erfolgten nach Zugabe des Reagenz alle 30 Minuten mit einer Gesamtdauer von 120 Minuten. Alle Substanzen wurden in den Konzentrationen 100 und 10 μM getestet. Als Referenz dienten Proben mit reinem DMSO, die Zellviabilität wurde hier auf 100% festgesetzt.

Ausschlaggebend für die Einstufung des cytotoxischen Potentials ist die Viabilität der Zellen nach 90 Minuten. Eine Verbindung wird als toxisch betrachtet, wenn die

Zellviabilität bei einer Substanzkonzentration von 100 μM unter 60% liegt. Die Ergebnisse der Testung nach 90 Minuten sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Ergebnisse des XTT-Assays der Imidazothiazole

Struktur	Bezeichnung	Konzentration [μM]	Viabilität [%]
	AK D19	100	76 ± 7
		10	106 ± 13
	AK D20	100	101 ± 12
		10	114 ± 12
	AK D21	100	110 ± 11
		10	109 ± 9
	AK D22	100	114 ± 19
		10	116 ± 9
	AK D23	100	108 ± 8
		10	116 ± 20
	AK D24	100	102 ± 7
		10	101 ± 6

Struktur	Bezeichnung	Konzentration [μM]	Viabilität [%]
	AK D14	100	115 \pm 9
		10	112 \pm 9

Die in Tabelle 14 aufgeführten Daten belegen, dass keine der Testsubstanzen bei einer Konzentration von 100 oder 10 μM als toxisch einzustufen ist. Eine Verminderung der Viabilität ist lediglich bei AK D19 bei einer Konzentration von 100 μM zu beobachten (76% \pm 7%). Abbildung 73 zeigt die in Tabelle 14 aufgeführten Viabilitäten bei einer Substanzkonzentration von 100 μM als Balkendiagramm.

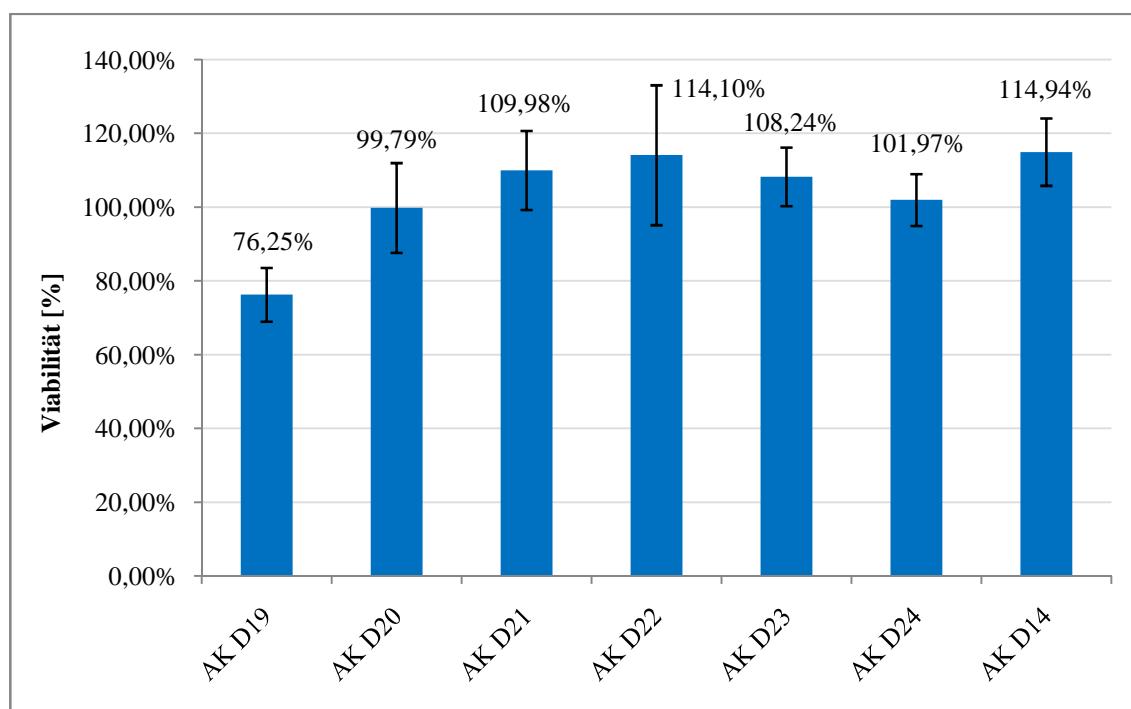


Abbildung 73: Ergebnisse des XTT-Viabilitätsassays nach 90 Minuten bei einer Substanzkonzentration von 100 μM

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass keine der sechs Testsubstanzen aus der Gruppe der Imidazothiazole eine Cytotoxizität im XTT-Assay zeigt.

5.2.6 Ergebnisse der log P-Wert-Bestimmung

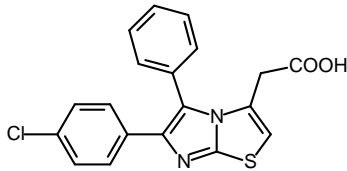
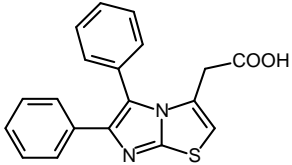
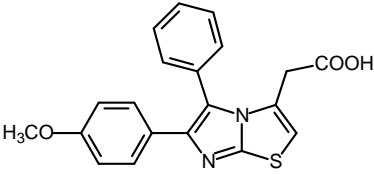
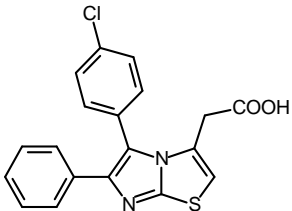
5.2.6.1 Einführung

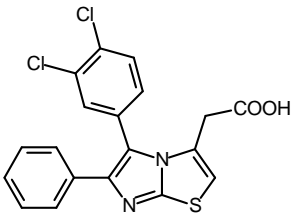
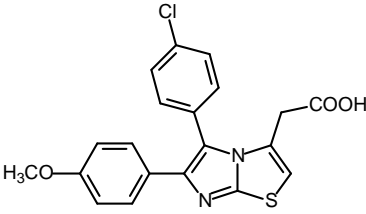
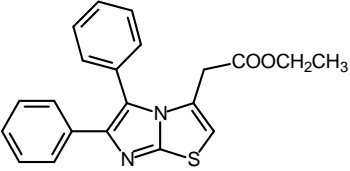
Die log P-Werte aller Testsubstanzen wurden über die HPLC-Methode ermittelt. Zuvor erfolgte eine rechnerische Bestimmung der log P-Werte mithilfe des Programms ChemDraw 9.0. Eine vorherige rechnerische Bestimmung war notwendig, um geeignete Referenzsubstanzen für die Aufnahme der Kalibriergerade auswählen zu können.

5.2.6.2 Rechnerische Bestimmung der log P-Werte

In Tabelle 15 sind die berechneten log P-Werte der Testsubstanzen aufgeführt. Die log P-Wert-Ermittlung durch ChemDraw kann über zwei verschiedene Methoden erfolgen. Die Ergebnisse der beiden Berechnungen sind im Folgenden als log P und Clog P angegeben.

Tabelle 15: Bestimmung der log P-Werte der Imidazothiazole mit ChemDraw

Struktur	Bezeichnung	log P	Clog P
	AK D19	5,24	4,55
	AK D20	4,69	3,83
	AK D21	5,16	4,78
	AK D22	5,84	5,48

Struktur	Bezeichnung	log P	Clog P
	AK D23	5,29	4,77
	AK D24	5,29	4,77
	AK D14	5,29	4,77

Es fällt auf, dass die log P-Werte der beiden Ermittlungsmethoden unterschiedlich ausfallen, sie differieren um mindestens 0,36 und höchstens 0,86. Die Clog P-Werte sind hier niedriger als die log P-Werte. Die berechneten log P-Werte von AK D23, AK D24 und AK D14 sind identisch.

5.2.6.3 Experimentelle Ermittlung der log P-Werte

Da es sich bei sechs der Imidazothiazole um Verbindungen mit Säurefunktion handelt, wurde als Fließmittel H₂O/Methanol (1:1) mit einem Säurezusatz von 10% CH₃COOH verwendet. Der pH-Wert des Fließmittels lag bei ca. 4. Zur Bestimmung der Totzeit wurde Thioharnstoff eingesetzt ($t_0 = 2,35$). Die verwendeten Referenzsubstanzen sind in Tabelle 16 aufgeführt. Die Retentionszeit der Referenzsubstanzen wurde experimentell bestimmt und daraus mithilfe der in Kapitel 4 angegebenen Formel der Kapazitätsfaktor sowie dessen Logarithmus berechnet. Die log(k)-Werte wurden dann mit den log P-Werten, die den OECD-Guidelines [198] entnommen wurden, ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 16: Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung der sauren Imidazothiazole

Referenzsubstanz	t_r	k	log(k)	log P
Phenol	4,49	0,91	-0,04	1,5
Napht-2-ol	10,53	3,48	0,54	2,7
Diphenylamin	34,10	13,51	1,13	3,4
Biphenyl	87,60	36,28	1,56	4,0

t_r : Retentionszeit ; k: Kapazitätsfaktor; P: Verteilungskoeffizient

Nach dem Auftragen der log(k)-Werte der Referenzsubstanzen gegen die log P-Werte in einem Koordinatensystem wurde eine Regressionsgerade mit Geradengleichung erhalten (siehe Abbildung 74). Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt bei 0,984 und bestätigt den linearen Zusammenhang zwischen log(k) und log P (0% = kein linearer Zusammenhang, 100% = optimaler linearer Zusammenhang).

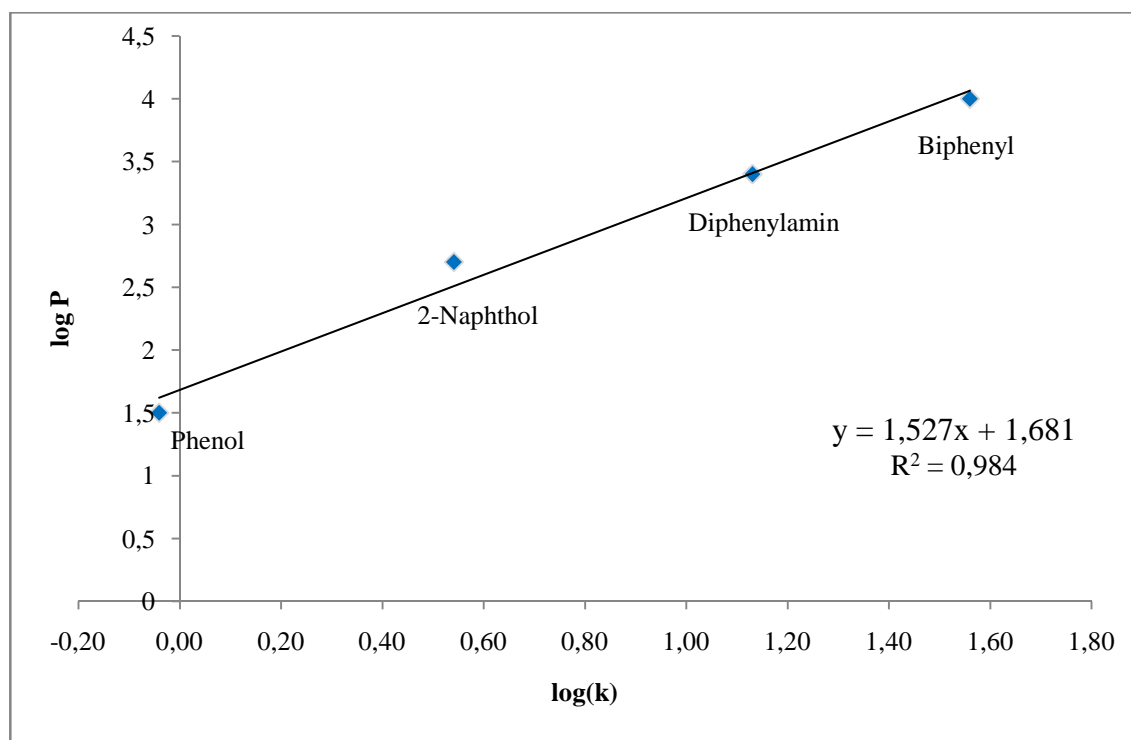
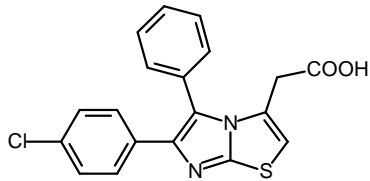
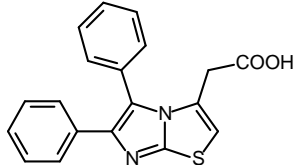
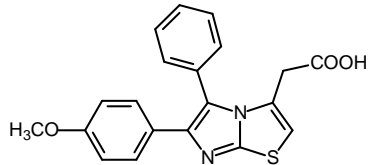
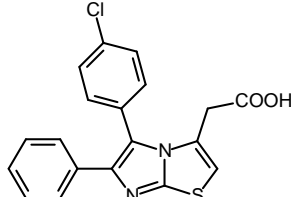
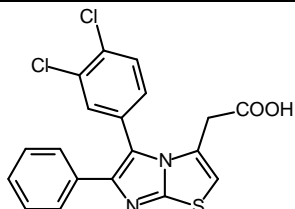
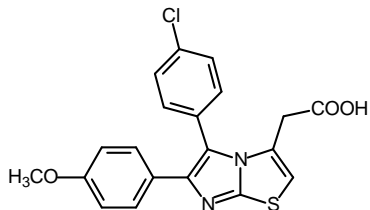


Abbildung 74: Regressionsgerade der Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung der sauren Imidazothiazole mit Geradengleichung

In die Geradengleichung konnten dann für x die gemessenen log(k)-Werte der Imidazothiazole eingesetzt und daraus die log P-Werte erhalten werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Log P-Werte der sauren Imidazothiazole

Struktur	Bezeichnung	t_r	k	log(k)	log P
	AK D19	28,76	11,24	1,05	3,3
	AK D20	7,74	2,29	0,36	2,2
	AK D21	6,59	1,81	0,26	2,1
	AK D22	17,31	6,37	0,80	2,9
	AK D23	38,46	15,37	1,19	3,5
	AK D24	13,43	4,71	0,67	2,7

t_r : Retentionszeit ; k: Kapazitätsfaktor; P: Verteilungskoeffizient

Für die log P-Wert-Bestimmung des Esters AK D14 wurde ein anderes Fließmittel verwendet, da es sich hierbei nicht um eine saure Verbindung handelt. Es wurde ein Gemisch aus Methanol/Acetonitril (1:2) eingesetzt. Zur Bestimmung der Totzeit diente Thioharnstoff ($t_0 = 2,02$). Als Referenzsubstanzen wurden die in Tabelle 18 aufgeführten Substanzen ausgewählt.

Tabelle 18: Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung des Imidazothiazols AK D14

Referenzsubstanz	t_r	k	log(k)	log P
Phenol	2,96	0,47	-0,33	1,5
Napht-2-ol	3,808	0,89	-0,05	2,7
Diphenylamin	7,73	2,83	0,45	3,4
Biphenyl	11,81	4,85	0,69	4,0
Phenanthren	16,41	7,13	0,85	4,5

t_r : Retentionszeit ; k: Kapazitätsfaktor; P: Verteilungskoeffizient

Es fällt auf, dass die log(k)-Werte von Phenol und 2-Naphthol bei diesen Messbedingungen negativ sind. Der Grund hierfür liegt in der hohen Hydrophilie der beiden Substanzen. Nachdem die log(k)-Werte der fünf Referenzsubstanzen gegen die log P-Werte in einem Koordinatensystem aufgetragen wurden, wurde eine Regressionsgerade mit Geradengleichung erhalten (siehe Abbildung 75). Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt hier bei 0,962 und bestätigt den linearen Zusammenhang von log(k) und log P.

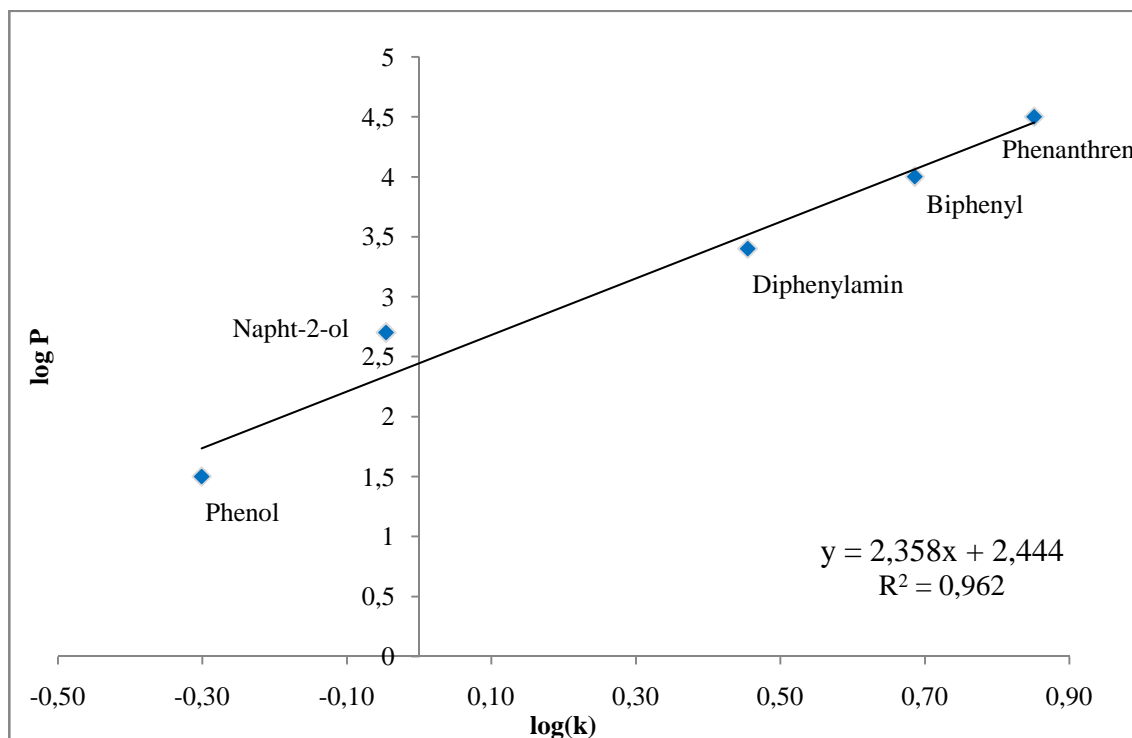
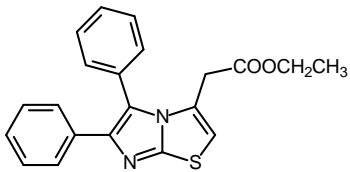


Abbildung 75: Regressionsgerade der Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung des Imidazothiazols AK D14 mit Geradengleichung

Um den log P-Wert zu erhalten, wurde der log(k)-Wert von AK D14 in die Geradengleichung für x eingesetzt.

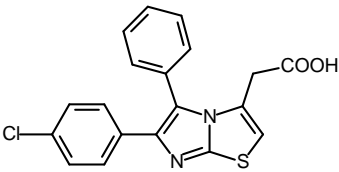
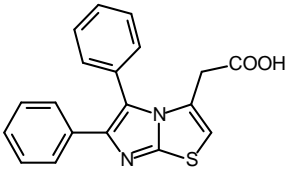
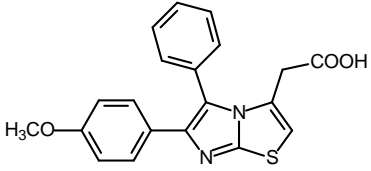
Tabelle 19: Log P-Wert-Bestimmung von AK D14

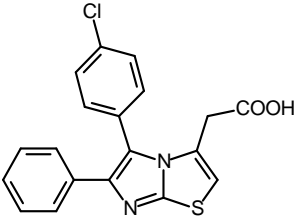
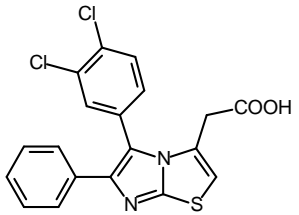
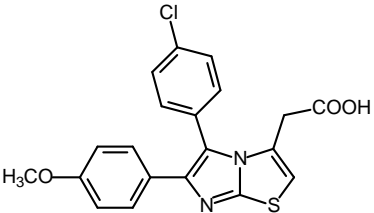
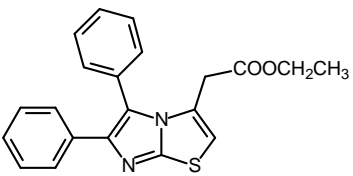
Struktur	Bezeichnung	t_r	k	log(k)	log P
	AK D14	6,64	2,32	0,36	3,3

t_r : Retentionszeit ; k: Kapazitätsfaktor; P: Verteilungskoeffizient

Im Folgenden werden die log P-Werte der Imidazothiazole, die über die HPLC-Methode bestimmt wurden, zusammengefasst und mit den von ChemDraw berechneten log P-Werten verglichen.

Tabelle 20: Vergleich der rechnerisch und experimentell ermittelten log P-Werte der Imidazothiazole

Struktur	Bezeichnung	log P	log P	Clog P
		HPLC-Methode	ChemDraw	ChemDraw
	AK D19	3,3	5,24	4,55
	AK D20	2,2	4,69	3,83
	AK D21	2,1	5,16	4,78

Struktur	Bezeichnung	log P HPLC- Methode	log P ChemDraw	Clog P ChemDraw
	AK D22	2,9	5,84	5,48
	AK D23	3,5	5,29	4,77
	AK D24	2,7	5,29	4,77
	AK D14	3,3	5,29	4,77

Es fällt auf, dass die über die HPLC-Methode ermittelten log P-Werte deutlich niedriger sind als die von ChemDraw berechneten Werte. Tendenzen hinsichtlich der Lipophilie der Imidazothiazole, die von ChemDraw vorausgesagt wurden, können durch die HPLC-Messung nicht bestätigt werden. Die Zuverlässigkeit der berechneten Werte ist aufgrund der Komplexität der Moleküle niedrig. Die log P-Werte der Imidazothiazole reichen von 2,1 bis 3,5 (HPLC-Methode). Die lipophilste Substanz ist AK D23, die größte Hydrophilie weist AK D21 auf. Vergleicht man den Ester AK D14 mit dessen Strukturanalogon - der freien Säure AK D20 - so fällt auf, dass der log P-Wert der freien Säure um 1,1 niedriger ist als der des Esters (HPLC-Methode).

5.2.7 Zusammenfassung und Diskussion der Testergebnisse der Imidazothiazole

5.2.7.1 Einleitung

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der pharmakologischen Testungen kurz zusammengefasst und mit der Referenzsubstanz Licofelon verglichen. Anschließend folgen eine Interpretation der Ergebnisse sowie eine Beurteilung der Substanzen hinsichtlich ihrer Eignung als nicht steroidale Antiphlogistika zur topischen Anwendung. In Abbildung 76 ist eine Strukturübersicht über die Testsubstanz-Reihe der Imidazothiazole aufgeführt.

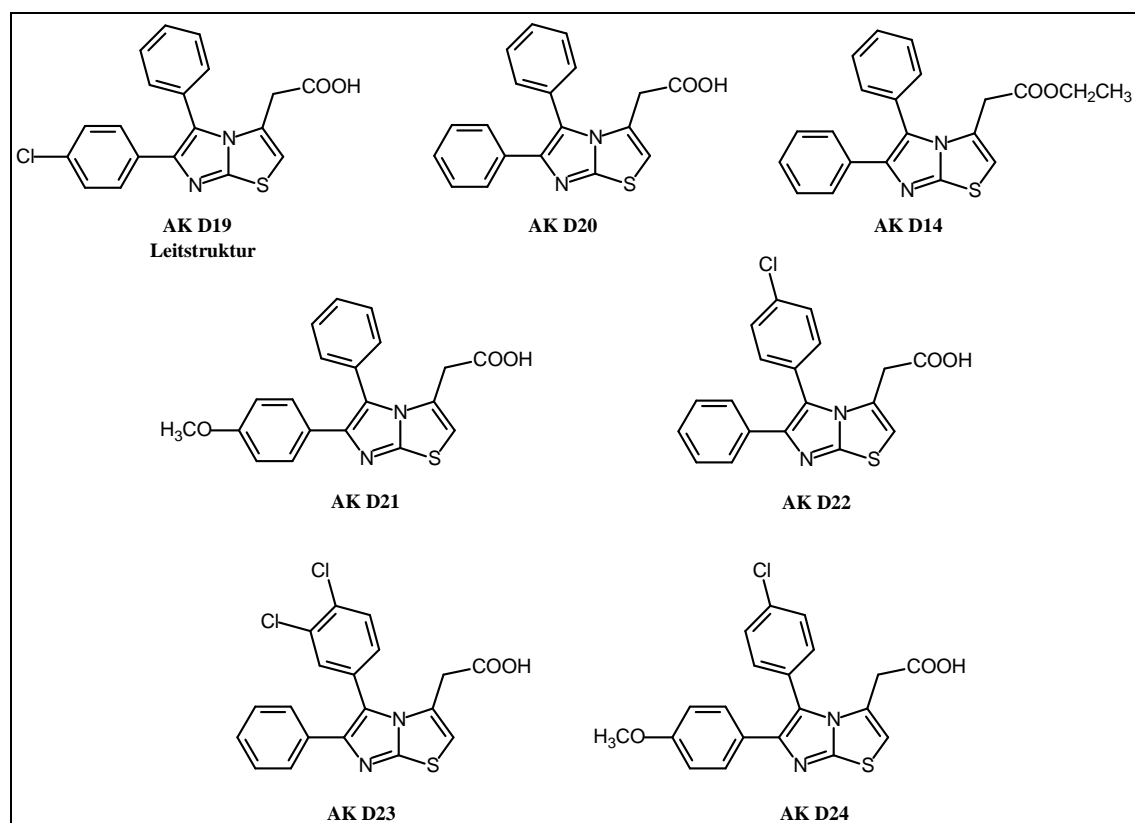


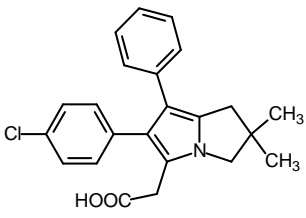
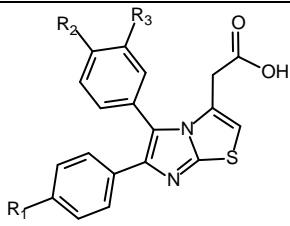
Abbildung 76: Überblick über die Testverbindungen der Imidazothiazole

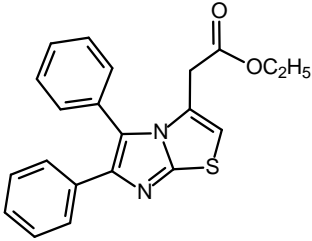
5.2.7.2 Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit Licofelon

In Tabelle 21 sind die Testergebnisse der COX-1-, COX-2 und 5-LOX-Testungen zusammengefasst und den Ergebnissen von Licofelon gegenübergestellt. Die Testergebnisse sind, falls möglich, in Form von IC_{50} -Werten angegeben. Ist eine Berechnung des IC_{50} -Werts aufgrund zu geringer Hemmaktivität nicht möglich, sind die

Ergebnisse als prozentuale Hemmung des Enzyms bei einer Substanzkonzentration von 10 μ M aufgeführt.

Tabelle 21: Testergebnisse der COX-1-, COX-2- und 5-LOX-Testungen der Imidazothiazole und von Licofelon

Substanz			IC ₅₀ oder prozentuale Hemmung				
Struktur	Bezeichnung		COX-1	COX-2	5-LOX		
	Licofelon		150 nM	30% (10 μ M)	760 nM		
	R ₁	R ₂	R ₃	Bezeichnung	COX-1	COX-2	5-LOX
Cl	H	H	AK D19	6880 nM \pm 80 nM	k.A.	k.A.	
H	H	H	AK D20	708 nM \pm 178 nM	k.A.	28% (10 μ M)	
OCH ₃	H	H	AK D21	119 nM \pm 19 nM	k.A.	k.A.	
H	Cl	H	AK D22	93 nM \pm 17 nM	26% (10 μ M)	14% (10 μ M)	
H	Cl	Cl	AK D23	35% (10 μ M)	k.A.	k.A.	
OCH ₃	Cl	H	AK D24	78 nM	51% (10 μ M)	k.A.	

Struktur	Bezeichnung	COX-1	COX-2	5-LOX
	AK D14	41% (10 µM)	24% (10 µM)	k.A.

k.A. = keine Aktivität

Zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen:

Bezogen auf die COX-1-Inhibition sind AK D21, AK D22 und AK D24 potenter als Licofelon, wobei AK D21 in einem ähnlichen dreistelligen nanomolaren Bereich wie Licofelon liegt und AK D22 sowie AK D24 IC₅₀-Werte im zweistelligen nanomolaren Bereich besitzen.

Licofelon zeigt eine schwache COX-2-Hemmung von 30% bei einer Konzentration von 10 µM. AK D22 und AK D14 hemmen die COX-2 in einer ähnlichen Größenordnung. AK D24 zeigt eine bessere inhibitorische Aktivität als Licofelon.

Die Referenz Licofelon hemmt die 5-LOX im dreistelligen nanomolaren Bereich. Während AK D20 und AK D22 eine schwache 5-LOX-Hemmung zeigen, weisen alle anderen Testsubstanzen diesbezüglich keine Aktivität auf, wobei das Ergebnis von AK D22 unter dem Signifikanzkriterium von 15% liegt. Die Imidazothiazole sind somit weniger potent als Licofelon.

Als dualer COX/LOX-Hemmstoff kommt nur AK D22 in Frage, da diese Substanz als einzige Testverbindung alle drei Enzyme hemmt. Die COX-1-Hemmung ist besser, die COX-2-Hemmung geringfügig schwächer und die 5-LOX-Hemmung schlechter als bei Licofelon.

Bei einem Vergleich der freien Säure AK D20 mit deren Ester AK D14 fällt auf, dass AK D20 hinsichtlich der COX-1- und 5-LOX-Hemmung die potentere Substanz ist. AK D14 zeigt keine 5-LOX- und nur eine moderate COX-1-Hemmung, die Substanz hemmt jedoch - im Gegensatz zu AK D20 - in einem geringen Maße die COX-2.

Die Testergebnisse des MDA- und 12-HHT-Assays stimmen in Bezug auf die Größenordnung der COX-1-Hemmung überein, die IC₅₀-Werte des 12-HHT-Assays sind jedoch in der Regel höher.

In einem ersten Vorscreening mit AK D20 kann keine Hemmaktivität gegenüber TNF-α festgestellt werden.

Keine der Testverbindungen erweist sich im XTT-Assay als cytotoxisch.

Die log P-Werte der Imidazothiazole (HPLC-Methode) liegen im Bereich von 2,1 (AK D21) bis 3,5 (AK D23). Vergleicht man den Ester AK D14 mit dessen Strukturanalogon, der freien Säure AK D20, fällt auf, dass der log P-Wert der freien Säure erwartungsgemäß um 1,1 niedriger ist als der des Esters.

5.2.7.3 Interpretation der Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Testergebnisse zunächst im Hinblick auf das Topliss-Schema (siehe Abbildung 77) und anschließend bezüglich einer Eignung zur topischen Anwendung diskutiert. Es ist jedoch zu beachten, dass bei der biologischen Aktivität der Testverbindungen nicht nur elektronische und sterische Effekte innerhalb der Moleküle sondern auch die unterschiedliche Orientierung der Substanzen an den Enzymen eine entscheidende Rolle spielen.

Bei einem Vergleich der konstitutionsisomeren *p*-Chlor-substituierten Verbindungen AK D19 und AK D22 fällt auf, dass die Substitution des Phenylrings, der sich in Position 5 befindet (AK D22), zu einer verbesserten pharmakologischen Wirksamkeit führt als die Substitution des Phenylrings in Position 6. Im Vergleich mit der unsubstituierten Verbindung AK D20 zeigt sich AK D22 als wirksamer und AK D19 als weniger wirksam. Die verbesserte Wirksamkeit von AK D22 gegenüber AK D20 könnte entweder auf eine positive Auswirkung des $+\sigma$ - oder $+\pi$ -Effekts des *p*-Chlor-Substituenten oder auf eine Kombination der beiden Parameter zurückzuführen sein [124].

Die 3,4-Dichlor-substituierte Testverbindung AK D23 weist gegenüber AK D22 erhöhte $+\sigma$ - und $+\pi$ -Werte auf. In den COX-2- und 5-LOX-Testungen zeigt AK D23 keine Aktivität und in der COX-1-Testung nur eine moderate Hemmung und ist somit weniger potent als AK D22. Dieses Ergebnis könnte auf eine sterische Hinderung der Bindung im aktiven Zentrum der Enzyme durch die *m*-Substitution oder eine Überschreitung des Lipophilie-Optimums (AK D22 = 2,9; AK D23 = 3,5) zurückzuführen sein [124].

Die Leitstruktur AK D19 zeigt sich in den pharmakologischen Testungen weniger potent als die unsubstituierte Verbindung AK D20. Dieses Ergebnis könnte auf einer sterischen Hinderung durch die *p*-Substitution oder einer $-\sigma$ - oder $-\pi$ -Abhängigkeit der Hemmaktivität beruhen. Die *p*-Methoxy-substituierte Verbindung AK D21 weist einen $-\sigma$ -Wert von -0,27 auf und zeigte sich potenter als AK D19. Dieses Ergebnis kann in Bezug zur $-\sigma$ -Abhängigkeit der biologischen Aktivität interpretiert werden [124].

Hinsichtlich der COX-1-Inhibition erweist sich AK D24, das strukturell eine Kombination aus AK D21 und AK D22 darstellt, als potenteste Substanz. AK D22 hemmt als einziges Imidazothiazol sowohl COX-1 und COX-2 als auch 5-LOX. Im Vergleich mit der Leitstruktur AK D19 zeigen, bis auf AK D23, alle synthetisierten Testverbindungen eine verbesserte Wirksamkeit.

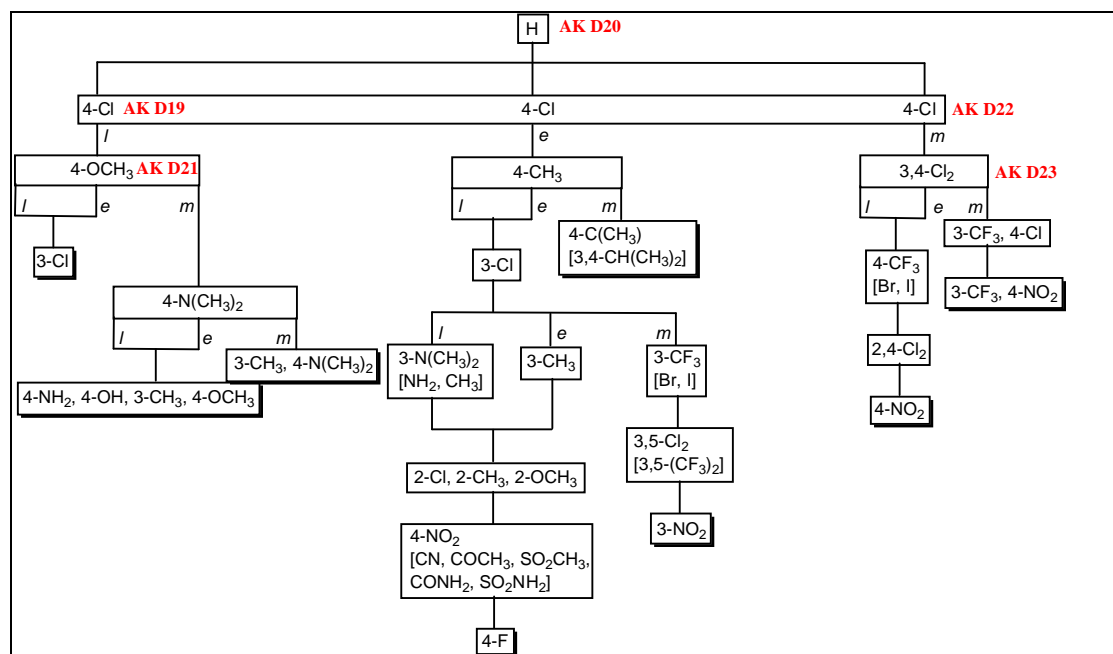


Abbildung 77: Topliss Decision Tree [124]

Eine weiterführende Derivatisierung der Leitstruktur nach den Vorgaben des Topliss-Schemas ist als sinnvoll zu betrachten. Hierbei sollte der Schwerpunkt zunächst auf dem rechten Zweig des Topliss Decision Trees liegen, um die guten Ergebnisse des dualen COX/LOX-Inhibitors AK D22 weiter zu steigern. Eine Kombination von Substituenten beider Phenylringe scheint vielversprechend, wie das Beispiel AK D24 beweist.

Bei Wirkstoffen, die für die topische Anwendung mit lokaler Wirkung eingesetzt werden sollen, ist eine Penetration der Substanzen in das Stratum corneum erforderlich. Eine Permeation, bei der die Hornschicht durchdrungen wird, kann zu unerwünschten systemischen Nebenwirkungen führen und sollte vermieden werden [104]. Hinsichtlich der log P-Werte sind für eine ausreichende Absorption Substanzen mit log P-Werten über 2 geeignet. Für die topische Anwendung mit lokaler Wirkung sind Werte zwischen 4 und 4,5 ideal [104, 119, 206]. Da die log P-Werte der Imidazothiazole zwischen 2,1 und 3,5 liegen (experimentelle Bestimmung), sollte eine Absorption möglich sein. Für eine ausreichende Penetration in das Stratum corneum könnten die Substanzen möglicherweise zu wenig lipophil sein. Zudem sollte bei der topischen Anwendung ein Molekulargewicht von 500 g/mol nicht überschritten werden [118, 119]. Die Molekulargewichte der Imidazothiazole liegen zwischen 334 und 402 g/mol und befinden sich somit in einem geeigneten Bereich.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Imidazothiazole hinsichtlich ihrer Größe für die topische Anwendung grundsätzlich geeignet sind. Die zu geringe Lipophilie könnte durch Veresterung der freien Säure um einen Faktor von ca. 1 gesteigert werden. Obwohl sich die veresterte Testsubstanz AK D14 in den Testungen als weniger potent

erwies als die analoge freie Säure AK D20, ist der Einsatz der Imidazothiazole in veresterter Form als sinnvoll zu betrachten, da Ester im Rahmen der Biotransformation in der Phase-1-Reaktion zu freien Säuren hydrolysiert werden und somit als Prodrug fungieren könnten.

5.3 Testergebnisse und Diskussion der Chalcone

5.3.1 Ergebnisse der COX-1-Assays

5.3.1.1 Überblick

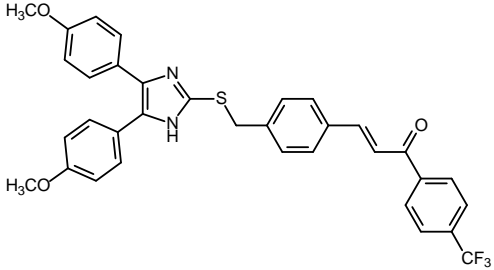
Ebenso wie bei den Imidazothiazolen erfolgte die Bestimmung der COX-1-Inhibition der Chalcone mithilfe des 12-HHT- und des MDA-Assays.

5.3.1.2 Testergebnisse des 12-HHT-Assays

Durch UV-Detektion von 12-HHT, einem Metaboliten, der im Verlauf der Arachidonsäurekaskade bei der Synthese von Thromboxan A₂ entsteht, wurde die inhibitorische Aktivität der Testverbindungen gegenüber der Cyclooxygenase 1 bestimmt. Als Enzymquelle dienten Rinderthrombozyten. Die Testsubstanzen wurden in den Konzentrationen 10 und 1 µM eingesetzt. Bei vorhandener Aktivität erfolgten weitere Testungen mit Substanzkonzentrationen von 0,1 und 0,01 µM. In Tabelle 22 sind die Ergebnisse des 12-HHT-Assays zusammengefasst.

Tabelle 22: Testergebnisse Chalcone 12-HHT-Assay

Struktur	Rest (R)	Bezeichnung	Konzentration [µM]	Hemmung [%]	
	CF ₃	AK D31	10	96	100
			1	70	63
			0,1	25	52
			0,01	17	n.t.
	Cl	AK D33	10	34	74
			1	0	10

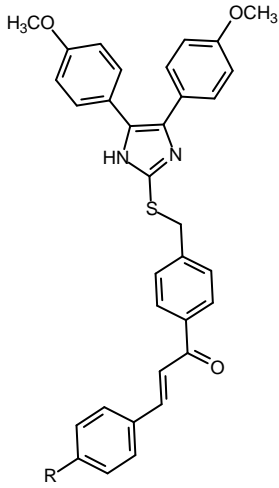
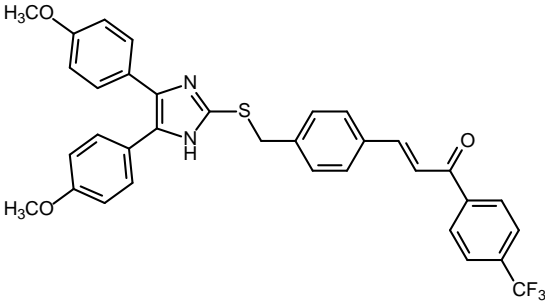
Struktur	Rest (R)	Bezeichnung	Konzentration [μM]	Hemmung [%]	
	SO_2CH_3	AK D34	10	100	100
			1	92	100
			0,1	52	70
			0,01	18	12
		AK D32	10	78	n.t.
			1	21	n.t.

n.t. = not tested

Alle Chalone sind gegenüber der Cyclooxygenase 1 inhibitorisch wirksam. Bei AK D31, AK D32 und AK D34 ist eine deutliche Hemmung zu beobachten. Die Ergebnisse der beiden Testreihen von AK D33 variieren stark, hier wäre eine Wiederholung der Versuchsreihe erforderlich. Bei einer Testung wurde eine deutliche, bei der anderen Testung nur eine moderate Hemmung der COX-1 festgestellt.

Mittels der in Tabelle 22 aufgeführten Testergebnisse wurden mit Hilfe des Programms ENZFIT die IC_{50} -Werte der Testverbindungen berechnet (siehe Tabelle 23). Eine Berechnung des IC_{50} -Werts kann nur erfolgen, wenn die prozentuale Hemmung bei mindestens einer der getesteten Konzentration über 50% liegt. Folglich konnte für AK D33 nur ein IC_{50} -Wert ohne Standardabweichung berechnet werden.

Tabelle 23: IC₅₀-Werte der Chalone (COX-1)

Struktur	R	Substanz	IC ₅₀
	CF ₃	AK D31	229 nM ± 102 nM (n = 2)
	Cl	AK D33	6800 nM (n = 1)
	SO ₂ CH ₃	AK D34	66 nM ± 17 nM (n = 2)
		AK D32	6300 nM (n = 1)

n = Anzahl der Messungen

Als potenteste Substanz zeigt sich das Sulfon AK D34 mit einem IC₅₀-Wert von 66 nM. Am wenigsten wirksam sind AK D32 und AK D33 mit IC₅₀-Werten im niedrigen mikromolaren Bereich. Wie bereits erwähnt, differieren die beiden Testergebnisse von AK D33 stark, so dass nur Tendenzen festgestellt werden können. Bei einem Vergleich der Konstitutionsisomere AK D31 und AK D32 erweist sich das Z11-A-Chalcon AK D31 als wirksamere Substanz mit einem IC₅₀-Wert im nanomolaren Bereich. AK D32 ist um den Faktor 28 schwächer wirksam.

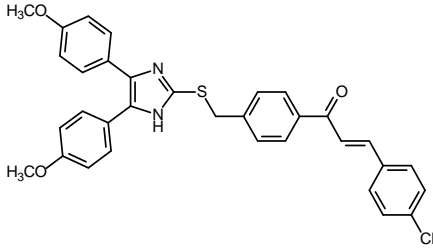
5.3.1.3 Testergebnis des MDA-Assays

Zur Bestätigung der Aussagekraft des 12-HHT-Assays wurde der MDA-Assay - mit jeweils einer Testverbindung der Imidazothiazole und der Chalcon-Gruppe - durchgeführt. Als Vertreter der Chalone wurde AK D33 eingesetzt. In Tabelle 24 ist das Ergebnis der Testung aufgeführt und zum Vergleich dem Ergebnis des 12-HHT-Assays gegenübergestellt.

Durch eine spektrofluorometrische Messung des Konjugationsprodukts von MDA und Thiobarbitursäure wurde die pharmakologische Aktivität der Testverbindung bestimmt. MDA entsteht bei der Synthese von Thromboxan A₂ als Nebenprodukt. AK D33 wurde in Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 μM mit Schweinethrombozyten inkubiert.

Ein IC₅₀-Wert konnte nicht berechnet werden, da die Hemmaktivität von AK D33 gegenüber der Cyclooxygenase 1 zu gering ist. Als Testergebnis wird die prozentuale Hemmung der Cyclooxygenase 1 bei einer Substanzkonzentration von 10 μM angegeben.

Tabelle 24: Testergebnisse des MDA- und 12HHT-Assays des Chalcones AK D34

Struktur	Bezeichnung	MDA-Assay prozentuale Hemmung (10 μM)	12-HHT-Assay prozentuale Hemmung (10 μM)
	AK D33	53%	54% ± 20%

Bei einem Vergleich der Testergebnisse fällt auf, dass die Ergebnisse der beiden Testungen nahe beieinander liegen. Der Mittelwert des 12-HHT-Assays liegt bei 54% - mit einer großen Standardabweichung von 20% - und ist dem Ergebnis des MDA-Assays sehr ähnlich (53%).

5.3.2 Ergebnisse des COX-2-Assays

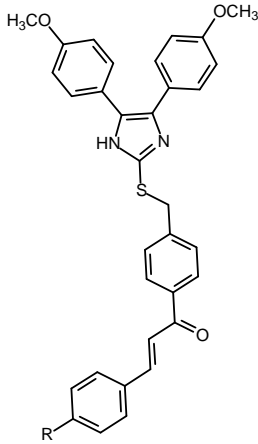
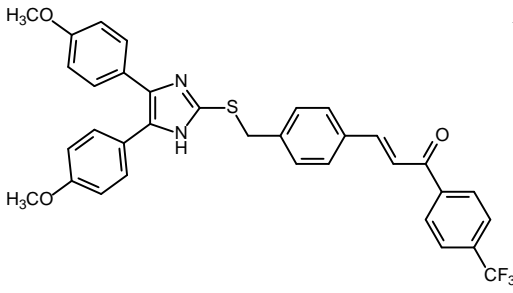
Die Durchführung des humanen Vollblut-Assays erfolgte analog der beschriebenen Vorgehensweise bei den Imidazothiazolen (siehe Kapitel 5.2.2). Die inhibitorische Aktivität der Testsubstanzen wurde nach Ablauf der Enzymreaktion über die PGE₂-Konzentration bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Celecoxib.

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass keine der Testverbindungen in den getesteten Konzentrationen von 10 und 1 μM eine inhibitorische Aktivität gegenüber der Cyclooxygenase 2 zeigt. Um die Ergebnisse zu überprüfen, wurde die Testung wiederholt. Die zweite Testung bestätigt das Ergebnis.

5.3.3 Ergebnisse des 5-LOX-Assays

In Übereinstimmung mit der Vorgehensweise bei den Imidazothiazolen wurde die pharmakologische Aktivität der Testsubstanzen gegenüber der 5-Lipoxygenase bestimmt. Als Maß für die inhibitorische Aktivität diente die LTB₄-Konzentration, die mittels HPLC bestimmt wurde. Alle Testverbindungen wurden zunächst in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt, zeigte sich eine Hemmung des Enzyms, wurde die Testung mit 3,3 µM wiederholt. In Tabelle 25 sind die Ergebnisse des 5-LOX-Assays zusammengefasst.

Tabelle 25: Testergebnisse des 5-LOX-Assays der Chalone

Struktur	Rest (R)	Bezeichnung	Konzentration [µM]	Hemmung [%]
	CF ₃	AK D31	10	k.A.
	Cl	AK D33	10	k.A.
	SO ₂ CH ₃	AK D34	10 3,3	41 0
		AK D32	10	k.A.

k.A. = keine Aktivität

AK D34 weist bei einer Konzentration von 10 µM eine moderate Hemmaktivität von 43% auf. AK D31, AK D32 und AK D33 hemmen die 5-Lipoxygenase in den getesteten Konzentrationen nicht. Eine Angabe des IC₅₀-Werts für AK D34 ist aufgrund der zu geringen Hemmaktivität nicht möglich.

5.3.4 Ergebnis des TNF- α -Assays

In Analogie zu den Imidazothiazolen wurde die TNF- α -Hemmaktivität der Testsubstanzen über einen Sandwich-ELISA mit humanem Vollblut bestimmt. Als Vertreter der Substanzklasse der Chalcone wurde AK D34 ausgewählt und in einer Konzentration von 10 μ M getestet. AK D34 zeigt keine inhibitorische Aktivität gegenüber TNF- α .

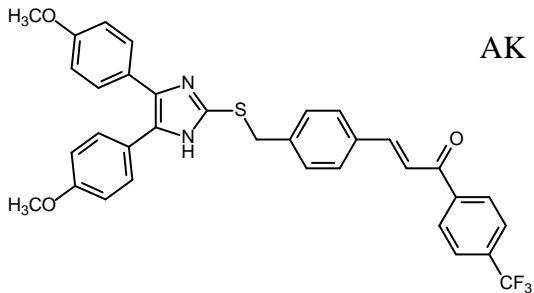
5.3.5 Ergebnisse des XTT-Assays

Die Cytotoxizität der Testsubstanzen wurde über den XTT-Viabilitätsassays in übereinstimmender Vorgehensweise zu den Imidazothiazolen an MM6-Zellen bestimmt. Die Absorptions-Messungen des Formazans erfolgten nach Zugabe des Reagenz alle 30 Minuten mit einer Gesamtdauer von 120 Minuten. Die Testverbindungen wurden in den Konzentrationen 100 und 10 μ M getestet. Als Referenz wurden Proben mit reinem DMSO verwendet, die Zellviabilität wurde hier auf 100% festgesetzt.

Die Beurteilung der Cytotoxizität der Testsubstanzen erfolgt anhand der Zellviabilität nach 90 Minuten. Eine Verbindung wird als toxisch bezeichnet, wenn die Viabilität der Zellen bei einer Substanzkonzentration von 100 μ M unter 60% liegt. In Tabelle 26 sind die Ergebnisse des XTT-Assays aufgeführt.

Tabelle 26: Testergebnisse des XTT-Viabilitätsassays der Chalcone

Struktur	Rest (R)	Bezeichnung	Konzentration [μ M]	Viabilität [%]
	CF ₃	AK D31	100	114 \pm 21
			10	111 \pm 16
	Cl	AK D33	100	127 \pm 17
			10	102 \pm 16
	SO ₂ CH ₃	AK D34	100	73 \pm 11
			10	107 \pm 16

Struktur	Rest (R)	Bezeichnung	Konzentration [μM]
	AK D32	100	102 ± 9
		10	99 ± 11

Aus Tabelle 26 ist ersichtlich, dass nur eine der Testsubstanzen bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ möglicherweise toxisch sein könnte. Die Zellviabilität beträgt nach Inkubation mit AK D34 ($100 \mu\text{M}$) $73\% \pm 11\%$. Alle anderen Testsubstanzen beeinflussen die Viabilität der Zellen nicht. Abbildung 78 zeigt die Viabilität der Zellen nach Einwirkung von $100 \mu\text{M}$ der Testsubstanzen nach 90 Minuten als Balkendiagramm.

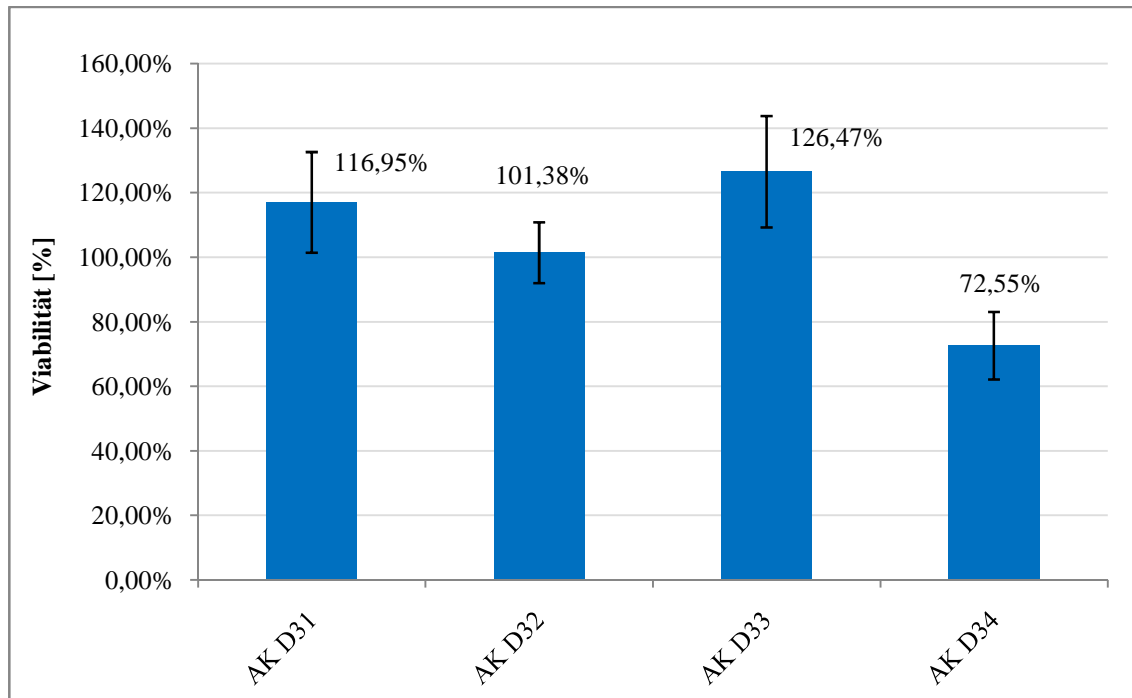


Abbildung 78: Ergebnisse des XTT-Viabilitätsassays nach 90 Minuten bei einer Substanzkonzentration von $100 \mu\text{M}$

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass keine der sechs Testsubstanzen aus der Gruppe der Chalcone eine Cytotoxizität im XTT-Assay zeigt. Die Toxizität von AK D34 liegt im grenzwertigen Bereich.

5.3.6 Ergebnisse der log P-Wert-Bestimmung

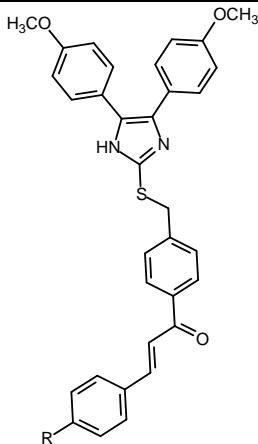
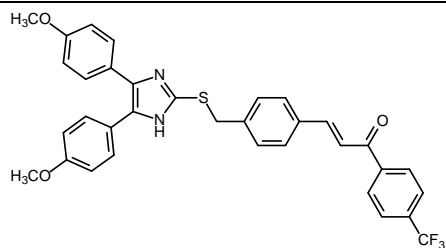
5.3.6.1 Einführung

In Analogie zu den Imidazothiazolen wurden die log P-Werte über die HPLC-Methode ermittelt. Zuvor erfolgte eine rechnerische Bestimmung mit ChemDraw 9.0. Eine erste Abschätzung der zu erwartenden log P-Werte ermöglichte die Auswahl geeigneter Referenzsubstanzen für die Kalibriergerade.

5.3.6.2 Rechnerische Bestimmung der log P-Werte

In Tabelle 27 sind die berechneten log P-Werte der Testsubstanzen aufgeführt. Die Berechnung der log P-Werte durch ChemDraw erfolgt über zwei verschiedene Methoden, die Ergebnisse werden als log P und Clog P angegeben.

Tabelle 27: Rechnerische Bestimmung der log P-Werte mit ChemDraw

Struktur	Rest (R)	Bezeichnung	log P	Clog P
	CF ₃	AK D31	8,54	8,67
	Cl	AK D33	8,54	8,81
	SO ₂ CH ₃	AK D34	8,17	8,50
		AK D32	6,32	6,15

Es fällt auf, dass die log P-Werte der beiden Ermittlungsmethoden unterschiedlich ausfallen, sie differieren zwischen 0,13 und 0,33. Die Werte von AK D31, AK D33 und AK D34 bestätigen die Tendenz der Imidazothiazole, dass die Clog P-Werte hier höher ausfallen als die log P-Werte.

5.3.6.3 Experimentelle Ermittlung der log P-Werte

Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Methanol/Acetonitril (1:2) verwendet und zur Bestimmung der Totzeit Thioharnstoff eingesetzt ($t_0 = 2,02$). Die verwendeten Referenzsubstanzen sind in Tabelle 28 aufgeführt. In übereinstimmender Vorgehensweise zu den Imidazothiazolen wurde die Retentionszeit der Referenzsubstanzen experimentell bestimmt und daraus der Kapazitätsfaktor sowie dessen Logarithmus berechnet. Die log P-Werte wurden den OECD-Guidelines entnommen [198].

Tabelle 28: Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung der Chalcone

Referenzsubstanz	t_r	k	log(k)	log P
Phenol	2,96	0,47	-0,33	1,5
Napht-2-ol	3,808	0,89	-0,05	2,7
Diphenylamin	7,73	2,83	0,45	3,4
Biphenyl	11,81	4,85	0,69	4,0
Phenanthren	16,41	7,13	0,85	4,5

Die log(k)-Werte von Phenol und 2-Naphthol sind - bedingt durch die hohe Hydrophilie der beiden Substanzen - negativ.

Nach dem Auftragen der log(k)-Werte der Referenzsubstanzen gegen die log P-Werte in einem Koordinatensystem, wurde eine Regressionsgerade mit Geradengleichung erhalten (siehe Abbildung 79). Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt bei 0,962 und bestätigt den linearen Zusammenhang von log(k) und log P.

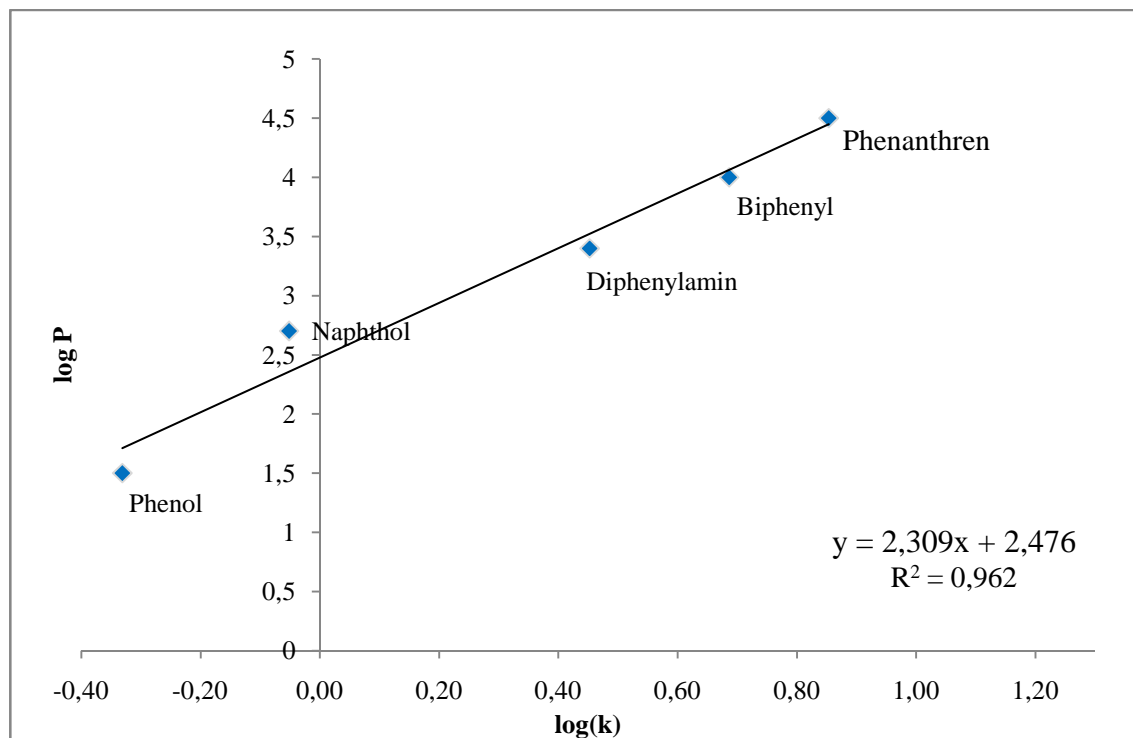
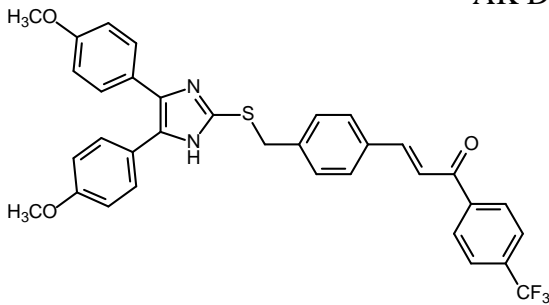


Abbildung 79: Regressionsgerade der Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung der Chalcone mit Geradengleichung

In die Geradengleichung wurden für x die gemessenen log(k)-Werte der Chalcone eingesetzt und daraus die log P-Werte erhalten. In Tabelle 29 sind die Ergebnisse aufgeführt, für AK D34 wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

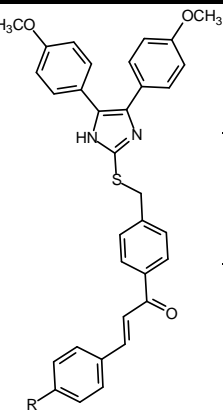
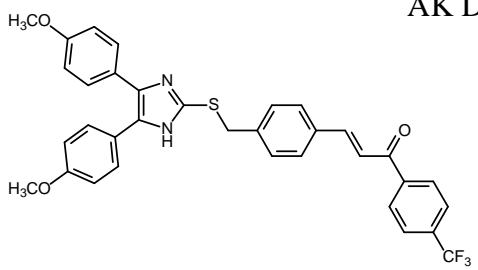
Tabelle 29: Experimentell ermittelte log P-Werte der Chalcone

Struktur	Rest (R)	Bezeichnung	t_r	k	log(k)	log P
	CF ₃	AK D31	17,20	7,53	0,88	4,5
	Cl	AK D33	13,70	5,79	0,76	4,2
	SO ₂ CH ₃	AK D34	4,99	1,47	0,17	2,9
				5,39	1,70	0,23

Struktur	Rest (R)	Bezeichnung	t_r	k	log(k)	log P
		AK D32	18,23	8,04	0,91	4,6

Um die experimentell bestimmten log P-Werte mit den von ChemDraw berechneten Werten vergleichen zu können, sind alle Ergebnisse in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30: Experimentell und rechnerisch bestimmte log P-Werte der Chalcone

Struktur	Rest (R)	Bezeichnung	log P HPLC	log P ChemDraw	Clog P ChemDraw
	CF ₃	AK D31	4,5	8,54	8,67
	Cl	AK D33	4,2	8,17	8,50
	SO ₂ CH ₃	AK D34	3,0	6,32	6,15
		AK D32	4,6	8,54	8,81

Es fällt auf, dass die über die HPLC-Methode ermittelten log P-Werte deutlich niedriger sind als die von ChemDraw berechneten. ChemDraw zufolge wäre eine log P-Wert-Bestimmung der Chalcone AK D31 bis AK D34 über die HPLC-Methode nicht möglich, da mit dieser Methode nur log P-Werte bestimmt werden können, die zwischen 0 und 6 liegen. Die großen Differenzen zwischen den berechneten und experimentell ermittelten Werten sind mit der hohen Komplexität der Moleküle zu begründen, die eine Voraussage der Lipophilie durch ChemDraw erschweren. Die Lipophilie-Tendenz der rechnerisch ermittelten Werte entspricht den experimentell bestimmten Werten. ChemDraw berechnet für AK D34 einen deutlich niedrigeren log P-Wert als für die übrigen Chalcone, dies stimmt mit dem Ergebnis der HPLC-Messung überein. AK D34 besitzt als Substituenten eine Methylsulfonyl-Gruppe, die die Hydrophilie des Moleküls im Vergleich zu dem Trifluormethyl- (AK D31 und AK D32) und Chlor-Rest (AK D33) der übrigen Chalcone erhöht. Die log P-Werte der Chalcone liegen in einem Bereich von 3,0 bis 4,6 (HPLC-Methode).

5.3.7 Zusammenfassung und Diskussion der Testergebnisse der Chalcone

5.3.7.1 Einleitung

In Analogie zu den Imidazothiazolen werden zunächst die Ergebnisse der pharmakologischen Testungen zusammengefasst und mit den Referenzsubstanzen verglichen. Anschließend folgen die Interpretation der Ergebnisse sowie die Beurteilung der Substanzen hinsichtlich ihrer Eignung als nicht steroidale Antiphlogistika zur topischen Anwendung. In Abbildung 80 ist eine Strukturübersicht über die Substanzklasse der Chalcone aufgeführt.

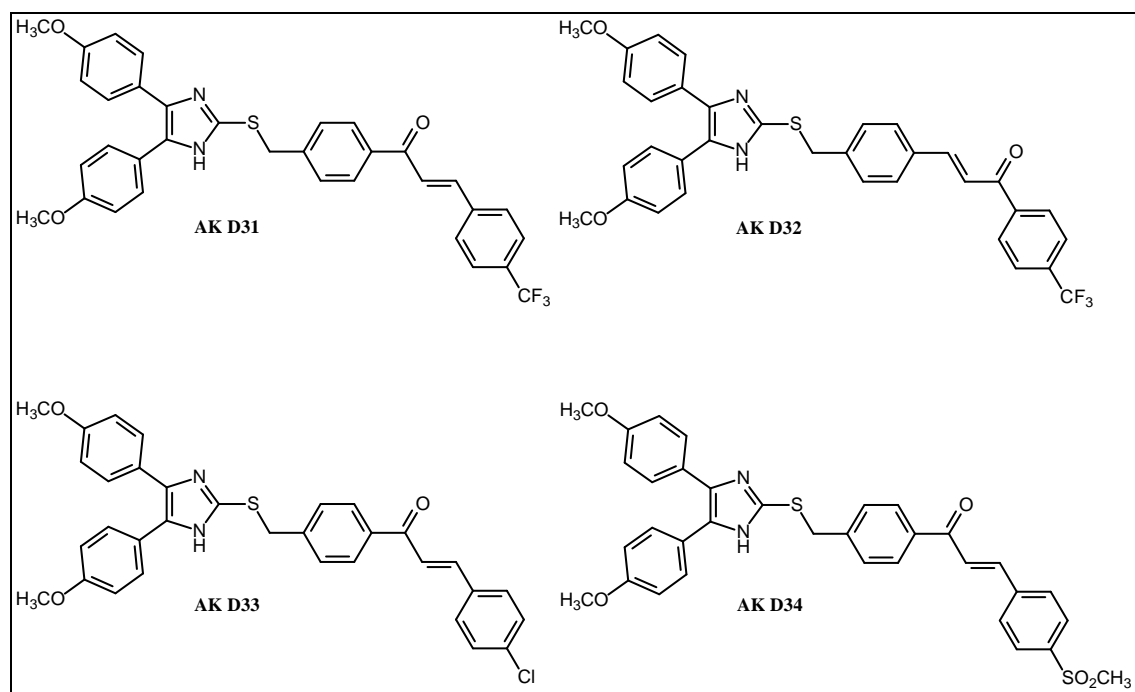


Abbildung 80: Überblick über die Testverbindungen der Chalcon-Reihe

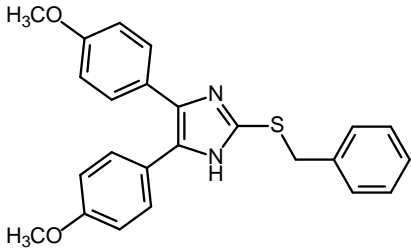
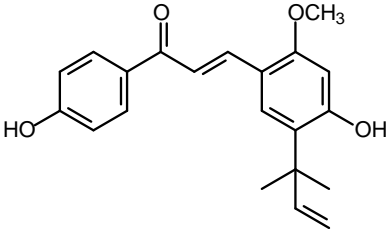
5.3.7.2 Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit D4 und

Licochalcon A

In Tabelle 31 sind die Testergebnisse der COX-1-, COX-2 und 5-LOX-Testungen zusammengefasst und den Ergebnissen zweier Referenzsubstanzen gegenübergestellt. Als Referenzen wurden das Z11-Derivat D4 und der Naturstoff Licochalcon A ausgewählt. Bei D4 handelt es sich um eine Variation von Z11, die an der Thiofunktion mit einem Benzylrest substituiert ist und von Hahn im Arbeitskreis synthetisiert wurde [125]. Als zweite Referenz dient Licochalcon A (LicA), das in den Wurzeln der chinesischen Süßholzpflanze *Glycyrrhiza inflata* vorkommt. Neben antiinflammatorischen Eigenschaften besitzt die Verbindung auch antiangiogene, antiparasitäre und antibakterielle Wirkung. LicA wird unter anderem in kosmetischen Zubereitungen zur Behandlung entzündlicher Dermatosen wie Rasur- oder Sonnenbrand eingesetzt [207].

Die Ergebnisse sind, falls möglich, in Form von IC_{50} -Werten angegeben. Ist eine Berechnung des IC_{50} -Werts aufgrund zu geringer Hemmaktivität nicht möglich, sind die Ergebnisse als prozentuale Hemmung des Enzyms bei einer Substanzkonzentration von 10 μ M aufgeführt.

Tabelle 31: Testergebnisse der COX-1-, COX-2- und 5-LOX-Testungen der Chalone, von D4 und Licochalcon A

Struktur	Substanz Bezeichnung	IC ₅₀ oder prozentuale Hemmung		
		COX-1	COX-2	5-LOX
	D4	5 nM	5200 nM	k.A.
	LicA	360 nM	k.A.	k.A.

Rest (R)	Bezeichnung	COX-1	COX-2	5-LOX
CF ₃	AK D31	229 nM ± 102 nM (n = 2)	k.A.	k.A.
Cl	AK D33	6800 nM (n = 1)	k.A.	k.A.
SO ₂ CH ₃	AK D34	66 nM ± 17 nM (n = 2)	k.A.	41% (10 μM)
	AK D32	6300 nM	k.A.	k.A.

k.A. = keine Aktivität

Die Ergebnisse der Testungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die IC₅₀-Werte der Referenzsubstanzen liegen bezüglich der COX-1-Hemmung im dreistelligen (LicA) und einstelligen (D4) nanomolaren Bereich. Eine vergleichbare inhibitorische Aktivität besitzen AK D31 (229 nM) und AK D34 (66nM), wobei D4 die potenteste Verbindung der Substanzreihe ist. Die IC₅₀-Werte von AK D32 und AK D33 liegen im niedrigen mikromolaren Bereich. Eine COX-2-Hemmung kann bei keiner der Testsubstanzen festgestellt werden. Auch Licochalcon A zeigt keine Aktivität im COX-2-Assay; D4 besitzt einen IC₅₀-Wert im einstelligen mikromolaren Bereich. Für die Referenzsubstanzen kann keine Aktivität im 5-LOX-Assay nachgewiesen werden.

AK D34 zeigt als einzige der Testsubstanzen eine inhibitorische Aktivität. Die Hemmung der 5-LOX bei 10 μ M liegt bei 41%.

Keine der Testverbindungen weist eine parallele Hemmung von COX-1-, COX-2- und 5-LOX auf. AK D34 ist ein COX-1/5-LOX-Inhibitor mit deutlicher COX-1- und moderater 5-LOX-Hemmung.

In einem ersten Vorscreening kann keine Hemmaktivität gegenüber TNF- α festgestellt werden. Die Testung erfolgte mit AK D34.

Keine der Testverbindungen zeigt sich im XTT-Assay toxisch.

Die log P-Werte der Chalcone (experimentelle Bestimmung) liegen im Bereich von 3,0 (AK D34) bis 4,6 (AK D32).

5.3.7.3 Interpretation der Ergebnisse

Die Substanzklasse der Chalcone wurde mit dem Ziel synthetisiert, zwei antiinflammatorisch wirksame Molekülgruppen zu einem Codrug mit synergistischem Effekt zu kombinieren. Es wurde eine duale COX/LOX-Inhibition angestrebt. Dieses Ziel konnte nicht erreicht werden, da keine der Testverbindungen eine COX-2-Hemmung aufweist und nur eine der Testsubstanzen die 5-LOX moderat hemmt. Alle Substanzen zeigen jedoch eine gute COX-1-Hemmung.

Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit sich die Position der Propenon-Teilstruktur der Chalcone auf die pharmakologische Wirksamkeit auswirkt. Hierfür wurden das Z11-A-Chalcon AK D31 und das Z11-B-Chalcon AK D32 synthetisiert und die Ergebnisse der pharmakologischen Testungen miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass AK D31 hinsichtlich der COX-1-Inhibition die potentere Verbindung ist. Beide Verbindungen zeigen keine COX-2- und 5-LOX-Aktivität.

Im Hinblick auf eine Eignung der Testsubstanzen für die topische Anwendung mit lokaler Wirkung sollten die Substanzen in der Lage sein in das Stratum corneum einzudringen (Penetration), dieses aber nicht zu durchdringen (Permeation). Hinsichtlich der log P-Werte sind für eine ausreichende Absorption Substanzen mit log P-Werten über 2 geeignet. Für die topische Anwendung mit lokaler Wirkung sind Werte zwischen 4 und 4,5 ideal [104, 119, 206]. Da die log P-Werte der Chalcone zwischen 3,0 und 4,6 liegen (HPLC-Methode), sollte eine Absorption der Substanzen problemlos möglich sein. Möglicherweise ist AK D34 (log P 3,0) für eine ausreichende Permeation in das Stratum corneum zu wenig lipophil. AK D31 (log P 4,5) und AK D33 (log P 4,2) weisen log P-Werte im idealen Bereich auf. Bei AK D32 besteht aufgrund der höheren Lipophilie (log P 4,6) die Gefahr einer Permeation der Hornschicht.

Bei der topischen Anwendung sollten die Substanzen ein Molekulargewicht von 500 g/mol nicht überschreiten [118, 119]. Bei einer Betrachtung der Molekülgrößen der

Testverbindungen fällt auf, dass alle Chalone Molekulargewichte besitzen, die deutlich größer als 500 g/mol sind (566 – 610 g/mol). Dieser Faktor führt zu der Einschätzung, dass die Chalone trotz guter Lipophilie-Werte für eine topische Anwendung weniger geeignet sind. Eine Verkleinerung der Grundstruktur unter Beibehaltung der pharmakophoren Gruppen sollte Gegenstand weitergehender Untersuchungen sein.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und pharmakologische Charakterisierung von COX-1-, COX-2- und 5-LOX-Inhibitoren, die zur Behandlung entzündlicher Dermatosen für die topische Anwendung geeignet sein sollten. Hierfür wurden zwei Strukturklassen - die sogenannten Imidazothiazole und die Chalcone - entworfen und synthetisiert sowie in verschiedenen *in vitro*-Testsystemen auf ihre pharmakologische Wirksamkeit untersucht. Im Folgenden werden die zentralen Ergebnisse sowie sich daraus ergebende Schlussfolgerungen zusammengefasst.

Für die Darstellung der Leitsubstanz der Imidazothiazole, AK D19, wurde eine vierstufige Synthese entwickelt. Eine Derivatisierung der Leitstruktur erfolgte anhand des Topliss-Schemas. Hinsichtlich der COX-1-Inhibition zeigen sich AK D21, AK D22 und AK D24 potenter als die Referenzsubstanz Licofelon. Die COX-2-Hemmwerte von AK D22 und AK D14 liegen in einem ähnlichen Bereich wie die von Licofelon, AK D24 erweist sich mit einer moderaten Hemmung potenter als die Referenz. Die 5-LOX-Hemmung von AK D20 und AK D22 ist nur schwach ausgeprägt und somit schlechter als die von Licofelon. Als dualer Hemmstoff der COX-1, COX-2 und 5-LOX kommt aus der Licofelon-Reihe nur AK D22 in Frage. Im Viabilitätsassay zeigte keine der Testverbindungen ein cytotoxisches Potential. Bezüglich der Eignung der Substanzen für die topische Anwendung bleibt festzuhalten, dass die Lipophilie der Imidazothiazole möglicherweise zu gering für eine Penetration ins Stratum corneum sein könnte. Die Verwendung von Prodrugs in Form einer Veresterung der Säurefunktion würde die log P-Werte der Testverbindungen erhöhen und stellt eine aussichtsreiche Strategie für weiterführende Modifikationen dar. Des Weiteren scheint eine strukturelle Weiterentwicklung der Moleküle anhand des Topliss-Schemas vielversprechend, um die Wirksamkeit der Grundstruktur weiter zu optimieren. Da kürzlich die Wirkung von Licofelon als Inhibitor der mikrosomalen Prostaglandin E₂-Synthase-1 bekannt wurde (IC₅₀ 6 µM)[102], wäre eine Untersuchung der Wirksamkeit der Imidazothiazole hinsichtlich dieses Targets sinnvoll.

Die Substanzklasse der Chalcone lässt sich in Z11-A- und Z11-B-Chalcone unterteilen. Für beide Grundstrukturen wurden vier- bzw. fünfstufige Synthesen entwickelt und die Leitstrukturen mit verschiedenen funktionellen Gruppen substituiert. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Chalcone bevorzugt in der E-Konfiguration und der *s-cis*-Konformation vorliegen. Da mit der Kombination zweier antiinflammatorisch wirksamer Substanzklassen ein synergistischer Effekt angestrebt wurde, wurden die Testergebnisse der Chalcone mit dem Z11-Derivat D4 und dem Naturstoff Licochalcon A verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass bezüglich der COX-1-Inhibition eine vergleichbare inhibitorische Aktivität erzielt werden konnte. Keine der Testverbindungen zeigt eine Hemmung gegenüber der Cyclooxygenase 2. Es konnte jedoch mit AK D34 eine Substanz dargestellt werden, die eine moderate Hemmung der

5-LOX aufweist. Im Viabilitätsassay konnte bei keinem der Chalcone eine Cytotoxizität nachgewiesen werden, die Viabilität der Zellen bei einer Einwirkung von AK D34 (100 μM) ist jedoch grenzwertig. Hinsichtlich der Lipophilie liegen die log P-Werte aller Chalcone im angestrebten Bereich. Als problematisch ist das hohe Molekulargewicht der Substanzen zu beurteilen. Eine Verkleinerung der Grundstruktur unter Beibehaltung der pharmakophoren Gruppen sollte deshalb Gegenstand weiterer Derivatisierungen sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Imidazothiazole vielversprechende Strukturen für weiterführende Untersuchungen aufweisen. Neben der angestrebten Einführung weiterer Substituenten anhand des Topliss-Schemas ist auch eine Erweiterung des pharmakologischen Profils als sinnvoll zu betrachten. Hierbei sollte vor allem eine Untersuchung der inhibitorischen Aktivität der Testverbindungen gegenüber der mPGES-1 im Vordergrund stehen. Bezüglich der Chalcone bleibt festzuhalten, dass die Kombination zweier antiinflammatorisch wirksamer Substanzklassen nicht zum gewünschten Erfolg einer dualen COX/LOX-Hemmung führte. Eine Verkleinerung der Molekülstruktur sollte hier das vorrangige Ziel weiterer Modifikationen sein. Eine Optimierung der Wirksamkeit könnte durch den Austausch funktioneller Gruppen erzielt werden.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Angaben

7.1.1 Chemikalien

Firma Merck KGaA, Darmstadt (D)

Firma Acros Organics, Fisher Scientific GmbH, Nidderau (D)

Firma Fluka Chemie AG, Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim und Deisenhofen (D)

Firma Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)

7.1.2 Schmelztemperatur

Geräte: 1. < 200°C

Apparatur nach Dr. Tottoli (Firma Büchi, Flawil)

(Institut für Pharmazie, Universität Mainz)

2. > 200°C

Electrothermal IA 9200 (Institut für Pharmazie, Universität Mainz)

Die Angaben erfolgen in °C und sind nicht korrigiert.

Abkürzung: Z: Zersetzung

7.1.3 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC): DC-Kunststofffolien, Kieselgel 60 F₂₄₅,

Firma Merck KGaA, Darmstadt, Art. Nr. 1.05735

Säulenchromatographie (SC): Kieselgel 60, Korngröße 0,063-0,200mm,

Firma Merck KGaA, Darmstadt, Art. Nr. 1.07734

Die Mischverhältnisse der angegebenen Fließmittel beziehen sich auf Volumenanteile.

7.1.4 NMR-Spektroskopie

Gerät: Bruker AC 300 (300 MHz)
(Institut für Pharmazie, Universität Mainz)

Abkürzungen:

$^1\text{H-NMR}$

s:	Singulett
bs:	breites Singulett
d:	Dublett
d..:	Dublett vom ...
t:	Triplett
q:	Quartett
m:	Multiplett
p...:	pseudo...

$^{13}\text{C-NMR}$

p:	primär
s:	sekundär
t:	tertiär
q:	quartär

Lösungsmittel: CDCl_3 , DMSO-d_6 , Firma Deutero, Kastellaun (D)

Die Auswertung der Spektren erfolgte nach erster sowie nach höherer Ordnung. Aufgrund der komplexen Aufspaltung der aromatischen Protonen werden diese teilweise als Multiplett aufgeführt.

7.1.5 IR-Spektroskopie

Gerät: Nicolet Avatar 330 FT-IR, Thermo electron corporation
(Institut für Pharmazie, Universität Mainz, Frau N. Heindl und Frau S. Maehrlein)

Abkürzungen:

v:	Valenzschwingung
δ :	Deformationsschwingung
Γ :	out of plane-Schwingung

7.1.6 Elementaranalyse

Gerät: Heraeus CHN rapid, Carlo Erba Strumentazione, Modell 1106
(Institut für Organische Chemie, Universität Mainz, Herr W. Dindorf)

7.1.7 Massenspektrometrie

Geräte: 1. EI-MS
Varian MAT 44S (Anregungsenergie 80eV)
(Institut für Pharmazie, Universität Mainz, Herr Dr. J. Arend)

2. FD-MS
Finnigan MAT 7 (Ionisierungsenergie 5kV)
(Institut für Organische Chemie, Universität Mainz, Herr Dr. N. Hanold)

7.2 Allgemeine Synthesevorschriften

7.2.1 Erläuterung

Da einige Synthesevorschriften zur Darstellung mehrerer Testsubstanzen verwendet wurden, werden diese im Folgenden allgemein beschrieben. Bei den jeweiligen Verbindungen wird auf die allgemeine Vorschrift verwiesen.

7.2.2 Friedel-Crafts-Acylierung zur Darstellung *p*-substituierter Phenylacetophenone

Aluminiumchlorid wurde in 1,2-Dichlorethan vorgelegt und unter Rühren und Kühlen auf 0 °C das Säurechlorid zugetropft. Anschließend wurde der jeweilige Aromat langsam zugetropft. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde der Ansatz auf Eis gegossen, die organische Phase im Scheidetrichter abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit 1,2-Dichlorethan extrahiert. Nach Vereinigung der organischen Extrakte wurde mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert [149].

7.2.3 Bromierung substituierter Phenylacetophenone in α -Position

Die Verbindungen wurden nach einer modifizierten Vorschrift von Giesbrecht [119] dargestellt. Zu einer Suspension des jeweiligen substituierten 2-Phenylacetophenons in Tetrachlorkohlenstoff wurde langsam elementares Brom getropft, so dass sich die Lösung zwischendurch immer wieder entfärbte. Nach Rühren bei Raumtemperatur über Nacht wurde mit Wasser, anschließend zur Entfernung des überschüssigen Broms mit 15% wässriger Na₂S₂O₃-Lösung und noch einmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet und abrotiert; bei Kühlung (4 °C) kristallisierte das Produkt aus.

7.2.4 Kupplung eines Thiazols mit bromiertem Phenylacetophenon zur Darstellung von Imidazo[2,1-*b*]thiazolen

2-(2-Aminothiazol-4-yl)essigsäureethylester (AK D12) und das jeweilige bromierte Phenylacetophenon wurden getrennt voneinander unter leichtem Erwärmen in Ethanol gelöst. Dann wurde das Phenylacetophenon zu AK D12 getropft. Es wurde für ca. 30 h refluxiert. Anschließend wurde eine gesättigte NaHCO₃-Lösung zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde Wasser hinzugefügt und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und abrotiert.

7.2.5 Hydrolyse

Der jeweilige Ester wurde in Methanol gelöst und mit 7% wässriger NaOH-Lösung etwa 2 h refluxiert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mit 1 M HCl angesäuert. Nach Kühlung bei 4 °C fiel das gewünschte Produkt aus [141].

7.2.6 Nucleophile Substitution bromierter Carbonylverbindungen mit Thiolen

4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiol (Z11) und die jeweilige bromierte Carbonylverbindung wurden in Acetonitril gelöst und 2-3 h refluxiert. Nach dem Abkühlen wurde eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt [119].

7.2.7 Aldolreaktion zur Darstellung von Chalconen

Variante A:

Die Carbonylkomponente, die Methylenkomponente und $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8 \text{H}_2\text{O}$ wurden in Methanol gelöst. Es wurde 5-12 h bei 40 °C gerührt und dann das Lösungsmittel abrotiert. Anschließend wurde H_2O hinzugefügt, mit 1 M HCl neutralisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und eingengt. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und anschließend umkristallisiert [208].

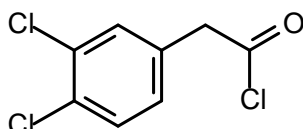
Variante B:

Zu einer Lösung von AK D30 in Methanol wurde LiOH hinzugefügt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde der jeweilige Aldehyd hinzugegeben und das Gemisch für eine Woche bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand mit Wasser versetzt. Danach wurde mit 1 M HCl neutralisiert. Das ausgefallene Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt [209].

7.3 Synthese und Analytik

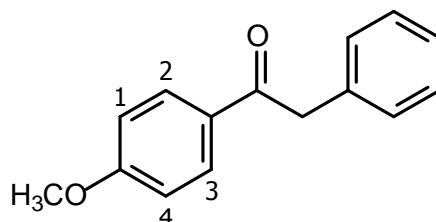
7.3.1 Imidazothiazole und Vorstufen

Substanzbezeichnung: **AK D1**
 IUPAC-Nomenklatur: 3,4-Dichlorbenzoylchlorid
 Strukturformel:



Summenformel: $C_8H_5Cl_3O$
 M_r : 221.9
 Vorschrift: 3,4-Dichlorphenylelessigsäure und Thionylchlorid wurden unter Feuchtigkeitsausschluss refluxiert, bis die Gasentwicklung beendet war (ca. 30 min). Das überschüssige Thionylchlorid wurde abdestilliert [149]. Es war keine weitere Aufarbeitung nötig.
 Ansatz: 3,4-Dichlorphenylelessigsäure 2,0 g (9,8 mmol)
 Thionylchlorid 1,1 ml (14,6 mmol)
 Aussehen: farblose Kristalle
 Ausbeute: 2,1 g (9,4 mmol) 96% der Theorie
 mp : 87 °C
 DC: R_f 0.37 (PE/EE 3:1)
 1H -NMR: 300 MHz, DMSO- d_6 , δ [ppm] = 3.61 [s, 1H, CH₂]; 3.96 [s, 1H, CH₂]; 7.24 [m, 1H, H-aromatisch]; 7.52 [m, 2H, H-aromatisch]
 IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3669, 2974 v (CH gesättigt), 2897, 2643, 1708 v (C=O), 1467 δ (CH₂), 1393, 1242, 1144, 948, 817

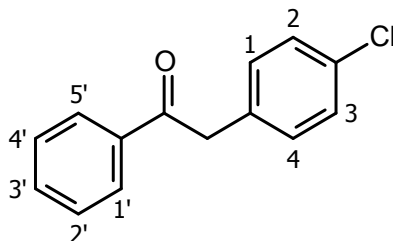
Substanzbezeichnung: **AK D2**
IUPAC-Nomenklatur: 1-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylethanon
Strukturformel:



Summenformel: $C_{15}H_{14}O_2$
 M_r : 226.1
Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.2 Friedel-Crafts-Acylierung zur Darstellung p-substituierter Phenylacetophenone
Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol
Ansatz:
Phenylacetylchlorid 4,3 ml (32,2 mmol)
Anisol 7,0 ml (64,7 mmol)
 $AlCl_3$ 9,5 g (71,2 mmol)
1,2-Dichlorethan 20 ml
Aussehen: farbloser Feststoff
Ausbeute: 4,3 g (19,0 mmol) 59% der Theorie
mp: 77 °C (Lit. 77 °C [210])
DC: R_f 0.2 (PE/EE 10:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 3.86 [s, 3H, H_3CO]; 4.23 [s, 2H, CH_2]; 6.92 [pd, 2H, 3J 8.9 Hz, H-1 u. H-4]; 7.26 – 7.32 [m, 5H, H-aromatisch]; 7.80 [pd, 2H, 3J 8.9 Hz, H-2 u. H-3]
IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2978 ν (CH gesättigt), 2929, 2901, 2361, 1675 ν (C=O), 1597 ν (C=C aromatisch), 1569, 1507, 1417 δ (CH_2), 1340, 1258, 1176
MS: EI-MS: m/z (rel. Int.) = 135 (100%); 77 (32%); 92 (24%); 107 (12%)

Substanzbezeichnung: **AK D3**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(4-Chlorphenyl)-1-phenylethanon

Strukturformel:



Summenformel: $C_{14}H_{11}ClO$

M_r : 230.1

Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.2 Friedel-Crafts-Acylierung zur Darstellung p-substituierter Phenylacetophenone

Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol

Ansatz:

4-Chlorphenylacetylchlorid	5,0 g	(32,2 mmol)
Benzol	2,6 ml	(30,8 mmol)
$AlCl_3$	4,9 g	(36,9 mmol)
1,2-Dichlorethan	15 ml	

Aussehen: farbloser Feststoff

Ausbeute: 2,7 g (13,8 mmol) 45% der Theorie

mp: 133 °C (Lit. 133 °C [211])

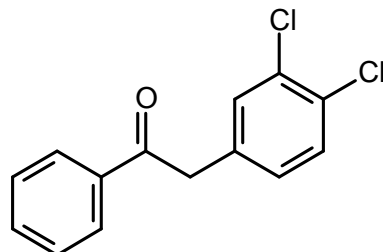
DC: R_f 0.3 (PE/EE 10:1)

1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 4.26 [s, 2H, CH_2]; 7.19 [pd, 2H, 3J 8.3 Hz, H-1 u. H-4]; 7.30 [pd, 2H, 3J 8.3 Hz, H-2 u. H-3]; 7.47 [m, 2H, H-2' u. H-4']; 7.58 [m, 1H, H-3']; 8.00 [d, 2H, 3J 7.2 Hz, H-1' u. H-5']

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2983 ν (CH gesättigt), 2889, 2361, 1687 ν (C=O), 1597 ν (C=C aromatisch), 1495, 1442 δ (CH_2), 1336, 1221

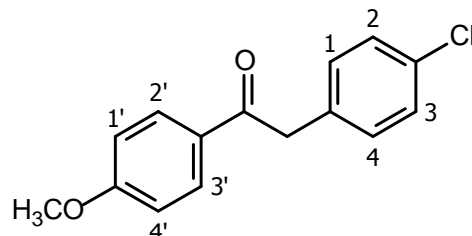
MS: EI-MS: m/z (rel. Int.) = 229 (76%, M^+); 105 (100%); 125 (14%)

Substanzbezeichnung: **AK D4**
IUPAC-Nomenklatur: 1-(3,4-Dichlorphenyl)-2-phenylethanon
Strukturformel:



Summenformel: $C_{14}H_{10}Cl_2O$
 M_r : 264.0
Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.2 Friedel-Crafts-Acylierung zur Darstellung p-substituierter Phenylacetophenone
Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol
Ansatz:
AK D1 10 g (44,7 mmol)
Benzol 3,3 g (42,7 mmol)
 $AlCl_3$ 6,8 g (51,1 mmol)
1,2-Dichlorethan 25 ml
Aussehen: hellgelbe Kristalle
Ausbeute: 6,3 g (23,8 mmol) 56% der Theorie
mp: 91 °C
DC: R_f 0.65 (PE/EE 5:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 4.25 [d, 2H, CH_2]; 7.10 [m, 1H, H-aromatisch]; 7.36-7.42 [m, 2H, H-aromatisch]; 7.46-7.51 [m, 2H, H-aromatisch]; 7.58-7.60 [m, 1H, H-aromatisch]; 7.99 [m, 2H, H-aromatisch]
IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3081 v (CH aromatisch), 2901 v (CH gesättigt), 1683 v (C=O), 1597 v (C=C aromatisch), 1470 δ (CH_2), 1332, 1201, 1025, 747

Substanzbezeichnung: **AK D5**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(4-Chlorphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)ethanon
 Strukturformel:



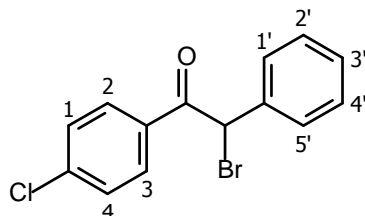
Summenformel: $C_{15}H_{13}ClO_2$
 M_r : 260.1
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.2 Friedel-Crafts-Acylierung zur Darstellung p-substituierter Phenylacetophenone
 Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol
 Ansatz:

Anisol	3,3 ml (30,8 mmol)
4-Chlorphenylacetylchlorid	4,3 ml (32,3 mmol)
$AlCl_3$	4,9 g (36,9 mmol)
1,2-Dichlorethan	17 ml

Aussehen: farblose Kristalle
 Ausbeute: 5,5 g (24,3 mmol) 79% der Theorie
 mp: 136 °C
 DC: R_f 0.43 (PE/EE 5:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 3.87 [s, 3H, H_3CO]; 4.20 [s, 2H, CH_2]; 6.93 [pd, 2H, 3J 8.9 Hz, H-1' u. H-4']; 7.19 [pd, 2H, 3J 8.4 Hz, H-1 u. H-4]; 7.29 [pd, 2H, 3J 8.4 Hz, H-2 u. H-3]; 7.98 [pd, 2H, 3J 8.9 Hz, H-2' u. H-3']
 IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3657, 2983 v (CH gesättigt), 2897, 1679 v (C=O), 1597 v (C=C aromatisch), 1377, 1262, 1160, 952, 805

Substanzbezeichnung: **AK D6**
 IUPAC-Nomenklatur: (R,S)-2-Brom-1-(4-chlorphenyl)-2-phenylethanon

Strukturformel:



Summenformel: $C_{14}H_{10}BrClO$

M_r : 308.0

Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.3 Bromierung substituiertes Phenylacetophenone in α -Position

Aufreinigung: Umkristallisation aus CCl_4

Ansatz:

4-Chlor-2-phenylacetophenon	3,0 g (13,0 mmol)
Brom	0,7 ml (13,0 mmol)
Tetrachlorkohlenstoff	100 ml

Aussehen: farblose Kristalle

Ausbeute: 2,6 g (8,3 mmol) 64% der Theorie (Lit. 55% [119])

mp: 68 °C (Lit. 65 °C [119])

DC: R_f 0.63 (PE/EE 10:1)

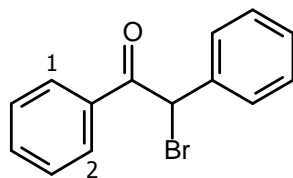
1H -NMR: 300 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 7.18 [s, 1H, CHBr]; 7.36 [m, 3H, H-2' u. H-3' u. H-4']; 7.52 [pd, 2H, 3J 6.9 Hz, H-1' u. H-5']; 7.60 [pd, 2H, 3J 8.6 Hz, H-1 u. H-4]; 8.07 [pd, 2H, 3J 8.6 Hz, H-2 u. H-3]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3738, 2978 ν (CH gesättigt), 2357, 1691 ν (C=O), 1585, 1401, 1258, 1180, 1091, 1001, 854, 690

MS: FD-MS: m/z (rel. Int.) = 309.9 (100%, M^+); 307.9 (76%); 311.9 (24%); 310.9 (13%); 308.9 (10%)

Substanzbezeichnung: **AK D7**
 IUPAC-Nomenklatur: (R,S)-2-Brom-1,2-diphenylethan-1-on

Strukturformel:



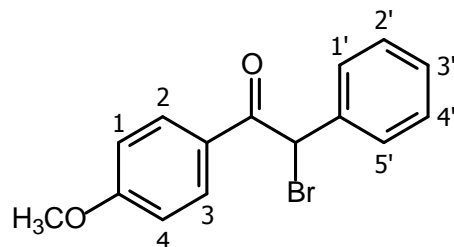
Summenformel: $C_{14}H_{11}BrO$
 M_r : 274.0
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.3 Bromierung substituiertes Phenylacetophenone in α -Position
 Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol
 Ansatz:

2-Phenylacetophenon	2,5 g	(12,7 mmol)
Brom	0,7 ml	(12,7 mmol)
Tetrachlorkohlenstoff	80 ml	

Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 2,4 g (8,7 mmol) 69% der Theorie
 mp: 56 °C (Lit. 55-56 °C [212])
 DC: R_f 0.57 (PE/EE 10:1)
 1H -NMR: 300MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 6.38 [s, 1H, CHBr]; 7.36 [m, 3H, H-aromatisch]; 7.46 [m, 2H, H-aromatisch]; 7.53 [m, 3H, H-aromatisch]; 7.99 [d, 2H, 3J 8.1 Hz, H-1 u. H-2]
 IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2962 ν (CH gesättigt), 1687 ν (C=O), 1589, 1491 ν (C=C aromatisch), 1450, 1274, 1217, 1176
 MS: EI-MS: m/z (rel. Int.) = 105 (100%); 77 (36%); 90 (17%)

Substanzbezeichnung: **AK D8**
 IUPAC-Nomenklatur: (R,S)-2-Brom-1-(4-methoxyphenyl)-2-phenylethanon

Strukturformel:



Summenformel: $C_{15}H_{13}BrO_2$

M_r : 304.0

Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.3 Bromierung substituiertes Phenylacetophenone in α -Position

Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol

Ansatz:

AK D2	3,7 g	(16,4 mmol)
Brom	0,8 ml	(16,4 mmol)
CCl_4	140 ml	

Aussehen: farbloser Feststoff

Ausbeute: 3,2 g (10,5 mmol) 64% der Theorie

mp: 109 °C

DC: R_f 0.2 (PE/EE 10:1)

1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 3.85 [s, 3H, H_3CO]; 6.36 [s, 1H, $CHBr$]; 6.91 [m, 2H, H-1 u. H-4]; 7.35 [m, 3H, H-2' u. H-3' u. H-4']; 7.52 [m, 2H, H-1' u. H-5']; 7.98 [m, 2H, H-2 u. H-3]

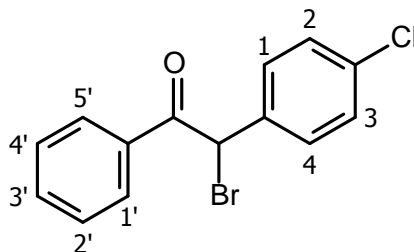
IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3653, 2978 ν (CH gesättigt), 2884, 2361, 1679 ν (C=O), 1597 ν (C=C aromatisch), 1573, 1487, 1385, 1258

MS: EI-MS: m/z (rel. Int.) = 135 (100%); 77 (24%); 92 (17%)

Substanzbezeichnung: **AK D9**

IUPAC-Nomenklatur: (R,S)-2-Brom-2-(4-chlorphenyl)-1-phenylethanon

Strukturformel:



Summenformel: $C_{14}H_{10}BrClO$

M_r : 308.0

Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.3 Bromierung substituiertes Phenylacetophenone in α -Position

Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (10:1)

Ansatz:	AK D3	4,7 g	(24,0 mmol)
	Brom	1,2 ml	(24,5 mmol)
	CCl_4	210 ml	

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 3,2 g (11,6 mmol) 49% der Theorie

mp: 63 °C (Lit. 63 °C [213])

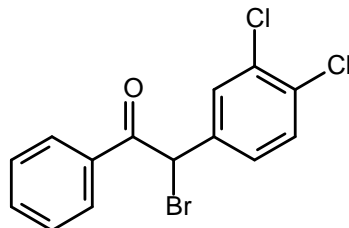
DC: R_f 0.3 (PE/EE 10:1)

1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 6.32 [s, 1H, CHBr]; 7.34 [m, 2H, H-1 u. H-4]; 7.46 [m, 4H, H-2 u. H-3 u. H-2' u. H-4']; 7.59 [m, 1H, H-3']; 7.98 [m, 2H, H-1' u. H-5']

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2987 ν (CH gesättigt), 2357, 1675 ν (C=O), 1593 ν (C=C aromatisch), 1487, 1446, 1417, 1291, 1213

Substanzbezeichnung: **AK D10**
IUPAC-Nomenklatur: (R,S)-2-Brom-1-(3,4-dichlorphenyl)-2-phenylethanon

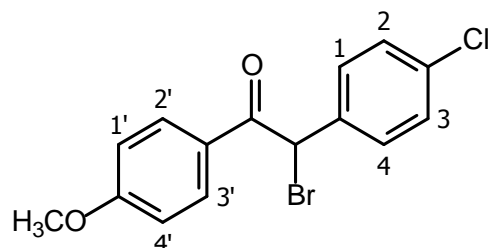
Strukturformel:



Summenformel: $C_{14}H_9BrCl_2O$
 M_r : 341.9
Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.3 Bromierung substituiertes Phenylacetophenone in α -Position
Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol
Ansatz:
AK D4 6,0 g (22,7 mmol)
Brom 1,2 ml (22,7 mmol)
 CCl_4 160 ml
Aussehen: gelber Feststoff
Ausbeute: 5,8 g (16,9 mmol) 75% der Theorie
mp: 61 °C
DC: R_f 0.65 (PE/EE 5:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 6.25 [s, 1H, CHBr]; 7.38 [m, 1H, H-aromatisch]; 7.47 [m, 3H, H-aromatisch]; 7.60 [m, 1H, H-aromatisch]; 7.65 [m, 1H, H-aromatisch]; 7.99 [pd, 2H, H-aromatisch]
IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3653, 2978 v (CH gesättigt), 2889, 2656, 1691 v (C=O), 1479 v (C=C aromatisch), 1389, 1250, 1160, 1070, 956, 792

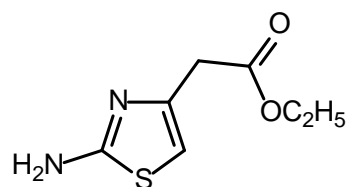
Substanzbezeichnung: **AK D11**
 IUPAC-Nomenklatur: (R,S)-2-Brom-2-(4-chlorphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)ethanon

Strukturformel:



Summenformel: $C_{15}H_{12}BrClO_2$
 M_r : 338.0
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.3 Bromierung substituierter Phenylacetophenone in α -Position
 Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol, Waschen mit Hexan
 Ansatz: AK D5 5,0 g (22,1 mmol)
 Brom 1,1 ml (22,1 mmol)
 CCl_4 160 ml
 Aussehen: gelber Feststoff
 Ausbeute: 3,9 g (12,8 mmol) 58% der Theorie
 mp: 103 °C
 DC: R_f 0.42 (PE/EE 5:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 3.87 [s, 3H, H_3CO]; 6.29 [s, 1H, $CHBr$]; 6.93 [pd, 2H, 3J 8.9 Hz, H-1' u. H-4']; 7.34 [pd, 2H, 3J 8.5 Hz, H-1 u. H-4]; 7.47 [pd, 2H, 3J 8.5 Hz, H-2 u. H-3]; 7.97 [pd, 2H, 3J 8.9 Hz, H-2' u. H-3']
 IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3653, 2974 v (CH gesättigt), 2889, 2668, 1679 v (C=O), 1601 v (C=C aromatisch), 1467, 1389, 1249, 1160, 952, 805

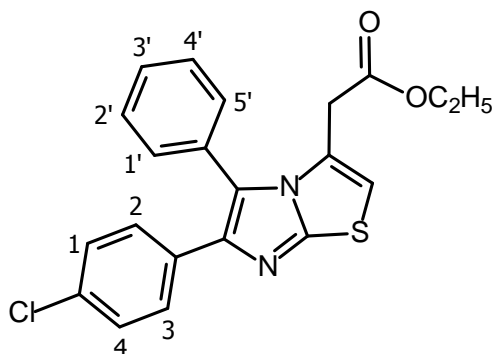
Substanzbezeichnung: **AK D12**
IUPAC-Nomenklatur: 2-(2-Aminothiazol-4-yl)essigsäureethylester
Strukturformel:



Summenformel: $C_7H_{10}N_2O_2S$
 M_r : 186.1
Vorschrift: 4-Chloracetessigsäureethylester und Thioharnstoff wurden 8 h in Ethanol refluxiert und anschließend bei RT über Nacht gerührt. Nun wurde gesättigte $NaHCO_3$ -Lösung hinzugefügt und gekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen [146].
Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol
Ansatz:
Chloracetessigsäureethylester 5,0 ml (36,5 mmol)
Thioharnstoff 2,8 g (36,5 mmol)
Ethanol 100 ml
Aussehen: hellgelbe Kristalle
Ausbeute: 5,3 g (28,5 mmol) 78% der Theorie (Lit. 70%)
mp: 93,5 °C (Lit. 94 °C [214])
DC: R_f 0.36 (PE/EE 1:2)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 1.26 [t, 3H, 3J 7.1 Hz, CH_3]; 3.55 [s, 2H, CH_2]; 4.17 [q, 2H, 3J 7.1 Hz, OCH_2]; 5.19 [bs, 2H, NH_2]; 6.34 [s, 1H, H-Thiazol]
IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3420 v (NH), 3281, 3146, 2987 v (CH gesättigt), 2737, 2365, 1708 v (C=O), 1622 δ (NH), 1524, 1368, 1315, 1262, 1160, 1029, 976, 849, 723
MS: FD-MS: m/z (rel. Int.) = 186.0 (100%, M^{+})

Substanzbezeichnung: **AK D13**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäureethylester

Strukturformel:

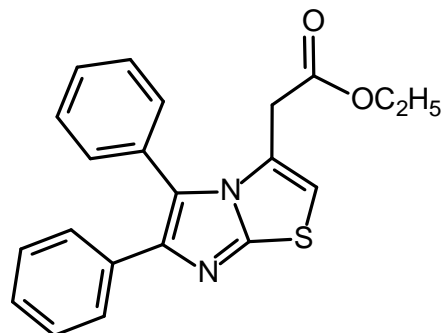


Summenformel: $C_{21}H_{17}ClN_2O_2S$
 M_r : 396.1
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.4 Kupplung eines Thiazols mit bromiertem Phenylacetophenonen zur Darstellung von Imidazo[2,1-*b*]thiazolen
 Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (1:1)
 Ansatz:
 AK D6 3,1 g (10,1 mmol)
 AK D12 1,9 g (10,1 mmol)
 Ethanol 20 ml
 Aussehen: gelber Feststoff
 Ausbeute: 250 mg (0,6 mmol) 7% der Theorie
 mp: 130 °C
 DC: R_f 0.65 (PE/EE 1:1)
 1H -NMR: 300 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 0.98 [t, 3H, CH_3]; 3.56 [s, 2H, CH_2]; 3.69 [q, 2H, OCH_2]; 7.09 [s, 1H, H-Thiazol]; 7.26 [pd, 2H, 3J 8.6 Hz, H-1 u. H-4]; 7.34 [pd, 2H, 3J 8.7 Hz, H-2 u. H-3]; 7.41 [m, 2H, H-1' u. H-5']; 7.49 [m, 3H, H-2' u. H-3' u. H-4']

¹³ C-NMR:	75 MHz, d ₆ -DMSO, δ [ppm] = 14.0 [p, CH ₃]; 33.3 [s, CH ₂]; 61.0 [s, OCH ₂]; 123.9 [q, ThiazolC-CH ₂]; 126.9 [2q, C-aromatisch]; 128.3 u. 128.5 u. 129.0 [6t, C-aromatisch]; 129.2 [2q, C-aromatisch]; 129.7 [2t, C-aromatisch]; 131.6 [q, C-aromatisch]; 132.2 [2t, C-aromatisch]; 133.6 [q, C-aromatisch]; 168.5 [q, C=O]
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3177, 2991 v (CH gesättigt), 2921, 1728 v (C=O), 1548, 1479 v (C=C aromatisch), 1185, 1091, 1013, 837 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten), 706
MS:	FD-MS: m/z (rel. Int.) = 395.7 (100%, M ⁺)

Substanzbezeichnung: **AK D14**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(5,6-Diphenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäureethylester

Strukturformel:



Summenformel: $C_{21}H_{18}N_2O_2S$
 M_r : 362.1
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.4 Kupplung eines Thiazols mit bromiertem Phenylacetophenonen zur Darstellung von Imidazo[2,1-*b*]thiazolen
 Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (1:1)
 Ansatz:
 AK D7 2,4 g (12,2 mmol)
 AK D12 2,3 g (12,2 mmol)
 Ethanol 50 ml
 Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 390 mg (1,1 mmol) 9% der Theorie
 mp: 88 °C
 DC: R_f 0.45 (PE/EE 1:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 1.12 [t, 3H, 3J 7.2 Hz, CH_3]; 3.35 [s, 2H, CH_2]; 3.91 [q, 2H, 3J 7.2 Hz, OCH_2]; 6.59 [d, 1H, H-Thiazol]; 7.19 [m, 3H, H-aromatisch]; 7.45 [m, 7H, H-aromatisch]
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 14.0 [p, CH_3]; 33.3 [s, CH_2]; 61.0 [s, OCH_2]; 123.6 [q, ThiazolC- CH_2]; 126.7 [3t, C-aromatisch]; 126.9 [q, C-aromatisch]; 127.0 u. 128.4 u.

128.9 u. 129.5 [6t, C-aromatisch]; 129.6 [q, C-aromatisch]; 132.3 [2t, C-aromatisch]; 134.7 u. 142.6 u. 148.7 [3q, C-aromatisch]; 168.5 [q, C=O]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3644, 2978 ν (CH gesättigt), 2884, 1720 ν (C=O), 1479 δ (CH gesättigt), 1385 δ (CH₃), 1250, 1160

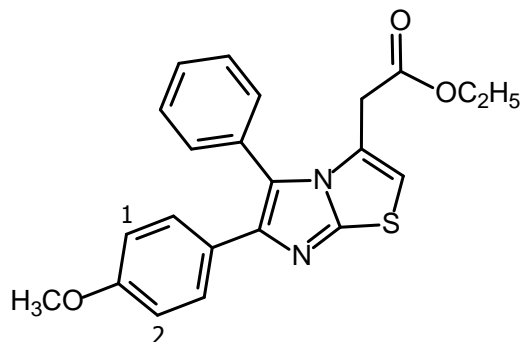
EA:

[%]	C	H	N	S
ber.	69.59	5.01	7.73	8.85
gef.	69.35	5.67	7.74	8.81

MS: FD-MS: m/z (rel. Int.) = 362.1 (100%, M⁺); 363.1 (52%); 364.1 (12%)

Substanzbezeichnung: **AK D15**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(6-(4-Methoxyphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäureethylester

Strukturformel:

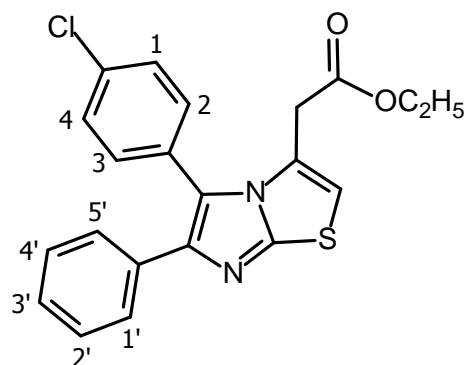


Summenformel: $C_{22}H_{20}N_2O_3S$
 M_r : 392.1
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.4 Kupplung eines Thiazols mit bromiertem Phenylacetophenonen zur Darstellung von Imidazo[2,1-*b*]thiazolen
 Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (1:1)
 Ansatz:
 AK D8 4,2 g (13,8 mmol)
 AK D12 2,6 g (13,8 mmol)
 Ethanol 65 ml
 Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 140 mg (0,3 mmol) 3% der Theorie
 mp: 142 °C
 DC: R_f 0.42 (PE/EE 1:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 1.12 [t, 3H, 3J 7.1 Hz, CH_3]; 3.34 [s, 2H, CH_2]; 3.75 [s, 3H, H_3CO]; 3.90 [q, 2H, 3J 7.1 Hz, OCH_2]; 6.56 [s, 1H, H-Thiazol]; 6.74 [pd, 2H, 3J 7.8 Hz, H-1 u. H-2]; 7.37-7.46 [m, 7H, H-aromatisch]
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 14.0 [p, CH_3]; 33.9 [s, CH_2]; 55.2 [p, H_3CO]; 61.4 [s, OCH_2]; 110.4 [t, C-Thiazol]; 113.7 [2t, C-1 u. C-3]; 122.4 u. 126.1 u. 127.2 [4q, C-

- aromatisch]; 128.3 u. 128.8 u. 129.2 [5t, C-aromatisch]; 130.3 [q, C-aromatisch]; 132.3 [2t, C-aromatisch]; 143.7 [q, ThiazolC-CH₂]; 158.6 [q, H₃CO-CAromat]; 168.1 [q, C=O]
- IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2974 v (CH gesättigt), 2835, 1740 v (C=O), 1610 v (C=C aromatisch), 1507, 1475 δ (CH gesättigt), 1368, 1250, 1172
- MS: EI-MS: m/z (rel. Int.) = 392 (100%, M⁺); 275 (39%); 391 (33%); 393 (28%); 319 (27%); 320 (26%); 276 (26%)

Substanzbezeichnung: **AK D16**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäureethylester

Strukturformel:

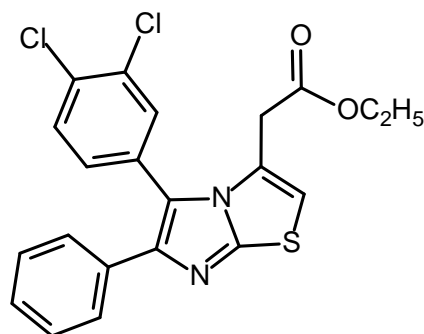


Summenformel: $C_{21}H_{17}ClN_2O_2S$
 M_r : 396.1
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.4 Kupplung eines Thiazols mit bromiertem Phenylacetophenonen zur Darstellung von Imidazo[2,1-*b*]thiazolen
 Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (1:1)
 Ansatz: AK D9 3,0 g (10,9 mmol)
 AK D12 2,0 g (10,9 mmol)
 Ethanol 50 ml
 Aussehen: hellgelber Feststoff
 Ausbeute: 55 mg (0,1 mmol) 1% der Theorie
 mp: 65 °C
 DC: R_f 0.64 (PE/EE 1:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 1.16 [t, 3H, CH_3]; 3.38 [s, 2H, CH_2]; 3.92 [q, 2H, OCH_2]; 6.61 [s, 1H, H-Thiazol]; 7.19 - 7.26 [m, 3H, H-2' u. H-3' u. H-4']; 7.34 - 7.37 [m, 2H, H-1' u. H-5']; 7.42 - 7.45 [m, 4H, H-1 bis H-4]
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 14.0 [p, CH_3]; 34.0 [s, CH_2]; 61.6 [s, OCH_2]; 111.2 [t, C-Thiazol]; 121.8 u. 125.9 [3q,

- C-aromatisch]; 127.1 u. 128.3 [4t, C-aromatisch]; 128.6 [2q, C-aromatisch]; 129.1 u. 133.6 [5t, C-aromatisch]; 135.6 [2q, ThiazolC-CH₂ u. C-aromatisch]; 168.0 [q, C=O]
- IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2987 v (CH gesättigt), 1736 v (C=O), 1601 v (C=C aromatisch), 1475 δ (CH gesättigt), 1364, 1189, 1086, 1017, 845, 772, 698
- MS: EI-MS: m/z (rel. Int.) = 396 (100%, M⁺); 287 (62%); 288 (56%); 397 (53%); 398 (47%); 395 (31%); 324 (28%); 323 (28%); 289 (23%)

Substanzbezeichnung: **AK D17**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(5-(3,4-Dichlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäureethylester

Strukturformel:

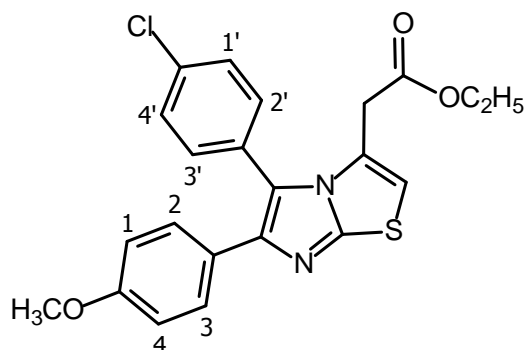


Summenformel: $C_{21}H_{16}Cl_2N_2O_2S$
 M_f : 430.0
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.4 Kupplung eines Thiazols mit bromiertem Phenylacetophenonen zur Darstellung von Imidazo[2,1-*b*]thiazolen
 Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (1:1)
 Ansatz:
 AK D10 5,8 g (16,9 mmol)
 AK D12 3,1 g (16,9 mmol)
 Ethanol 85 ml
 Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 300 mg (0,7 mmol) 4% der Theorie
 mp: 146 °C
 DC: R_f 0.46 (PE/EE 1:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 1.16 [t, 3H, 3J 7.1 Hz, CH_3]; 3.40 [s, 2H, CH_2]; 3.95 [q, 2H, 3J 7.1 Hz, OCH_2]; 6.63 [s, 1H, H-Thiazol]; 7.20 – 7.29 [m, 4H, H-aromatisch]; 7.43 – 7.46 [pd, 2H, 3J 7.5 Hz, H-aromatisch]; 7.52 – 7.55 [m, 2H, H-aromatisch]
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 14.0 [p, CH_3]; 34.0 [s, CH_2]; 61.9 [s, OCH_2]; 111.6 [t, C-Thiazol]; 125.8 [3q, ThiazolC-

	CH ₂ u. C-aromatisch]; 127.2 u. 127.3 u. 128.4 [5t, C-aromatisch]; 130.2 [3q, C-aromatisch]; 130.7 u. 131.6 [2t, C-aromatisch]; 133.0 [2q, C-aromatisch]; 133.9 [t, C-aromatisch]; 168.0 [q, C=O]
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2917 ν (CH gesättigt), 1732 ν (C=O), 1675, 1581, 1495 ν (C=C aromatisch), 1364, 1221, 1189, 1095
MS:	FD-MS: m/z (rel. Int.) = 430.2 (100%, M ⁺), 432.3 (73%), 431.2 (23%), 433.3 (19%), 434.3 (13%)

Substanzbezeichnung: **AK D18**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäureethylester

Strukturformel:



Summenformel: $C_{22}H_{19}ClN_2O_3S$
 M_r : 426.1
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.4 Kupplung eines Thiazols mit bromiertem Phenylacetophenonen zur Darstellung von Imidazo[2,1-*b*]thiazolen
 Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (1:1)
 Ansatz: AK D11 3,9 g (12,8 mmol)
 AK D12 2,4 g (12,8 mmol)
 Ethanol 60 ml
 Aussehen: hellbrauner Feststoff
 Ausbeute: 210 mg (0,5 mmol) 4% der Theorie
 mp: 102 °C
 DC: R_f 0.21 (PE/EE 1:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 1.15 [t, 3H, 3J 7.1 Hz, CH_3]; 3.37 [s, 2H, CH_2]; 3.88 [s, 3H, H_3CO]; 3.92 [q, 2H, 3J 7.1 Hz, OCH_2]; 6.59 [s, 1H, H-Thiazol]; 6.76 [pd, 2H, 3J 8.9 Hz, H-1 u. H-4]; 7.34-7.38 [m, 4H, H-2 u. H-3 u. H-1' u. H-4']; 7.42 [pd, 2H, 3J 8.5 Hz, H-2' u. H-3']
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 14.0 [p, CH_3]; 34.0 [s, CH_2]; 55.2 [p, H_3CO]; 61.6 [s, OCH_2]; 110.8 [t, C-Thiazol];

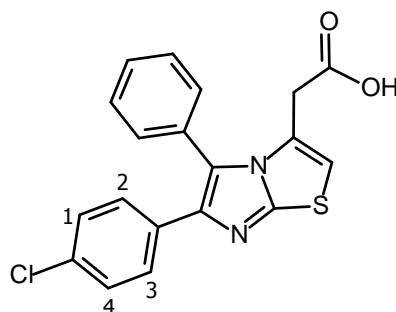
113.8 [2t, C-1 u. C-4]; 120.9 [q, ThiazolC-CH₂]; 125.9 u. 126.8 [2q, C-aromatisch]; 128.4 [2t, C-aromatisch]; 128.8 [q, C-aromatisch]; 129.1 u. 133.6 [4t, C-aromatisch]; 135.4 u. 144.1 u. 149.5 [3q, C-aromatisch]; 158.8 [q, H₃CO-C_Aromat]; 168.1 [q, C=O]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3665, 2970 ν (CH gesättigt), 2884, 2664, 1744 ν (C=O), 1516, 1471 δ (CH gesättigt), 1377 δ (CH₃), 1246, 1148, 1091, 952, 813 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten), 657

MS: FD-MS: m/z (rel. Int.) = 426.4 (100%, M⁺); 428.4 (37%); 427.4 (24%)

Substanzbezeichnung: **AK D19**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure

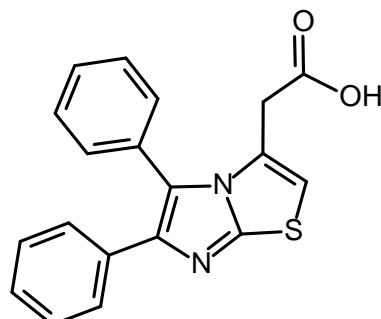
Strukturformel:



Summenformel: $C_{19}H_{13}ClN_2O_2S$
 M_r : 368.0
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.5 Hydrolyse
 Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol, Waschen mit Hexan
 Ansatz: AK D13 500 mg (1,4 mmol)
 NaOH 7% 15 ml
 MeOH 15 ml
 Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 290 mg (0,8 mmol) 57% der Theorie
 mp: 234 °C
 DC: R_f 0.54 (PE/EE 1:2 + 3% HCOOH)
 1H -NMR: 300 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 3.42 [s, 2H, CH₂]; 7.07 [s, 1H, H-Thiazol]; 7.27 [pd, 2H, 3J 8.7 Hz, H-1 u. H-4]; 7.36 [pd, 2H, 3J 8.6 Hz, H-2 u. H-3]; 7.42-7.54 [m, 5H, H-aromatisch]
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 33.3 [s, CH₂]; 124.0 [q, ThiazolC-CH₂]; 127.6 [q, C-aromatisch]; 128.3 u. 128.5 u. 129.1 [6t, C-aromatisch]; 129.2 [q, C-aromatisch]; 129.8 [2t, C-aromatisch]; 131.6 [q, C-aromatisch]; 132.2 [2t, C-aromatisch]; 133.6 u. 141.3 u. 148.9 [3q, C-aromatisch]; 170.1 [q, C=O]

IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3738, 3113, 2974 v (CH gesättigt), 2361, 1712 v (C=O), 1593 v (C=C aromatisch), 1471 δ (CH ₂), 1315, 1201, 1095, 890, 845, 686															
EA:	<table><thead><tr><th>[%]</th><th>C</th><th>H</th><th>N</th><th>S</th></tr></thead><tbody><tr><td>ber.</td><td>61.87</td><td>3.55</td><td>7.60</td><td>8.69</td></tr><tr><td>gef.</td><td>61.84</td><td>3.59</td><td>7.70</td><td>8.32</td></tr></tbody></table>	[%]	C	H	N	S	ber.	61.87	3.55	7.60	8.69	gef.	61.84	3.59	7.70	8.32
[%]	C	H	N	S												
ber.	61.87	3.55	7.60	8.69												
gef.	61.84	3.59	7.70	8.32												
MS:	FD-MS: m/z (rel. Int.) = 367.9 (100%, M ⁺); 369.9 (81%); 368.9 (35%)															

Substanzbezeichnung: **AK D20**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(5,6-Diphenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure
 Strukturformel:

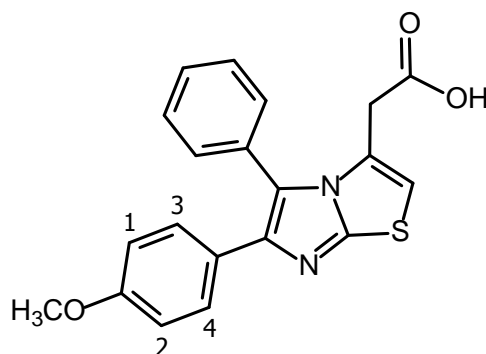


Summenformel: $C_{19}H_{14}N_2O_2S$
 M_r : 334.1
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.5 Hydrolyse
 Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol, Waschen mit Hexan
 Ansatz: AK D14 300 mg (1,1 mmol)
 NaOH 7% 11,2 ml
 Methanol 13 ml
 Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 20 mg (0,1 mmol) 5% der Theorie
 mp: 220 °C
 DC: R_f 0.45 (PE/EE 1:2 + 3% HCOOH)
 1H -NMR: 300 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 2.73 [s, 2H, CH₂]; 6.81 [s, 1H, H-Thiazol]; 7.14-7.17 [m, 3H, H-aromatisch]; 7.34 [pd, 2H, 3J 7.2 Hz, H-aromatisch]; 7.44 [ps, 5H, H-aromatisch]
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 33.1 [s; CH₂]; 123.9 [q, C-aromatisch]; 127.1 [2t, C-aromatisch]; 127.8 [q, C-aromatisch]; 128.2 [t, C-aromatisch]; 128.5 [q, C-aromatisch]; 128.8 u. 129.1 u. 130.3 [6t, C-aromatisch]; 131.6 [q, C-aromatisch]; 132.4 [2t, C-aromatisch]; 138.8

	[q, C-aromatisch]; 148.1 [q, Thiazol <u>C</u> -CH ₂]; 169.9 [q, C=O]
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3060 ν (CH aromatisch), 1593 ν (C=C aromatisch), 1507, 1458 δ (CH ₂), 1397, 1299, 1229, 1127, 1070, 972, 854, 690
EA:	[%] C H N S · H ₂ O
	ber. 64.76 4.58 7.95 9.10
	gef. 65.15 4.62 7.87 8.77
MS:	FD-MS: m/z (rel. Int.) = 333.9 (100%, M ⁺); 334.9 (62%)

Substanzbezeichnung: **AK D21**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(6-(4-Methoxyphenyl)-5-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure

Strukturformel:

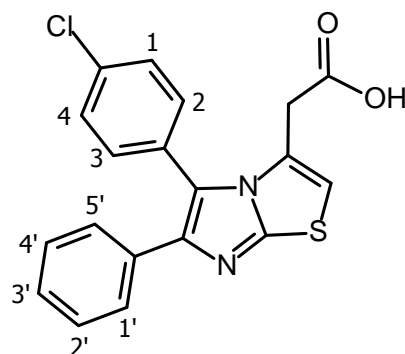


Summenformel: $C_{20}H_{16}N_2O_3S$
 M_r : 364.1
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.5 Hydrolyse
 Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol
 Ansatz: AK D15 100 mg (0,2 mmol)
 NaOH 7% 2,5 ml
 MeOH 2,5 ml
 Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 80 mg (0,2 mmol) 82% der Theorie
 mp: 289 °C (Z)
 DC: R_f 0.38 (PE/EE 2:1 + 12% HCOOH)
 1H -NMR: 300 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 3.45 [s, 2H, CH₂]; 3.70 [s, 3H, H₃CO]; 6.84 [pd, 2H, 3J 8.7 Hz, H-1 u. H-4]; 7.23 [s, 1H, H-Thiazol]; 7.29 [pd, 2H, 3J 8.7 Hz, H-2 u. H-3]; 7.46-7.48 [m, 5H, H-aromatisch]
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 33.2 [s, CH₂]; 55.4 [p, H₃CO]; 114.3 [t, C-Thiazol]; 122.9 [2q, ThiazolC-CH₂ u. C-aromatisch]; 128.2 [2q, C-aromatisch]; 128.4 u. 129.1 u. 130.1 u. 132.4 [9t, C-aromatisch]; 147.8 [2q, C-aromatisch]; 159.2 [q, H₃CO-C_Aromat]; 169.9 [q, C=O]

IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3105 v (CH aromatisch), 2880 v (CH gesättigt), 1716 v (C=O), 1614, 1519, 1393, 1250, 1193, 1025, 939, 841 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten)				
EA:	[%]	C	H	N	S
	ber.	65.92	4.43	7.69	8.80
	gef.	65.63	4.35	7.67	8.49
MS:	FD-MS: m/z (rel. Int.) = 364.1 (100%, M ⁺); 365.1 (37%)				

Substanzbezeichnung: **AK D22**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure

Strukturformel:



Summenformel: $C_{19}H_{13}ClN_2O_2S$
 M_r : 368.0
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.5 Hydrolyse
 Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol
 Ansatz: AK D16 50 mg (0,1 mmol)
 NaOH 7% 1,4 ml
 Methanol 1,5 ml
 Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 30 mg (0,1 mmol) 66% der Theorie
 mp: 234 °C
 DC: R_f 0.57 (PE/EE 2:1 + 12% HCOOH)
 1H -NMR: 300 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 3.52 [s, 2H, CH₂]; 7.20 [s, 1H, H-Thiazol]; 7.26 [m, 3H, H-2' u. H-3' u. H-4']; 7.35 [pd, 2H, 3J 6.7 Hz, H-1' u. H-5']; 7.48 [pd, 2H, 3J 8.5 Hz, H-1 u. H-4]; 7.54 [pd, 2H, 3J 8.3 Hz, H-2 u. H-3]
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 33.5 [s, CH₂]; 122.5 [q, ThiazolC-CH₂]; 127.1 [2t, C-aromatisch]; 127.5 [q, C-aromatisch]; 127.8 [t, C-aromatisch]; 128.1 [q, C-aromatisch]; 128.8 u. 129.1 [5t, C-aromatisch]; 132.7 [q,

C-aromatisch]; 134.3 [2t, C-aromatisch]; 134.8 u. 140.8 u. 148.6 [3q, C-aromatisch]; 169.9 [q, C=O]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3126, 2933 ν (CH gesättigt), 2607, 2513, 1720 ν (C=O), 1614, 1528, 1385, 1266, 1152, 1086, 1013, 764, 686

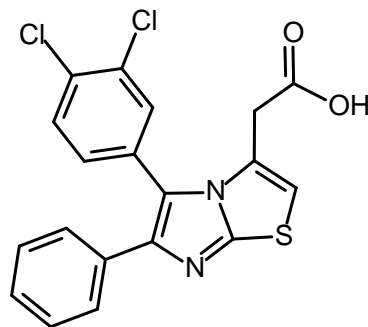
EA:

[%]	C	H	N	S
ber.	61.87	3.55	7.60	8.69
gef.	61.81	3.82	7.79	8.49

MS: FD-MS: m/z (rel. Int.) = 368.1 (100%, M⁺); 370.1 (43%); 369.1 (31%)

Substanzbezeichnung: **AK D23**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(5-(3,4-Dichlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure

Strukturformel:



Summenformel: $C_{19}H_{12}Cl_2N_2O_2S$
 M_r : 402.0
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.5 Hydrolyse
 Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol, Waschen mit Hexan
 Ansatz: AK D17 250 mg (0,6 mmol)
 NaOH 7% 6,2 ml
 MeOH 6,2 ml
 Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 40 mg (0,1 mmol) 17% der Theorie
 mp: 238 °C (Z)
 DC: R_f 0.43 (PE/EE 1:2 + 12% HCOOH)
 1H -NMR: 300 MHz, DMSO, δ [ppm] = 3.55 [s, 2H, CH₂]; 7.09 [s, 1H, H-Thiazol]; 7.19 – 7.28 [m, 3H, H-aromatisch]; 7.35 [m, 3H, H-aromatisch]; 7.68 – 7.76 [m, 2H, H-aromatisch]
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 33.8 [s, CH₂]; 112.1 [t, C-Thiazol]; 121.2 [q, ThiazolC-CH₂]; 127.1 u. 127.3 [3t, C-aromatisch]; 127.7 [q, C-aromatisch]; 128.7 [2t, C-aromatisch]; 130.3 [q, C-aromatisch]; 131.1 [t, C-aromatisch]; 131.7 u. 132.4 [2q, C-aromatisch]; 132.7 u.

134.0 [2t, C-aromatisch]; 134.3 u. 143.3 u. 149.4 [3q, C-aromatisch]; 170.1 [q, C=O]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3085 v (CH aromatisch), 2917 v (CH gesättigt), 1671 v (C=O), 1585, 1503, 1471 δ (CH₂), 1324, 1221, 1095

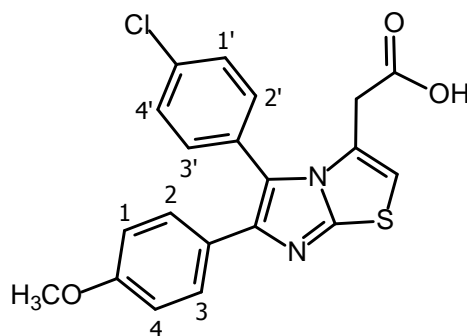
EA:

[%]	C	H	N	S
ber.	56.59	3.00	6.95	7.95
gef.	56.43	2.78	6.66	7.59

MS: FD-MS: m/z (rel. Int.) = 402.2 (100%, M⁺); 404.2 (23%); 406.2 (16%)

Substanzbezeichnung: **AK D24**
 IUPAC-Nomenklatur: 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl)essigsäure

Strukturformel:

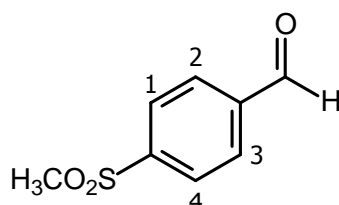


Summenformel: $C_{20}H_{15}ClN_2O_3S$
 M_r : 398.1
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.5 Hydrolyse
 Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol, Waschen mit Hexan
 Ansatz: AK D18 200 mg (0,5 mmol)
 NaOH 7% 5,2 ml
 MeOH 5,2 ml
 Aussehen: hellgelber Feststoff
 Ausbeute: 50 mg (0,1 mmol) 25% der Theorie
 mp: 254 °C (Z)
 DC: R_f 0.18 (PE/EE 1:2 + 12% HCOOH)
 1H -NMR: 300 MHz, DMSO- d_6 , δ [ppm] = 3.53 [s, 2H, CH₂]; 3.71 [s, 3H, H₃CO]; 6.87 [pd, 2H, 3J 8.8 Hz, H-1 u. H-4]; 7.22 [s, 1H, H-Thiazol]; 7.28 [pd, 2H, 3J 8.8 Hz, H-2 u. H-3]; 7.47 [pd, 2H, 3J 8.5 Hz, H-1' u. H-4']; 7.54 [pd, 2H, 3J 8.5 Hz, H-2' u. H-3']
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 33.4 [s, CH₂]; 55.4 [p, OCH₃]; 114.3 [3t, C-Thiazol u. C-1 u. C-4]; 121.7 [q, ThiazolC-CH₂]; 127.3 u. 128.3 [3q, C-aromatisch]; 128.5 u. 129.2 u. 134.3 [6t, C-aromatisch]; 134.8 u. 140.1 u.

	148.1 [3q, C-aromatisch]; 159.2 [q, H ₃ CO-C _A romat]; 169.9 [q, C=O]
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3117, 2974 ν (CH gesättigt), 2917, 2607, 2537, 2353, 1724 ν (C=O), 1622, 1511, 1401 δ (CH ₂), 1385, 1258, 1152
EA:	[%] C H N S ber. 60.22 3.79 7.02 8.04 gef. 60.09 3.56 6.73 7.81
MS:	FD-MS: m/z (rel. Int.) = 398.2 (100%, M ⁺); 399.2 (40%); 400.2 (36%); 401.2 (24%)

7.3.2 Chalcone und Vorstufen

Substanzbezeichnung: **AK D25**
 IUPAC-Nomenklatur: 4-(Methylsulfonyl)benzaldehyd
 Strukturformel:



Summenformel: $C_8H_8O_3S$
 M_r : 184.0
 Vorschrift: Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 4-(Methylmercapto)benzaldehyd in Methanol wurde eine 49,5% $KHSO_5$ -Lösung und Wasser gegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit Wasser verdünnt und mit Chloroform extrahiert. Nach Abrotieren des Lösungsmittels wurde sauberes Produkt erhalten [162].
 Ansatz: 4-(Methylmercapto)benzaldehyd 800 mg (5,4 mmol)
 Oxone® 5,0 g (16,3 mmol)
 ($2KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$)
 H_2O 40 ml
 Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 430 mg (2,3 mmol) 43% der Theorie
 mp: 158 °C
 DC: R_f 0.47 (PE/EE 1:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 3.09 [s, 3H, CH_3]; 8.08 [pd, 2H, 3J 8.3 Hz, H-2 u. H-3]; 8.12 [pd, 2H, 3J 8.3 Hz, H-1 u. H-4]; 10.13 [s, 1H, CHO]

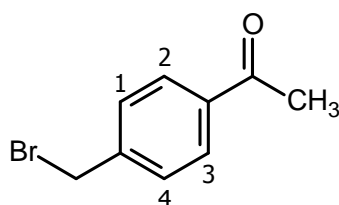
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3007 v (CH aromatisch), 2925 v (CH gesättigt), 2868, 2361, 1699 v (C=O), 1573, 1417 v (SO₂), 1389 δ (CH₃), 1283, 1193, 1144

MS: FD-MS: m/z (rel. Int.) = 184.0 (100%, M⁺)

Substanzbezeichnung: **AK D26**

IUPAC-Nomenklatur: 4-Brommethylacetophenon

Strukturformel:



Summenformel: C₉H₉BrO

M_r: 212.0

Vorschrift: 4-Methylacetophenon und *N*-Bromsuccinimid wurden 14 h in Acetonitril refluxiert. Dann wurde eingengt und Tetrachlorkohlenstoff hinzugegeben. Das ausgefallene Succinimid wurde abfiltriert und das Lösungsmittel vollständig abrotiert [161].

Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (15:1)

Ansatz: 4-Methylacetophenon 6,0 ml (45,0 mmol)

NBS 8,0 g (44,9 mmol)

Acetonitril 150 ml

Tetrachlorkohlenstoff 100 ml

Aussehen: farbloser Feststoff

Ausbeute: 6,2 g (29,1 mmol) 65% der Theorie

mp: 199 °C

DC: R_f 0.38 (PE/EE 15:1)

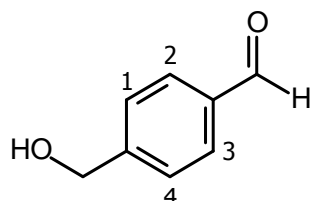
$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, CDCl_3 , δ [ppm] = 2.60 [s, 3H, CH_3]; 4.50 [s, 2H, CH_2]; 7.48 [pd, 2H, ^3J 8.2 Hz, H-1 u. H-4]; 7.93 [pd, 2H, ^3J 8.2 Hz, H-2 u. H-3]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3154, 3072 ν (CH aromatisch), 2954 ν (CH gesättigt), 2357, 1769 ν (C=O), 1671 ν (C=C aromatisch), 1605, 1413, 1364, 1291, 1262, 1185, 1001, 935, 817 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten), 649

Substanzbezeichnung: **AK D27**

IUPAC-Nomenklatur: 4-Hydroxymethylbenzaldehyd

Strukturformel:



Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$

M_r : 136.2

Vorschrift: 4-Diethoxymethylbenzaldehyd wurde bei RT langsam zu einer Suspension von LiAlH_4 in wasserfreiem Ether hinzugefügt. Die Mischung wurde 4 h unter Rückfluss gekocht und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Nun wurde langsam Wasser hinzugegeben. Die beiden Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit 2 M HCl versetzt und 5 Minuten stehen gelassen. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit H_2O gewaschen, getrocknet und abrotiert. Das Produkt wurde säulen-chromatographisch isoliert [215].

Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (2:1)

Ansatz: 4-Diethoxymethylbenzaldehyd 2,5 g (12,0 mmol)

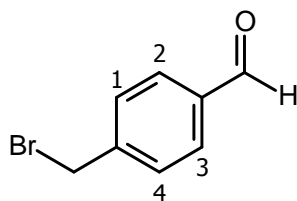
LiAlH_4 190 mg (4,9 mmol)

	Diethylether	12 ml
	H ₂ O	25 ml
	2 M HCl	12 ml
Aussehen:	hellgelber Feststoff	
Ausbeute:	1,5 g (11,0 mmol)	60% der Theorie
mp:	44,5 °C	
DC:	R _f 0.49 (PE/EE 2:1)	
¹ H-NMR:	300 MHz, CDCl ₃ , δ [ppm] = 4.79 [s, 2H, CH ₂]; 7.51 [pd, 2H, H-1 u. H-4]; 7.85 [pd, 2H, H-2 u. H-3]; 9.97 [s, 1H, CHO]	
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2860 ν (OH), 1695 ν (C=O), 1610 ν (C=C aromatisch), 1573, 1417 δ (CH ₂), 1389, 1303, 1270, 1209, 1168, 1091, 1042, 1009, 813 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten), 764	

Substanzbezeichnung: **AK D28**

IUPAC-Nomenklatur: 4-(Brommethyl)benzaldehyd

Strukturformel:



Summenformel: C₈H₇BrO

M_r: 199.1

Vorschrift: Zu einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus 4-Hydroxymethylbenzaldehyd (AK D27) und Triphenylphosphin in Dichlormethan wurde NBS in Dichlormethan zugetropft. Nach zwanzig Minuten wurde

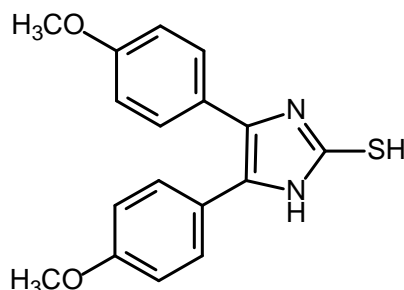
Wasser hinzugefügt und anschließend mit Dichlormethan extrahiert. Dann wurde das Lösungsmittel abrotiert und das entstandene Öl mit Hexan versetzt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurden die entstandenen Kristalle abgesaugt [216].

Ansatz:	AK D27	2,0 g	(15,0 mmol)
	PPh ₃	4,7 g	(18,0 mmol)
	NBS	3,4 g	(19,0 mmol)
	Dichlormethan	100 ml	
	H ₂ O	100 ml	
	Hexan	200 ml	
Aussehen:	farbloser Feststoff		
Ausbeute:	1,8 g (9,0 mmol)	40% der Theorie	
mp:	94 °C (Lit. 97-99 °C)		
DC:	R _f 0.86 (PE/EE 1:1)		
¹ H-NMR:	300 MHz, CDCl ₃ , δ [ppm] = 4.51 [s, 2H, CH ₂]; 7.56 [pd, 2H, ³ J 8.1 Hz, H-1 u. H-4]; 7.87 [pd, 2H, ³ J 8.1 Hz, H-2 u. H-3]; 10.0 [s, 1H, CHO]		
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2929 v (CH gesättigt), 2231, 1691 v (C=O), 1601 v (C=C aromatisch), 1573, 1426, 1397, 1295, 1205, 1164, 1091, 833 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten), 768, 723		

Substanzbezeichnung: **Z11**

IUPAC-Nomenklatur: 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-thiol

Strukturformel:



Summenformel: $C_{17}H_{16}N_2O_2S$

M_r : 312.1

Vorschrift: *p*-Anisoin und Ammoniumthiocyanat wurden in DMF gelöst und 2 h refluxiert. Anschließend wurde auf Eiswasser gegossen und der entstandene Niederschlag abgesaugt [126].

Aufreinigung: Umkristallisation aus Ethanol

Ansatz: *p*-Anisoin 24 g (88,1 mmol)
 NH₄SCN 13,4 g (176,3 mmol)
 DMF 50 ml

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 12,6 g (40,5 mmol) 46% der Theorie (Lit. 46% [119])

mp: 269 °C (Lit. 263-264 °C [126])

DC: R_f 0.21 (PE/EE 1:1)

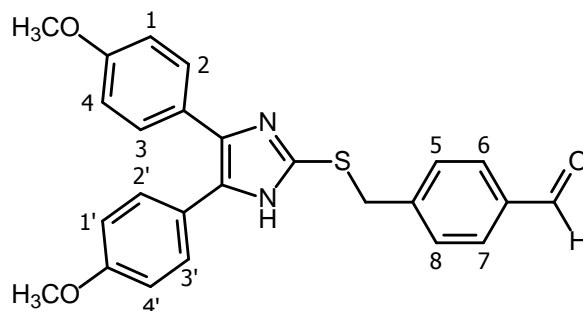
¹H-NMR: 300 MHz, d₆-DMSO, δ [ppm] = 3.70 [d, 6H, H₃CO]; 6.85 [pd, 4H, H-aromatisch]; 7.60 [pd, 4H, H-aromatisch]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3268 ν (NH), 2977 ν (CH gesättigt), 1609 δ (NH), 1508 ν (C=C aromatisch), 1454, 1296, 1248, 1172, 1026, 830 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten)

MS: EI-MS: m/z (rel. Int.) = 312 (100%, M⁺); 297 (37%)

Substanzbezeichnung: **AK D29**
 IUPAC-Nomenklatur: 4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)methyl)benzaldehyd

Strukturformel:



Summenformel: $C_{25}H_{22}N_2O_3S$
 M_r : 430.5
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.6 Nucleophile Substitution bromierter Carbonylverbindungen mit Thiolen
 Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (2:1); anschließend Ausfällen mit Ethylacetat
 Ansatz: Z11 1,0 g (5,0 mmol)
 AK D28 1,2 g (6,0 mmol)
 Acetonitril 25 ml
 Aussehen: farbloser Feststoff
 Ausbeute: 740 mg (1,7 mmol) 64% der Theorie
 mp: 113 °C
 DC: R_f 0.34 (PE/EE 1:1)
 1H -NMR: 300 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 3.77 [s, 6H, H_3CO]; 4.72 [s, 2H, CH_2]; 6.82 [pd, 4H, 3J 8.8 Hz, H-1 u. H-4 u. H-1' u. H-4']; 7.48 [pd, 4H, 3J 8.7 Hz, H-2 u. H-3 u. H-2' u. H-3']; 7.56 [pd, 2H, 3J 8.0 Hz, H-5 u. H-8]; 7.77 [pd, 2H, 3J 7.9 Hz, H-6 u. H-7]; 9.83 [s, 1H, CHO]
 ^{13}C -NMR: 75 MHz, $CDCl_3$, δ [ppm] = 40.5 [s, CH_2]; 55.4 [2p, H_3CO]; 114.6 [4t, C-1 u. C-4 u. C-1' u. C-4']; 118.2 u. 129.6 [4q, C-aromatisch]; 130.0 u. 130.1 u. 130.2 [8t, C-

aromatisch]; 136.0 [q, AromatC-CHO]; 136.8 [q, ImidazolC-SR]; 141.1 [q, CH₂-CAromat]; 160.8 [2q, H₃CO-CAromat]; 191.5 [t, C=O]

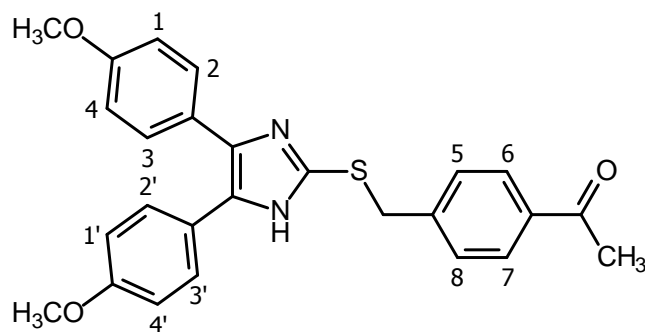
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2983 ν (CH gesättigt), 1732 ν (C=O), 1601 ν (C=C aromatisch), 1507, 1368, 1230, 1185, 1042, 935, 829 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten), 780

MS: EI-MS: m/z (rel. Int.) = 430 (21%; M⁺); 253 (100%); 238 (49%); 119 (24%)

Substanzbezeichnung: **AK D30**

IUPAC-Nomenklatur: 1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)ethanon

Strukturformel:



Summenformel: $C_{26}H_{24}N_2O_3S$

M_r : 444.2

Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.6 Nucleophile Substitution bromierter Carbonylverbindungen mit Thiolen

Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (1:1); anschließend Ausfällen mit Ethylacetat

Ansatz: Z11 3,0 g (9,7 mmol)

AK D26 2,0 g (7,8 mmol)

Acetonitril 50 ml

Aussehen: hellgelber Feststoff

Ausbeute: 1,2 g (2,7 mmol) 33% der Theorie

mp: 195 °C

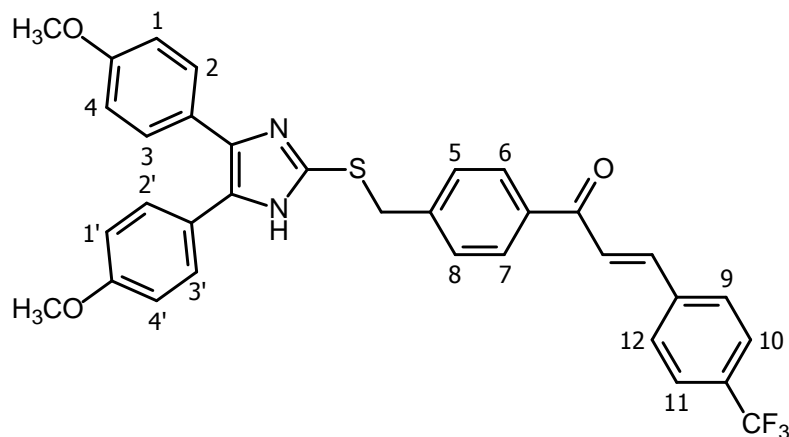
DC: R_f 0.53 (PE/EE 1:1)

1H -NMR: 300 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 2.54 [s, 3H, CH_3]; 3.73 [s, 3H, H_3CO]; 3.76 [s, 3H, H_3CO]; 4.41 [s, 2H, CH_2]; 6.85 [pd, 2H, 3J 8.1 Hz, H-1 u. H-4]; 6.94 [pd, 2H, 3J 7.7 Hz, H-1' u. H-4']; 7.27 [pd, 2H, 3J 8.3 Hz, H-2 u. H-3]; 7.37 [pd, 2H, 3J 7.5 Hz, H-2' u. H-3']; 7.50 [pd, 2H, 3J 8.1 Hz, H-6 u. H-7]; 7.89 [pd, 2H, 3J 8.1 Hz, H-5 u. H-8]

- ^{13}C -NMR: 75 MHz, CDCl_3 , δ [ppm] = 26.7 [p, CH_3]; 40.4 [s, CH_2]; 55.4 [2p, H_3CO]; 113.7 u. 114.6 [5t, C-aromatisch]; 118.3 [2q, C-aromatisch]; 128.8 [t, C-aromatisch]; 129.5 [2q, C-aromatisch]; 129.7 u. 130.0 u. 131.1 [6t, C-aromatisch]; 136.7 u. 137.1 u. 139.5 [3q, C-aromatisch]; 160.7 [2q, H_3CO -C-Aromat]; 197.5 [q, C=O]
- IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2840 v (CH gesättigt), 1679 v (C=O), 1605 v (C=C aromatisch), 1520, 1495, 1413 δ (CH_3), 1348, 1238, 1176, 1103, 1025, 956, 829 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten), 743
- MS: EI-MS: m/z (rel. Int.) = 444 (21%, M^+); 253 (100%); 238 (44%); 133 (40%)

Substanzbezeichnung: **AK D31**
 IUPAC-Nomenklatur: (*E*)-1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)phenyl)-3-(4-(trifluormethyl)phenyl)prop-2-en-1-on

Strukturformel:



Summenformel: $C_{34}H_{27}F_3N_2O_3S$
 M_r : 600.2
 Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.7 Aldolreaktion zur Darstellung von Chalconen, Variante A
 Aufreinigung: SC: Kieselgel, Eluent PE/EE (2:1);
 Umkristallisation aus $CHCl_3$ /Hexan (1:1)
 Ansatz:

4-(Trifluormethyl)benzaldehyd	0,6 g	(3,4 mmol)
AK D30	1,5 g	(3,4 mmol)
$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$	1,1 g	(3,4 mmol)
Methanol	14 ml	
H_2O	14 ml	

 Aussehen: gelber Feststoff
 Ausbeute: 590 mg (1,0 mmol) 29% der Theorie
 mp: 198 °C
 DC: R_f 0.67 (PE/EE 1:1)
 1H -NMR: 300 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 3.72 [s, 3H, H_3CO]; 3.75 [s, 3H, H_3CO]; 4.44 [s, 2H, CH_2]; 6.85 [pd, 2H, 3J 8.6 Hz,

H-1 u. H-4]; 6.93 [pd, 2H, 3J 8.6 Hz, H-1' u. H-4']; 7.27 [pd, 2H, 3J 8.6 Hz, H-2 u. H-3]; 7.38 [pd, 2H, 3J 8.6 Hz, H-2' u. H-3']; 7.56 [pd, 2H, 3J 8.1 Hz, H-9 u. H-12]; 7.75-7.82 [m, 3H, CO-CH= u. H-5 u. H-8]; 8.05-8.14 [m, 5H, =CH-Aromat u. H-6 u. H-7 u. H-10 u. H-11]

^{13}C -NMR: 75 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 37.0 [s, CH₂]; 55.3 [p, H₃CO]; 55.5 [p, H₃CO]; 114.0 [2t, C-1 u. C-4]; 114.4 [2t, C-1' u. C-4']; 123.5 [q, CF₃]; 125.1 [t, CO-CH=]; 126.0 u. 126.0 [2t, C-aromatisch]; 127.9 u. 128.0 [4q, C-aromatisch]; 128.4 u. 129.2 u. 129.5 u. 129.6 u. 129.8 [10t, C-aromatisch]; 136.4 u. 136.9 u. 138.3 [3q, C-aromatisch]; 139.1 [q, Imidazol-C-SR]; 142.17 [t, =CH-Aromat]; 144.6 [q, CH₂-CAromat]; 158.3 [q, H₃CO-CAromat]; 159.0 [q, H₃CO-CAromat]; 188.9 [q, C=O]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2353, 1659 ν (C=O), 1614 δ (NH), 1503, 1467, 1413 δ (CH₂), 1319, 1246, 1160, 1111, 1017, 829 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten), 739

EA:

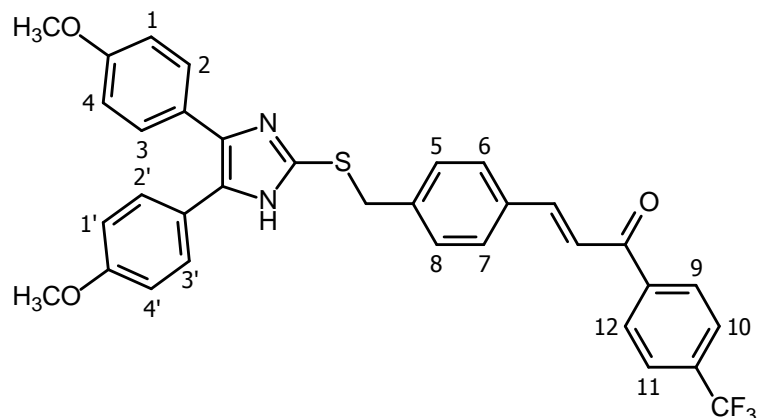
[%]	C	H	N	S
ber.	67.99	4.53	4.66	5.34
gef.	67.38	4.41	4.60	5.61

MS: FD-MS: m/z (rel. Int.) = 600.2 (100%, M⁺); 601.2 (30%)

Substanzbezeichnung: **AK D32**

IUPAC-Nomenklatur: (*E*)-3-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)prop-2-en-1-on

Strukturformel:



Summenformel: $C_{34}H_{27}F_3N_2O_3S$

M_r : 600.2

Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.7 Aldolreaktion zur Darstellung von Chalconen, Variante A

Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE / EE (1:1)

Ansatz:	AK D29	1,4 g	(3,2 mmol)
	Trifluormethylacetophenon	600 mg	(3,2 mmol)
	Ba(OH) ₂ · 8 H ₂ O	1,0 g	(3,2 mmol)
	Methanol	15 ml	
	Wasser	15 ml	

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 170 mg (0,3 mmol) 9% der Theorie

mp: 105-110 °C

DC: R_f 0.49 (PE/EE 1:1)

¹H-NMR: 300 MHz, d₆-DMSO, δ [ppm] = 3.73 [s, 3H, H₃CO]; 3.75 [s, 3H, H₃CO]; 4.39 [s, 2H, CH₂]; 6.87 [pd, 2H, ³J 8.1 Hz, H-1 u. H-4]; 6.95 [pd, 2H, ³J 8.1 Hz, H-1' u. H-4']; 7.26

[pd, 2H, 3J 8.6 Hz, H-5 u. H-8]; 7.37 [pd, 2H, 3J 8.4 Hz, H-6 u. H-7]; 7.47 [pd, 2H, 3J 8.1 Hz, H-2 u. H-3]; 7.75 [d, 1H, 3J 15.6 Hz, =CH-CO]; 7.84 [pd, 2H, 3J 8.1 Hz, H-2' u. H-3']; 7.92-7.94 [m, 3H, Aromat-CH= u. H-10 u. H-11]; 8.30 [pd, 2H, 3J 7.9 Hz, H-9 u. H-12]

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, CDCl_3 , δ [ppm] = 39.7 [s, CH_2]; 55.3 [2p, H_3CO]; 114.1 [4t, C-1 u. C-4 u. C-1' u. C-4']; 121.6 [t, =CH-CO]; 125.7 u. 128.9 u. 129.8 [12t, C-aromatisch]; 133.8 u. 137.4 u. 141.4 [10q, C-aromatisch]; 145.5 [t, Aromat-CH=]; 159.1 [2q, $\text{H}_3\text{CO-C}$ Aromat]; 189.6 [q, C=O]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3653, 2970 v (CH gesättigt), 2889, 2660, 1605 v (C=O), 1467 δ (CH_2), 1397, 1250, 1156, 1070, 948, 829 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten)

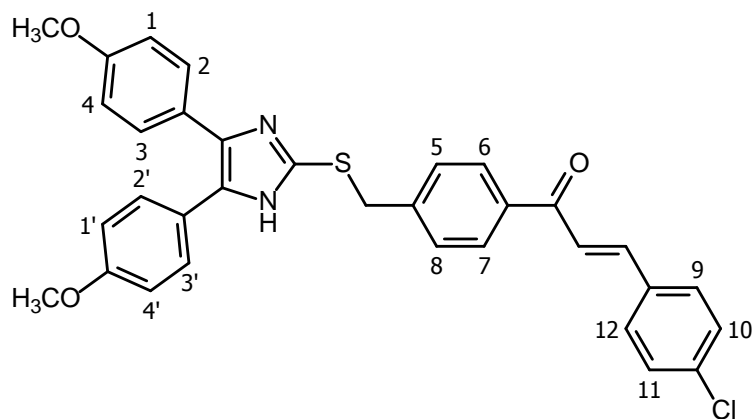
EA:

[%]	C	H	N	S
ber.	67.99	4.53	4.66	5.34
gef.	67.82	4.74	4.38	3.55

MS: FD-MS: m/z (rel. Int.) = 599.8 (100%, M^+); 600.8 (42%); 601.8 (13%)

Substanzbezeichnung: **AK D33**
 IUPAC-Nomenklatur: (*E*)-1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)-3-(4-chlorphenyl)prop-2-en-1-on

Strukturformel:



Summenformel: $C_{33}H_{27}ClN_2O_3S$

M_r : 566.1

Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.7 Aldolreaktion zur Darstellung von Chalconen, Variante B

Nach dem Ansäuern fiel ein hellgelber Niederschlag aus, der abgesaugt wurde.

Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (1:1)

Ansatz:	AK D30	1,0 g	(2,3 mmol)
	4-Chlorbenzaldehyd	300 mg	(2,3 mmol)
	LiOH	110 mg	(4,5 mmol)
	Methanol	10 ml	
	Wasser	10 ml	

Aussehen: grün-gelber Feststoff

Ausbeute: 600 mg (1,1 mmol) 47% der Theorie

mp: 110 °C

DC: R_f 0.56 (PE/EE 1:1)

1H -NMR: 300 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 3.73 [s, 3H, H_3CO]; 3.76 [s, 3H, H_3CO]; 4.45 [s, 2H, CH_2]; 6.86 [pd, 2H, 3J 8.8 Hz,

H-1 u. H-4]; 6.94 [pd, 2H, 3J 8.8 Hz, H-1' u. H-4']; 7.28 [pd, 2H, 3J 8.7 Hz, H-2 u. H-3]; 7.39 [pd, 2H, 3J 8.7 Hz, H-2' u. H-3']; 7.54 [m, 4H, H-5 bis H-8]; 7.72 [d, 1H, 3J 15.5 Hz, CO-CH=]; 7.95 [m, 3H, =CH-Aromat u. H-10 u. H-11]; 8.11 [pd, 2H, 3J 8.1 Hz, H-9 u. H-12]

^{13}C -NMR: 75 MHz, d_6 -DMSO, δ [ppm] = 37.0 [s, CH₂]; 55.3 [p, H₃CO]; 55.5 [p, H₃CO]; 114.0 [2t, C-1 u. C-4]; 114.4 [2t, C-1' u. C-4']; 123.1 [t, CO-CH=]; 123.5 u. 127.9 u. 128.0 [3q, C-aromatisch]; 128.4 u. 129.1 u. 129.3 u. 129.5 u. 129.6 u. 130.9 [12t, C-aromatisch]; 134.0 u. 135.4 u. 136.6 u. 136.8 [4q, C-aromatisch]; 138.3 [q, ImidazolC-SR]; 142.7 [t, =CH-Aromat]; 144.4 [q, CH₂-CAromat]; 158.2 [q, H₃CO-CAromat]; 159.0 [q, H₃CO-CAromat]; 188.8 [q, C=O]

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2978 v (CH gesättigt), 2840, 1671 v (C=O), 1610 δ (NH), 1507, 1409 δ (CH₂), 1295, 1250, 1181, 1029, 972, 829 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten)

EA:

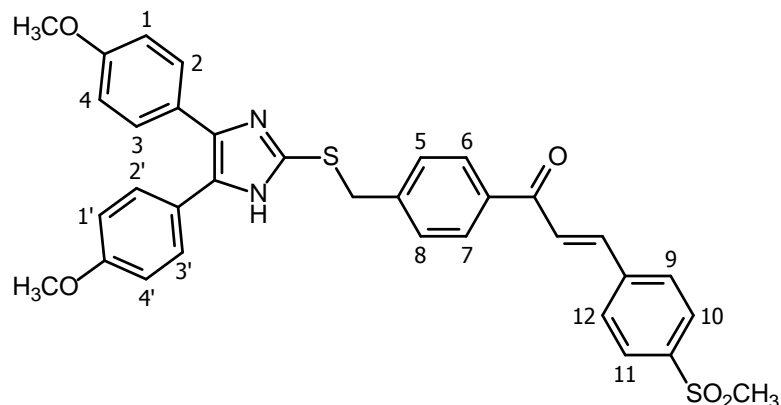
[%]	C	H	N	S
ber.	69.89	4.80	4.94	5.65
gef.	69.43	4.65	4.86	5.63

MS: FD-MS: m/z (rel. Int.) = 565.9 (100%, M⁺); 567.9 (46%); 566.9 (44%); 568.9 (17%)

Substanzbezeichnung: **AK D34**

IUPAC-Nomenklatur: (*E*)-1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1*H*-imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)-3-(4-methylsulfonyl)phenyl)prop-2-en-1-on

Strukturformel:



Summenformel: $C_{34}H_{30}N_2O_5S_2$

M_r : 610.2

Vorschrift: siehe Abschnitt 7.2.7 Aldolreaktion zur Darstellung von Chalconen, Variante B

Nach Extraktion mit Dichlormethan wurde die organische Phase mit gesättigter NH_4Cl - und $NaCl$ -Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert.

Aufreinigung: SC: Kieselgel, PE/EE (1:2)

Ansatz:	AK D25	600 mg	(3,4 mmol)
	AK D30	1,5 g	(3,6 mmol)
	LiOH	13,5 ml	(6,9 mmol)
	Methanol	14 ml	
	H_2O	14 ml	

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 290 mg (0,5 mmol) 14% der Theorie

mp: 165 °C

DC:	R _f 0.36 (PE/EE 1:2)															
¹ H-NMR:	300 MHz, d ₆ -DMSO, δ [ppm] = 3.26 [s, 3H, CH ₃]; 3.74 [s, 6H, H ₃ CO]; 4.45 [s, 2H, CH ₂]; 6.86 [pd, 2H, ³ J 7.1 Hz, H-1 u. H-4]; 6.94 [pd, 2H, ³ J 6.1 Hz, H-1' u. H-4']; 7.28 [pd, 2H, ³ J 7.1 Hz, H-2 u. H-3]; 7.38 [pd, 2H, ³ J 6.7 Hz, H-2' u. H-3']; 7.57 [pd, 2H, ³ J 8.1 Hz, H-5 u. H-8]; 7.78 [d, 1H, ³ J 15.7 Hz, CO-CH=]; 7.97 [pd, 2H, ³ J 8.4 Hz, H-9 u. H-12]; 8.11 [m, 5H, =CH-Aromat u. H-6 u. H-7 u. H-10 u. H-11]															
¹³ C-NMR:	75 MHz, d ₆ -DMSO, δ [ppm] = 37.0 [s, CH ₂]; 46.6 [p, CH ₃]; 55.4 [2p, H ₃ CO]; 114.0 [2t, C-1 u. C-4]; 114.4 [2t, C-1' u. C-4']; 125.5 u. 127.7 u. 128.3 u. 129.2 u. 129.4 u. 129.6 u. 129.8 [13t, C-aromatisch]; 136.3 u. 138.3 u. 140.0 [6q, C-aromatisch]; 142.0 [t, CO-CH=]; 142.1 [q, C-aromatisch]; 144.7 [4q, H ₃ CO-C _{aromat} u. C-aromatisch]; 188.8 [q, C=O]															
IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3657, 3399, 2983 ν (CH gesättigt), 2889, 2345, 1650 ν (C=O), 1601 δ (NH), 1495, 1393 ν (SO ₂), 1319, 1254, 1148, 1017, 960, 829 Γ (CH, 1,4-disubstituierte Aromaten), 751, 723															
EA:	<table><thead><tr><th>[%]</th><th>C</th><th>H</th><th>N</th><th>S</th></tr></thead><tbody><tr><td>ber.</td><td>66.86</td><td>4.95</td><td>4.59</td><td>10.50</td></tr><tr><td>gef.</td><td>66.59</td><td>5.05</td><td>4.31</td><td>10.81</td></tr></tbody></table>	[%]	C	H	N	S	ber.	66.86	4.95	4.59	10.50	gef.	66.59	5.05	4.31	10.81
[%]	C	H	N	S												
ber.	66.86	4.95	4.59	10.50												
gef.	66.59	5.05	4.31	10.81												
MS:	FD-MS: m/z (rel. Int.) = 609.8 (100%, M ⁺); 610.8 (53%); 611.8 (25%)															

8 Abkürzungsverzeichnis

12-HHT	12-Hydroxyheptadeca-5,8,10-triensäure
AA	Arachidonic Acid
ADHP	10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion
AIBN	Azobisisobutyronitril
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Activator Protein 1
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ASS	Acetylsalicylsäure
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
Cys	Cystein
cPLA ₂	cytosolische Phospholipase A ₂
DC	Dünnschichtchromatographie
DBPO	Dibenzoylperoxid
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
E _{1/2}	Eliminierungsreaktion Typ 1/2
EA	Elementaranalyse
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylether
EGF	Epidermal Growth Factor
EIA	Enzym-Immun-Assay
EI-MS	Elektronenstoßionisation-Massenspektrometrie
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assays
EPA	Eicosapentaensäure
FCS	Fetal Calf Serum

FD-MS	Felddesorption-Massenspektrometrie
FLAP	Five-Lipoxygenase Activating Proteine
FOX	Ferrous Oxidation-Xylenol Orange
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
His	Histidin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPETE	Hydroxyperoxyeicosatetraensäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
cPLA ₂	Calcium-independent Phospholipase A ₂
IR	Infrarot(-Spektroskopie)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k.A.	keine Aktivität
LicA	Licochalcon A
LOOH	Lipidhydroperoxid
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LX	Lipoxin
lPLA ₂	lipoproteinassoziierte Phospholipase A ₂
MAPKAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase
mCPBA	<i>m</i> -Chlorperbenzoesäure
MDA	Malondialdehyd
MM6	Mono Mac 6
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mp	Melting Point
mPGES-1	mikrosomale Prostaglandin E ₂ -Synthase 1
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid

NDGA	Nordihydroguariatsäure
NF- κ B	Nukleärer Faktor kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Spektroskopie)
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
n.t.	not tested
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Petrolether
PG	Prostaglandin
PGHS	Prostaglandin-H-Synthase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMS	<i>N</i> -Methylphenaziniummethylsulfat
QSAR	Quantitative Structure-Activity-Relationship
R _f	Retentionsfaktor
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
SC	Säulenchromatographie
Ser	Serin
S _N	nucleophile Substitution
sPLA ₂	sekretorische Phospholipase A ₂
TMB	Tetramethylbenzidin
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl- <i>p</i> -phenylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TSH	Thromboxan-Synthase-Hemmer
TX	Thromboxan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val	Valin

XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium-5-carboxanilid
Z	Zersetzung

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese und Symptome einer Entzündung [13]	2
Abbildung 2: Arachidonsäure-Kaskade [16].....	6
Abbildung 3: Cyclooxygenaseweg der Arachidonsäurekaskade [17].....	8
Abbildung 4: Strukturen der Prostaglandine (PG), des Prostacyclins (PGI ₂) und der Thromboxane (TX) [1]	9
Abbildung 5: Lipoxigenaseweg der Arachidonsäurekaskade [34].....	11
Abbildung 6: Strukturformeln der Produkte des Lipoxigenaseweges [34].....	12
Abbildung 7: Schematische Darstellung von COX-1 und COX-2 [45].....	15
Abbildung 8: Schematisches Modell der 5-LOX [51]	18
Abbildung 9: Beispiele einiger unselektiver COX-Hemmer [8].....	22
Abbildung 10: Acetylsalicylsäure (Aspirin [®]) [8].....	22
Abbildung 11: Beispiele einiger selektiver COX-2-Hemmer [8]	24
Abbildung 12: Beispiele einiger 5-LOX-Inhibitoren [34, 84]	25
Abbildung 13: Beispiele einiger dualer COX/LOX-Inhibitoren [16, 34]	26
Abbildung 14: Struktur von Licofelon [100]	27
Abbildung 15: Strukturbeispiele einiger neuer Wirkstoffe [23, 34, 40, 102]	28
Abbildung 16: Aufbau der Haut [105]	29
Abbildung 17: Strukturvergleich von Licofelon mit der Leitstruktur AK D19 der Strukturklasse I dieser Arbeit	33
Abbildung 18: Strukturklasse II durch Kopplung von Z11 und der Chalconstruktur.....	34
Abbildung 19: Vergleich der Leitstruktur mit Indometacin, Celecoxib und Licofelon [12]	36
Abbildung 20: Craig Plot [133, 134].....	39
Abbildung 21: Topliss Decision Tree [124].....	40
Abbildung 22: 2-(5,6-Diphenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D20), 2-(6- (4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D19) und 2-(5-(4- Chlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D22)	43
Abbildung 23: 2-(5,6-Diphenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D20) und 2- (6-(4-Methoxyphenyl)-5-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure AK D21	44

Abbildung 24: 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D22) und 2-(5-(3,4-Dichlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D23).....	45
Abbildung 25: 2-(6-(4-Methoxyphenyl)-5-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AKD21), 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AKD22) und 2-(5-(4-Chlorphenyl)-6-(4-methoxyphenyl)imidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D24).....	46
Abbildung 26: Überblick über die Synthese der Leitstruktur AK D19.....	47
Abbildung 27: Mechanismus der Bromierung von 1-(4-Chlorphenyl)-2-phenylethanon	48
Abbildung 28: Vergleich der ¹ H-NMR-Spektren des nicht-bromierten Edukts 4-Chlor-2-phenylacetophenon und (<i>R,S</i>)-2-Brom-1-(4-chlorphenyl)-2-phenylethanon (AK D6) (jeweils in CDCl ₃)	49
Abbildung 29: Synthese von 2-(2-Aminothiazol-4-yl)essigsäureethylester (AK D12)..	50
Abbildung 30: Allgemeines Syntheschema zur Darstellung des Imidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-Grundkörpers.....	51
Abbildung 31: Synthese des 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäureethyl-esters (AK D13)	52
Abbildung 32: ¹ H-NMR-Spektrum des 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäureethylester (AK D13) in DMSO- <i>d</i> ₆	53
Abbildung 33: ¹³ C-NMR-Spektrum (Spin-Echo-Verfahren) des Nebenprodukts 2-(3-(2-(4-Chlorphenyl)-2-oxo-1-phenylethyl)-2-imin-2,3-dihydro-thiazol-4-yl)essigsäureethylester in CDCl ₃	55
Abbildung 34: Basische Esterhydrolyse zur Darstellung der 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D19)	56
Abbildung 35: ¹ H-NMR-Spektrum der 2-(6-(4-Chlorphenyl)-5-phenylimidazo[2,1- <i>b</i>]thiazol-3-yl)essigsäure (AK D19) in DMSO- <i>d</i> ₆	57
Abbildung 36: Überblick über die Substanzreihe der Imidazothiazole	58
Abbildung 37: Elektrophile Agentien bei der Friedel-Crafts-Acylierung [149].....	59
Abbildung 38: Verlauf der Friedel-Crafts-Acylierung [149].....	60
Abbildung 39: ¹ H-NMR-Spektrum des 1-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylethanons (AK D2) in DMSO- <i>d</i> ₆	61
Abbildung 40: Retrospektive Darstellung von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylethanon (AK D2), 2-(4-Chlorphenyl)-1-phenylethanon (AK D3), 1-(3,4-Dichlorphenyl)-2-	

phenylethanon (AK D4) und 2-(4-Chlorphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)ethanon (AK D5) über Friedel-Crafts-Acylierungen	62
Abbildung 41: Synthese von 3,4-Benzoylchlorid (AK D1).....	63
Abbildung 42: Vergleich der ¹ H-NMR-Spektren von 3,4-Dichlorphenyllessigsäure (Edukt) und 3,4-Dichlorbenzoylchlorid (AK D1) in DMSO-d ₆	64
Abbildung 43: Struktur eines Chalcones	66
Abbildung 44: Strukturvergleich von Z11 mit Celecoxib.....	66
Abbildung 45: Allgemeine Struktur der konstitutionsisomeren Z11-A- und Z11-B-Chalcone.....	67
Abbildung 46: Überblick über die Testsubstanzen der Chalcon-Reihe	68
Abbildung 47: Retrosynthetische Betrachtung eines Z11-A-Chalcones	69
Abbildung 48: Darstellung der Z11-A-Chalcone	70
Abbildung 49: Synthese von 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-thiol (Z11)	71
Abbildung 50: ¹ H-NMR-Spektrum von 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-thiol (Z11) in CDCl ₃	72
Abbildung 51: Synthese des 4-Brommethylacetophenons (AK D26)	73
Abbildung 52: Synthese von 1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)ethanon (AK D30).....	74
Abbildung 53: ¹ H-NMR-Spektrum von 1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)ethanon (AK D30) in DMSO-d ₆	75
Abbildung 54: Synthese von 4-(Methylsulfonyl)benzaldehyd (AK D25).....	76
Abbildung 55: Darstellung eines Z11-B-Chalcones	77
Abbildung 56: Synthese von 4-Hydroxymethylbenzaldehyd (AK D27).....	78
Abbildung 57: Darstellung von 4-Brommethylbenzaldehyd (AK D28).....	79
Abbildung 58: Synthese von 4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylthio)methyl)- benzaldehyd (AK D29).....	80
Abbildung 59: ¹ H-NMR-Spektrum von 4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylthio)methyl)benzaldehyd (AK D29) in CDCl ₃	81
Abbildung 60: Basenkatalysierte Aldolreaktion	82
Abbildung 61: Übersicht über die Testsubstanzen der Chalcone	83
Abbildung 62: ¹ H-NMR-Spektrum von (<i>E</i>)-1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylthio)phenyl)-3-(4-(trifluormethyl)phenyl)prop-2-en-1-on (AK D31) in DMSO-d ₆	84

Abbildung 63: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von (<i>E</i>)-1-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylthio)phenyl)-3-(4-(trifluormethyl)phenyl)prop-2-en-1-on (AK D31) in DMSO-d_6	85
Abbildung 64: ^1H -NMR-Spektrum von (<i>E</i>)-3-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)prop-2-en-1-on (AK D32) in DMSO-d_6	86
Abbildung 65: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von (<i>E</i>)-3-(4-((4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-ylthio)methyl)phenyl)-1-(4-(trifluormethyl)phenyl)prop-2-en-1-on (AK D32) in DMSO-d_6	86
Abbildung 66: <i>E</i> - und <i>Z</i> -Konfiguration eines Chalcon.....	87
Abbildung 67: <i>s-cis</i> - und <i>s-trans</i> -Konformation eines Chalcon.....	88
Abbildung 68: NOESY-Spektrum von AK D31 in CDCl_3	88
Abbildung 69: Synthese von TXA_2 als Teilschritt der Arachidonsäure-Kaskade	90
Abbildung 70: Aldolkondensation von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure	92
Abbildung 71: Synthese von LTB_4 als Teilschritt der Arachidonsäure-Kaskade	96
Abbildung 72: Metabolisierung von XTT zum Formazan [194]	99
Abbildung 73: Ergebnisse des XTT-Viabilitätsassays nach 90 Minuten bei einer Substanzkonzentration von $100\ \mu\text{M}$	125
Abbildung 74: Regressionsgerade der Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung der sauren Imidazothiazole mit Geradengleichung	128
Abbildung 75: Regressionsgerade der Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung des Imidazothiazols AK D14 mit Geradengleichung	130
Abbildung 76: Überblick über die Testverbindungen der Imidazothiazole.....	133
Abbildung 77: Topliss Decision Tree [124].....	137
Abbildung 78: Ergebnisse des XTT-Viabilitätsassays nach 90 Minuten bei einer Substanzkonzentration von $100\ \mu\text{M}$	144
Abbildung 79: Regressionsgerade der Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung der Chalcone mit Geradengleichung.....	147
Abbildung 80: Überblick über die Testverbindungen der Chalcon-Reihe.....	150

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Exogene Noxen [13]	3
Tabelle 2: Übersicht Entzündungsmediatoren [1, 12, 13].....	5
Tabelle 3: Biologische Wirkungen der Prostanoiden [8, 32]	10
Tabelle 4: Biologische Wirkungen der Leukotriene und der Lipoxine [1, 16, 34]	13
Tabelle 5: Physiologische und pathophysiologische Vorgänge mit COX-1- und/oder COX-2-Beteiligung [41, 49, 50]	16
Tabelle 6: Substituentenkonstanten [124]	42
Tabelle 7: Referenzsubstanzen [198]	104
Tabelle 8: Ergebnisse der 12-HHT-Testung der Imidazothiazole	116
Tabelle 9: IC ₅₀ -Werte der Imidazothiazole (COX-1).....	118
Tabelle 10: Testergebnis des MDA-Assays des Imidazothiazols AK D19	119
Tabelle 11: Vergleich der Testergebnisse des MDA- und 12-HHT-Assays von zwei Referenzsubstanzen	120
Tabelle 12: Testergebnisse des COX-2-Assays der Imidazothiazole	120
Tabelle 13: Testergebnisse des 5-LOX-Assays der Imidazothiazole.....	122
Tabelle 14: Ergebnisse des XTT-Assays der Imidazothiazole.....	124
Tabelle 15: Bestimmung der log P-Werte der Imidazothiazole mit ChemDraw	126
Tabelle 16: Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung der sauren Imidazothiazole	128
Tabelle 17: Log P-Werte der sauren Imidazothiazole.....	129
Tabelle 18: Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung des Imidazothiazols AK D14	130
Tabelle 19: Log P-Wert-Bestimmung von AK D14	131
Tabelle 20: Vergleich der rechnerisch und experimentell ermittelten log P-Werte der Imidazothiazole	131
Tabelle 21: Testergebnisse der COX-1-, COX-2- und 5-LOX-Testungen der Imidazothiazole und von Licofelon.....	134
Tabelle 22: Testergebnisse Chalcone 12-HHT-Assay	138
Tabelle 23: IC ₅₀ -Werte der Chalcone (COX-1)	140

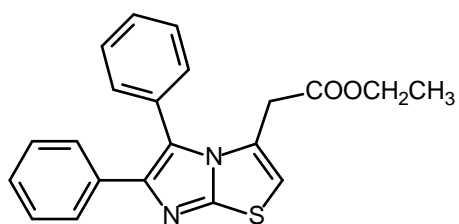
Tabelle 24: Testergebnisse des MDA- und 12HHT-Assays des Chalcons AK D34	141
Tabelle 25: Testergebnisse des 5-LOX-Assays der Chalcone	142
Tabelle 26: Testergebnisse des XTT-Viabilitätsassays der Chalcone	143
Tabelle 27: Rechnerische Bestimmung der log P-Werte mit ChemDraw	145
Tabelle 28: Referenzsubstanzen für die log P-Wert-Bestimmung der Chalcone.....	146
Tabelle 29: Experimentell ermittelte log P-Werte der Chalcone	147
Tabelle 30: Experimentell und rechnerisch bestimmte log P-Werte der Chalcone	148
Tabelle 31: Testergebnisse der COX-1-, COX-2- und 5-LOX-Testungen der Chalcone, von D4 und Licochalcon A	151

11 Formelverzeichnis

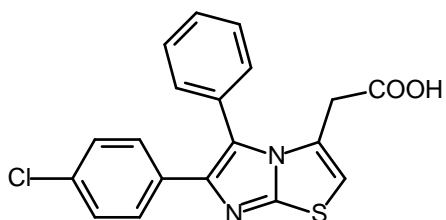
Formel 1: Definition der Hammett-Konstante σ	37
Formel 2: Hansch-Gleichung	38
Formel 3: Definition des Lipophilie-Parameters π	38
Formel 4: Berechnung des Kapazitätsfaktors	103

12 Formelübersicht

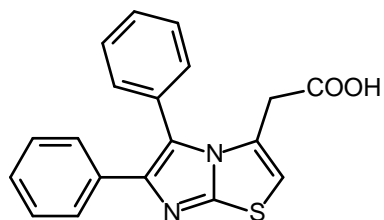
12.1 Imidazothiazole



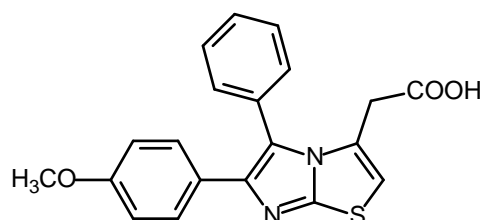
AK D14



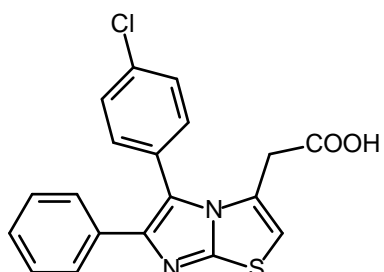
AK D19



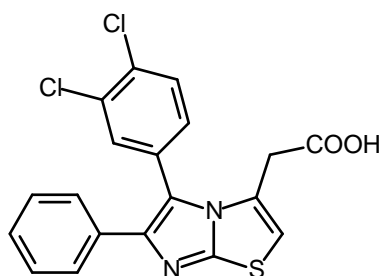
AK D20



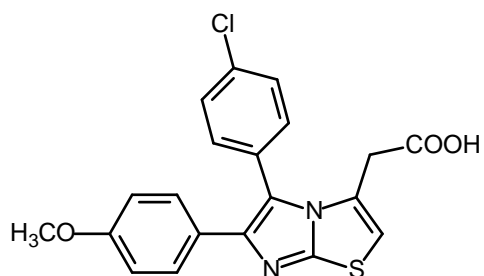
AK D21



AK D22

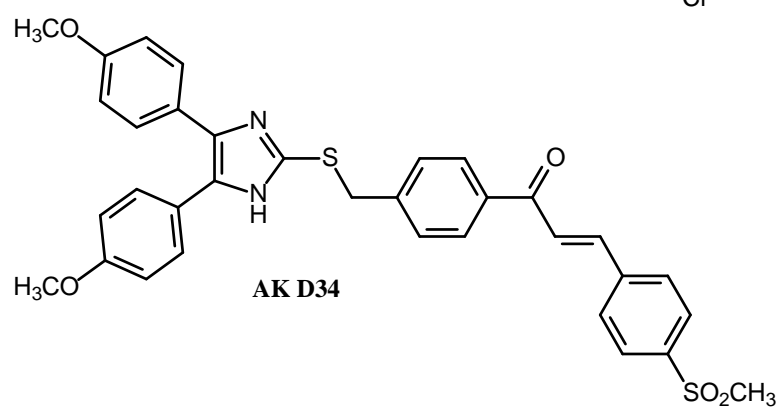
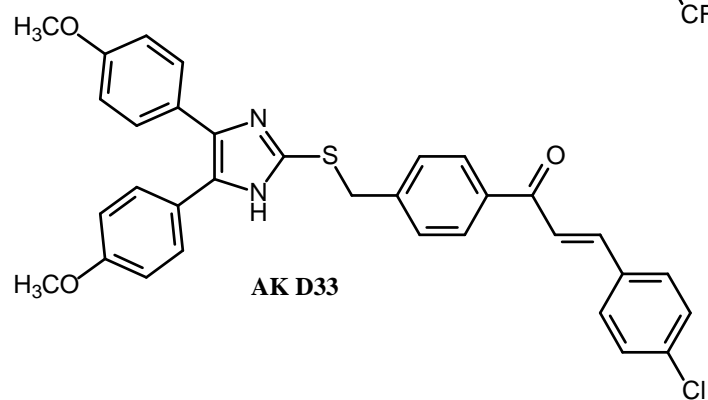
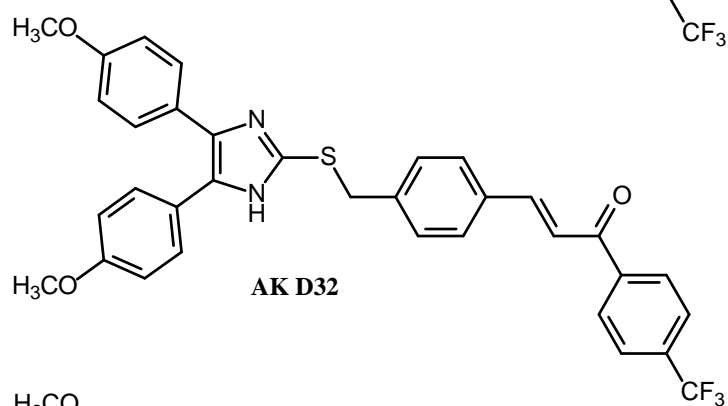
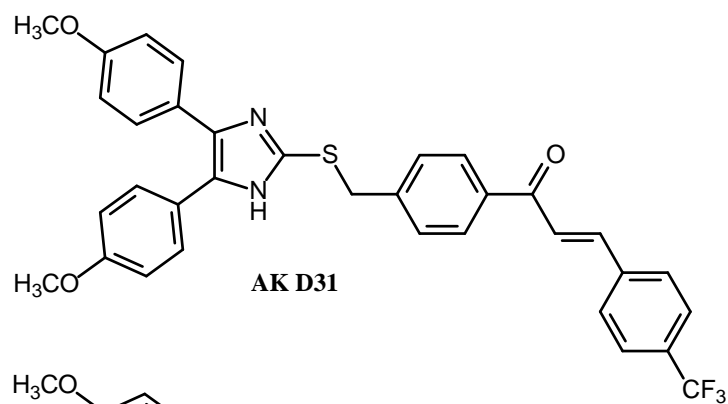


AK D23



AK D24

12.2 Chalcone



13 Literaturverzeichnis

- [1] Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.; Starke, K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München: Elsevier GmbH; 2005. ISBN 3-437-42521-8.
- [2] Lafont, O.: From the willow to aspirin. *Rev Hist Pharm* (2007), 55(354): 209-216.
- [3] Schrör, K.: Geschichte von Acetylsalicylsäure. 100 Jahre erfolgreiche Arzneimittelforschung. *Pharm Unserer Zeit* (2009), 38(4): 306-313.
- [4] Ulbrich, H.; Dannhardt, G.: NSAR: Klassifizierung und Wirkspektrum: Eine heterogene Arzneistoffklasse. *Pharm Unserer Zeit* (2002), 31(2): 146-154.
- [5] Lévesque, H.; Lafont, O.: Aspirin throughout the ages: a historical review. *Rev Med Interne* (2000), 21(Suppl. 1): 8-17.
- [6] Gryglewski, R. J.: Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep* (2008), 60(1): 3-11.
- [7] Oates, J. A.: The 1982 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science* (1982), 218: 765-768.
- [8] Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M.: Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.; 2008. ISBN 978-8047-1952-1.
- [9] Diener, H.; Schneider, R.; Aicher, B.: Per-capita consumption of analgesics: a nine-country survey over 20 years. *J Headache Pain* (2008), 9(5): 225-231.
- [10] Bundesfachverband der Arzneimittel-Hersteller e. V.: Der Arzneimittelmarkt in Deutschland in Zahlen; Verordnungsmarkt und Selbstmedikation (2008).
- [11] Massey, T.; Derry, S.; Moore, R. A.; McQuary, H. J.: Topical NSAIDs for acute pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* (2010), 6: CD007402.
- [12] Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavec, M.; Roth, H. M.: Medizinische Chemie, Targets und Arzneistoffe. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2005. ISBN 3-7692-3483-9.
- [13] Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P.: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.; 1999. ISBN 3-8047-1616-4.
- [14] Serhan, C. H.; Chiang, N.; Van Dyke, T. E.: Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* (2008), 8(5): 349-361.

- [15] Bogatcheva, N. V.; Sergeeva, M. G.; Dudek, S. M.; Verin, A. D.: Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res* (2005), 69(3): 107-127.
- [16] Laufer, S.; Gay, S.; Brune, K.: *Rheumatische Erkrankungen und Entzündung: von den molekularen Grundlagen zur medikamentösen Therapie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002. ISBN 3-13-132671-9.
- [17] Hyde, C. A. C.; Missailidis: Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int Immunopharmacol* (2009), 9(6): 701-715.
- [18] Funk, C. D.: Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Sciences* (2001), 294(5548): 1871-1875.
- [19] Burke, J. E.; Dennis, E. A.: Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther* (2009), 23(1): 49-59.
- [20] Schaloske, R. H.; Dennis, E. A.: The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* (2006), 1761(11): 1246-1259.
- [21] Burke, J. E.; Dennis, E. A.: Phospholipase A2 structure/function, mechanism and signaling. *J Lipid Res* (2009), 50: 237-242.
- [22] Murakami, M.; Kudo, I.: Phospholipase A2. *J Biochem* (2002), 131(3): 285-292.
- [23] Lehr, M.: Phospholipase A₂ inhibitors in inflammation. *Expert Opin Ther Patents* (2001), 11(7): 1123-1136.
- [24] Kudo, I.; Murakami, M.: Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2002), 68-69: 3-58.
- [25] Fitzpatrick, F. A.: Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des* (2004), 10(6): 577-588.
- [26] Dietz, R.; Nastainczyk, W.; Ruf, H. H.: Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G₂. *Eur J Biochem* (1988), 171(1-2): 321-328.
- [27] Marnett, L. J.; Rowlinson, S. W.; Goodwin, D. C.; Kalgutkar, A. S.; Lanzos, C. A.: Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. *J Biol Chem* (1999), 274(33): 22903-22906.
- [28] Rouzer, C. A.; Marnett, L. J.: Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* (2009), 50: 29-34.

- [29] Van der Donk, W. A.; Tsai, A.; Kulmacz, R. J.: The cyclooxygenase reaction mechanism. *Biochem* (2002), 41(52): 15451-15458.
- [30] Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, R. M.: Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* (2000), 69: 145-182.
- [31] Wang, D.; Dubois, R. N.: Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Immunol* (2010), 10(3): 181-193.
- [32] FitzGerald, G. A.: Cardiovascular pharmacology of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. *Am J Cardiol* (2002), 89(6, Suppl. 1): 26-32.
- [33] Hata, A. N.; Breyer, R. M.: Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* (2004), 103(2): 147-166.
- [34] Pegola, C.; Werz, O.: 5-Lipoxygenase inhibitors: a review of recent developments and patents. *Expert Opin Ther Patents* (2010), 20(3): 355-375.
- [35] Radmark, O.; Samuelsson, B.: Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* (2010), 396(1): 105-110.
- [36] Singh, R. K.; Gupta, S.; Dastidar, S.; Ray, A.: Cysteinyl Leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology* (2010), 85(6): 336-349.
- [37] Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Turepo Roos, L.; et al.: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci* (2002), 99: 13926-13931.
- [38] Hersh, E. V.; Lally, E. T.; Moore, P. A.: Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr Med Res Opin* (2005), 21(8): 1217-1226.
- [39] Willoughby, D. A.; Moore, A. R.; Colville-Nash, P. R.: COX-1, COX-2 and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* (2000), 355(9204): 646-648.
- [40] Rao, P.; Knaus, E. E.: Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci* (2008), 11(2): 81-110.
- [41] Smith, W. L.; Langenbach, R.: Why there are two cyclooxygenase isoenzymes. *K Clin Invest* (2001), 107(12):1491-1495.

- [42] Simmons, D. L.; Botting, R. M.; Hla, T.: Cyclooxygenase Isoenzymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* (2004), 56: 387-437.
- [43] Garavito, R. M.; Mulichak, A. M.: The structure of mammalian cyclooxygenases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* (2003), 32: 183-206.
- [44] Thuresson, E. D.; Lakkides, K. M.; Rieke, C. J.; et al.: Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. *J Biol Chem* (2001), 276(13): 10347-10359.
- [45] Bertolini, A.; Ottani, A.; Sandrini, M.: Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res* (2001), 44(6): 437-540.
- [46] Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. M.: The x-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* (1994), 367(6460):243-249.
- [47] Vane, J. R.; Bakhle, Y. S.; Botting, R. M.: Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* (1998), 38: 97-120.
- [48] Dannhardt, G.; Kiefer, W.: Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. *Eur J Med Chem* (2001), 36(2): 109-126.
- [49] Morita, I.: Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2002), 68-69: 165-175.
- [50] Vane, S. J.: Aspirin and other anti-inflammatory drugs. *Thorax* (2000), 55(Suppl 2): 3-9.
- [51] Radmark, O.: Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2002), 68-69: 211-234.
- [52] Hemak, J.; Gale, D.; Brock, T. D.: Structural characterization of the catalytic domain of the human 5-lipoxygenase enzyme. *J Mol Model* (2002), 8(4): 102-112.
- [53] Radmark, O.; Werz, O.; Steinhilber, D.; Samuelsson, B.: 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci* (2007), 32(7): 332-341.
- [54] Radmark, O.; Samuelsson, B.: 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *J Lipid Res* (2009), 50: 40-45.

- [55] Roger, C.; Helfand, M.; Peterson, K.; Dana, T., Roberts, C.: Drug class review on cyclo-oxygenase (COX) -2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Oregon Health & Science University (2006).
- [56] Dinarello, C. A.: Anti-inflammatory agents: Present and future. *Cell* (2010), 140(6): 935-950.
- [57] Blobaum, A. L.; Marnett, L. J.: Structural and functional basis of Cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem* (2007), 50(7): 1425-1441.
- [58] FitzGerald, G. A.; Patrono, C.: The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Eng J Med* (2001), 345(6): 433-442.
- [59] Mason, L.; Edwards, J.; Moore, R. A.; McQuay, H. J.: Single dose oral indometacin for the treatment of acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev* (2004), 18(4): CD004308.
- [60] Zacher, J.; Altman, R.; Bellamy, N.; et al.: Topical diclofenac and its role in pain and inflammation: and evidence-based review. *Curr Med Res Opin* (2008), 24(4): 925-950.
- [61] Rainsford, K. D.: Iburprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology* (2009), 17(6): 275-342.
- [62] Ahmed, M.; Khanna, D.; Furst, D. E.: Meloxicam in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* (2005), 1(4): 739-751.
- [63] Steiner, T. J.; Voelker, M.: Gastrointestinal tolerability of aspirin and the choice of over-the-counter-analgesia for short-lasting acute pain. *J Clin Pharm Ther* (2009), 34(2): 177-186.
- [64] Marnett, L. J.: The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2008), 49: 265-290.
- [65] Kiefer, W.; Dannhardt, G.: COX-2-inhibition and pain management: a review summary. *Expert Rev Clin Immunol* (2005), 1(3): 431-442.
- [66] Kiefer, W., Dannhardt, G.: Novel insights and therapeutical applications in the field of inhibitors of COX-2. *Curr Med Chem* (2004), 11(24): 3147-3161.
- [67] Hawkey, C. J.: COX-2 chronology. *Gut* (2005), 54(11): 1509-1514.
- [68] Melnikova, I.: Future of COX-2-inhibitors. *Nat Rev Drug Dis* (2005), 4(6): 453-454.
- [69] Psaty, B. M.; Furberg, C. D.: COX-2 inhibitors: lessons in drug safety. *N Eng J Med* (2005), 352(11): 1133-1135.

- [70] Shi, S.; Klotz, U.: Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* (2008), 64(3): 233-252.
- [71] Watson, R.: European medicines agency gives favourable ruling on NSAIDs. *BMJ* (2006), 333(7574): 873.
- [72] Moodley, I.: Review of the cardiovascular safety of COXIBs compared to NSAIDs. *Cardiovasc J Afric* (2008), 19(2): 102-107.
- [73] Empfehlungen zur Therapie von degenerativen Gelenkerkrankungen. Therapieempfehlungen der AkdÄ (2008), 3. Aufl., Sonderheft 1, Bd. 35: 4-34
- [74] Wehling, M.: *Klinische Pharmakologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2005. ISBN 3-13-126821-2.
- [75] Menter, D. G.; Schilsky, R. L.; DuBois, R. N.: Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward. *Clin Cancer Res* (2010), 16(5): 1384-1390.
- [76] Hohmann, C.: COX-2-Hemmer in der Tumorthherapie. *PZ* (2003), 148(1-2): 36-37.
- [77] Bain, G.; King, C. D.; Rewolinski, M.; et al.: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of AM103, a novel inhibitor of 5-lipoxygenase-activating-protein (FLAP). *Clin Pharmacol Ther* (2010), 87(4): 437-444.
- [78] Evans, J. F.; Ferguson, A. D.; Mosley, R. T.; Hutchinson, J. H.: Whats all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating-protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci* (2008), 29(2): 72-78.
- [79] McMillan, R. M.; Walker, E. R. H.: Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* (1992), 13(8): 323-330.
- [80] Bäck, M.: Inhibitors of the 5-lipoxygenase pathway in atherosclerosis. *Curr Pharm Des* (2009), 15(27): 3116-3132.
- [81] Lazarus, S. C.; Lee, T.; Kemp, J. P.; et al.: Safety and clinical efficacy of zileuton in patients with chronic asthma. *Am J Manag Care* (1998), 4(6): 841-848.
- [82] Werz, O.; Steinhilber, D.: Development of 5-lipoxygenase inhibitors: lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem Pharmacol* (2005), 70(3): 327-333.
- [83] Nasser, S. M.; Bell, G. S.; Foster, S.; Spruce, K. E.; MacMillan, R.; Williams, A. J.: Effect of the 5-lipoxygenase inhibitor ZD2138 on aspirin-induced asthma. *Thorax* (1994), 49(8): 749-756.

- [84] Hutchinson, J. H.; Li, Y.; Arruda, J. M.; et al.: 5-Lipoxygenase-Activating Protein Inhibitors: Development of 3-[3-tert-Butylsulfanyl-1-[4-(6-methoxy-pyridin-3-yl)-benzyl]-5-(pyridine-2-ylmethoxy)-1*H*-indol-2-yl]-2,2-dimethyl-propionic Acid (AM103). *J Med Chem* (2009), 52(19): 5803-5815.
- [85] Laufer, S.: Discovery and development of ML3000. *Inflammopharmacology* (2001), 9: 101-112.
- [86] Rainsford, K. D.: Leukotrienes in the pathogenesis of NSAID-induced gastric and intestinal mucosal damage. *Inflamm Res* (1993), 39(Suppl 1): C25.
- [87] Laufer, S.; Augustin, J.; Dannhardt, G.; Kiefer, W.: (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J Med Chem* (1994), 37(12): 1894-1897.
- [88] Logical Therapeutics INC. Compositions including leukotriene antagonists and nsoids and methods of using the same. WO/2009/012425 (2009).
- [89] Li, L.; Ji, H.; Sheng, L.; Zhang, Y.; Lai, Y.; Chen, X.: The anti-inflammatory effects of ZLJ-6, a novel dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor. *Eur J Pharmacol* (2009), 607(1-3): 244-250.
- [90] Inagaki, M.; Jyoyama, H.; Ono, T.; Yamada, K.; Kobayashi, M.; Baba, T.: Synthesis and activities of oxidative metabolites of the anti-arthritic drug candidate S-2474. *Bioorg Med Chem* (2003), 11(11): 2415-2419.
- [91] Maier, T. J.; Tausch, L.; Hoernig, M.; et al.: Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* (2008), 76(7): 862-872.
- [92] Araico, A.; Terencio, M. C.; Alcaraz, M. J.; Domínguez, J. N.; León, C.; Ferrándiz, M. L.: Phenylsulphonyl urenyl Chalcone derivatives as dual inhibitors of Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. *Life Sci* (2006), 78(25): 2911-2918.
- [93] Xu, G.; Liu, F.; Zhao, Y.; Ao, G.; Xi, L. Ju, M.: Biological evaluation of 2-(4-amino-phenyl)-3-(3,5-dihydroxyphenyl) propenoic acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* (2009), 105(5): 350-356.
- [94] Ulbrich, H.; Soehnlein, O.; Xie, X.; et al.: Licofelone, a novel 5-LOX/COX-inhibitor, attenuates leukocyte rolling and adhesion on endothelium under flow. *Biochem Pharmacol* (2005), 70(1): 30-36.

- [95] Laufer, S.; Tries, S.; Augustin, J.; Dannhardt, G.: Pharmacological profile of a new pyrrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Arzneimittelforschung* (1994), 44(5): 629-636.
- [96] Tries, S.; Neupert, W.; Laufer, S.: The mechanism of action of the new anti-inflammatory compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflamm Res* (2002), 51(3): 135-143.
- [97] Bannwarth, B.: Is licofelone, a dual inhibitor of cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase, a promising alternative in anti-inflammatory therapy? *Fund Clin Pharmacol* (2004), 18: 125-130.
- [98] Fischer, L.; Hornig, M.; Pergola, C.; et al.: The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis 5-lipoxygenase products. *Br J Pharmacol* (2007), 152(4): 471-480.
- [99] Koeberle, A.; Siemoneit, U.; Bühring, U.; et al.: Licofelone suppresses prostaglandin E2 formation by interference with the inducible microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *J Pharmacol Exp Ther* (2008), 326(3): 975-982.
- [100] Kulkarni, S. K.; Singh, V. P.: Licofelone – A novel analgesic and anti-inflammatory agent. *Curr Top Med Chem* (2007), 7(3): 251-263.
- [101] Friesen, R. W.; Mancini, J. A.: Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 (mPGES-1): A novel anti-inflammatory therapeutic target. *J Med Chem* (2008), 51(14): 4059-4065.
- [102] Koeberle, A.; Werz, O.: Inhibitors of the Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 as Alternative to Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) – A Critical Review. *Curr Med Chem* (2009), 16(32): 4274-4296.
- [103] Dannhardt, G.: *Rheumatische Erkrankungen*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York; 1999. ISBN 3-540-65268-X.
- [104] Voigt, R.: *Pharmazeutische Technologie*. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart; 2006. ISBN 3-7692-3511-8.
- [105] http://www.eucerin.at/haut/aufbau_der_haut.asp
- [106] Davidovici, B. B.; Sattar, N.; Jörg, P. C.; et al.: Psoriasis and systemic inflammatory diseases: potential mechanistic links between skin disease and co-morbid conditions. *J Invest Dermatol* (2010), 130(7): 1785-1796.
- [107] Lipozencic, J.; Wolf, R.: Atopic dermatitis: an update and review of the literature. *Dermatol Clin* (2007), 25(4): 605-612.
- [108] Berk, T.; Scheinfeld, N.: Seborrheic dermatitis. *P. T.* (2010), 35(6): 348-352.

- [109] Fonacier, L. S.; Dreskin, S. C.; Leung, D. Y.: Allergic skin diseases. *J Allergy Clin Immunol* (2010), 125(2, Suppl. 2): 138-149.
- [110] Strauss, J. S.; Krowchuk, D. P.; Leyden, J. J.; et al.: Guidelines of care for acne vulgaris management. *J Am Acad Dermatol* (2007), 56(4): 651-663.
- [111] Rhodes, L. E.; Gledhill, K.; Masoodi, M.; et al.: The sunburn response in human skin is characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases. *FASEB J* (2009), 23(11): 3947-3956.
- [112] Wilgus, T. A.; Ross, M. S.; Parrett, M. L.; Oberyszyn, T. M.: Topical application of a selective Cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2000), 62(4): 367-384.
- [113] Snyder, D. S.: Cutaneous effects of topical indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis, on UV-damaged skin. *J Invest Dermatol* (1975), 64(5): 322-325.
- [114] Friedmann, E. S.; LaNatra, N.; Stiller, M. J.: NSAIDs in dermatologic therapy: review and preview. *J Cutan Med Surg* (2002), 6(5): 449-459.
- [115] Kienzler, J. L.; Magnette, J.; Queille-Roussel, C.; Sanchez-Ponton, A.; Ortonne, J. P.: Diclofenac-Na gel is effective in reducing the pain and inflammation associated with exposure to ultraviolet light – results of two clinical studies. *Skin Pharmacol Physiol* (2005), 18(3): 144-152.
- [116] Underwood, M.; Ashby, D.; Carnes, D.; et al.: Topical or oral ibuprofen for chronic knee pain in older people. *Health Technol Assess* (2008), 12(22): 1-176.
- [117] Makris, U. E.; Kohler, M. J.; Fraenke, L.: Adverse effects of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs in older adults with osteoarthritis: a systematic literature review. *J Rheumatol* (2010), 37(6): 1236-1243.
- [118] Katritzky, A. R.; Dobchev, D. A.; Fara, D. C.; et al.: Skin permeation rate as a function of chemical structure. *J Med Chem* (2006), 49(11): 3305-3314.
- [119] Giesbrecht, I.: Synthese und Testung von COX-1-, COX-2- und 5-LOX-Inhibitoren zur topischen Anwendung. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2006.
- [120] Cicero, A. F. G.; Derosa, G.; Gaddi, A.: Combined lipoxigenase/cyclooxygenase inhibition in the elderly. *Drugs Aging* (2005), 22(5): 393-403.

- [121] Abdel-Tawab, M.; Zettl, H.; Schubert-Zsilavec, M.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a critical review on current concepts applied to reduce gastrointestinal toxicity. *Curr Med Chem* (2009), 16(16): 2042-2063.
- [122] González-Pérez, A.; Clària, J.; New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. *Curr Top Med Chem* (2007), 7(3): 297-309.
- [123] Alvaro-Gracia, J. M.: Licofelone – clinical update on a novel LOX/COX inhibitor for the treatment of osteoarthritis. *Rheumatology* (2004), 43(Suppl 1): i21-i25.
- [124] Topliss, J. G.: Utilization of Operational Schemes for Analog Synthesis in Drug Design. *J Med Chem* (1972), 15(10): 1006-1011.
- [125] Hahn, L.: Entwicklung neuer Antiinflammatorika mit Imidazol-Teilstruktur sowie Modifikation eines in vitro Assays zur fluorimetrischen Quantifizierung der COX-1/TXA-2-Synthase-Inhibition. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 1999.
- [126] Klose, W.; Niedballa, U.; Schwarz, K.; Böttcher, I.: 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-2-arylthio-azole mit antiphlogistischer Wirkung. *Arch Pharm* (1983), 316(11): 941-951.
- [127] Nowakowska, Z.: A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur J Med Chem* (2007), 42(2): 125-137.
- [128] Go, M. L.; Wu, X.; Liu, X. L.: Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr Med Chem* (2005), 12(4): 481-499.
- [129] Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H.: Wirkstoffdesign. Der Weg zum Arzneimittel. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 1996. ISBN 3-8274-0012-9.
- [130] Selassie, C. D.: History of Quantitative Structure-Reactivity Relationships. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. New York: John Wiley and Sons Inc.; 2003. ISBN 978-0-471-27090-4.
- [131] Klebe, G.: Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009. ISBN 978-3-8274-2046-6.
- [132] Kubinyi, H.: QSAR: Hansch Analysis and related approaches. Weinheim: VCH; 1993. ISBN 352730035X.
- [133] Craig, P. N.: Interdependence between Physical Parameters and Selection of Substituent Groups for Correlation Studies. *J Med Chem* (1971), 14(8): 680-684.

- [134] Costa Tavares, L.: QSAR: the Hansch's approach. *Quim Nova* (2004), 27(4): 631-639.
- [135] Topliss, J. G.: Some observations on classical QSAR. *Perspect Drug Discov* (1993), 1: 243-268.
- [136] Kubinyi, H.: From Narcosis to Hyperspace: The History of QSAR. *Quant Struct-Act Relat* (2002), 21: 348-356.
- [137] Scior, T.; Medina-Franco, J. L.; Do, Q.-T.; Martínez-Mayorga, K.; Yunes Roja, J. A.; Bernard, P.: How to Recognize and Workaround Pitfalls in QSAR Studies: A Critical Review. *Curr Med Chem* (2009), 16(32): 4297-4313.
- [138] Topliss, J. G.: A Manual Method for Applying the Hansch Approach to Drug Design. *J Med Chem* (1977), 20(4): 463-469.
- [139] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P.: *Organic Chemistry*. New York: Oxford University Press Inc.; 2001. ISBN-13: 978-0-19-850346-0. ISBN-10: 0-19-850346-6.
- [140] Robert, J. F.; S. Boukraa, S.; Panouse, J. J.; Loppinet, V.; Chaumont, J. P.: Dérivés de l'imidazo[2,1-*b*]thiazole X. Propriétés fongistatiques de 2-aminothiazoles et de 6-aryl imidazo[2,1-*b*]thiazoles substitués respectivement en 4 et en 3 par un reste aryléthyle, aroylméthyle, β -hydroxy β -aryléthyle et éthoxycarbonylméthyle. *Eur J Med Chem* (1990), 25(9): 731-736.
- [141] Sawhney, S. N.; Kodali, D. R.; Dhindsa, G. S.; Singh, S. P.: Synthesis & Antiinflammatory Activity of Some Arylimidazo[2,1-*b*]thiazolyl- & Arylimidazo[2,1-*b*]benzothiazolyl-acetic Acids. *Indian J Chem* (1982), 21B: 134-138.
- [142] Gürsoy, E.; Ulusoy Güzeldemirci, N.: Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new imidazo[2,1-*b*]thiazole derivatives. *Eur J Med Chem* (2007), 42(3): 320-326.
- [143] Budriesi, R.; Ioan, P.; Locatelli, A.; et al.: Imidazo[2,1-*b*]thiazole System: A Scaffold Endowing Dihydropyridines with Selective Cardiodepressant Activity. *J Med Chem* (2008), 51(6): 1592-1600.
- [144] Vu, C. B.; Bemis, J. E.; Disch, J. S.; et al.: Discovery of Imidazo[2,1-*b*]thiazole Derivatives as Novel SIRT1 Activators. *J Med Chem* (2009), 52(5): 1275-1283.
- [145] Andreani, A.; Granaiola, M.; Leoni, A.; et al.: Antitumor activity of new substituted 3-(5-imidazo[2,1-*b*]thiazolylmethylene)-2-indolinones and study of their effect on the cell cycle. *J Med Chem* (2005), 48(17): 5604-5607.

- [146] Robert, J.; Panouse, J. J.: Synthèses de dérivés de l'imidazo(2.1-b)thiazole. Action de l'acétylacétat d'éthyle α et ω halogéné sur la thiourée et l'éthylènthiourée. C.R. Acad. Sc. Paris (1974), 1289-1292
- [147] Meakins, G. D.; Musk, S. R. R.; Robertson, C. A.; Woodhouse, L. S.: Substituted Imidazo[2,1-*b*]thiazoles from 2-Aminothiazoles and α -Bromo Ketones: Efficient Preparation and Proof of Structure. J Chem Soc Perkin Trans I (1989): 643-648.
- [148] Birkinshaw, T. N.; Harkin, S. A.; Kaye, P. T.; Meakins, G. D., Smith, A. K.: Tautomerism in 2-Trichloro- and 2-Trifluoro-acetamidothiazoles. J Chem Soc Perkin Trans I (1982): 939-943.
- [149] Becker, H. G. O.; Berger, W.; Domschke, G.; et al.: Organikum. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004. ISBN 3-527-31148-3.
- [150] Brückner, R.: Reaktionsmechanismen. München: Elsevier GmbH; 2004. ISBN 3-8274-1579-9.
- [151] Laue, T.; Plagens, A.: Namen- und Schlagwortreaktionen der Organischen Chemie. Wiesbaden: B. G. Teubner Verlag; 2006. ISBN-10 3-8351-0091-2. ISBN-13 978-3-8351-0091-6.
- [152] Lau, W. M.; White, A. W.; Gallagher, S. J.; Donaldson, M.; McNaughton, G.; Heard, C. M.: Scope and limitations of the co-drug approach to topical drug delivery. Curr Pharm Des (2008), 14(8): 794-802.
- [153] DiStefano, A.; Sozio, P.; Cocco, A.; Iannitelli, A.; Santucci, E.; Costa, M.; et al.: L-dopa- and dopamine-(*R*)- α -lipoic acid conjugates as multifunctional codrugs with antioxidant properties. J Med Chem (2006), 49(4): 1486-1493.
- [154] Sun, X-F; Wu, Q.; Wang, N.; Cai, Y.; Lin, X-F.: Novel mutual pro-drugs of 2',3'-dideoxyinosine with 3-octadecyloxy-propane-1,2-diol by straightforward enzymatic regioselective synthesis in acetone. Biotechnol Lett (2005), 27(2): 113-117.
- [155] Nudelman, A.; Rephaeli, A.: Novel mutual prodrug of retinoic and butyric acids with enhanced anticancer activity. J Med Chem (2000), 43(15): 2962-2966.
- [156] Howard-Sparks, M.; Al-Ghananeem, A.; Pearson, A.; Crooks, P.: Evaluation of O3 α -, O21-Di-(N1-methyloxycarbonyl-2, 4-dioxo-5-fluoropyrimidinyl)17 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one as a novel potential antiangiogenic drug. J Enzyme Inhib Med Chem (2005), 20(5): 417-428.

- [157] Sheha, M.; Khedr, A.; Elsherief, H.: Biological and metabolic study of naproxen-propyphenazone mutual prodrug. *Eur J PharmSci* (2002), 17(3): 121-130.
- [158] Niedballa, U.; Klose, W.; Böttcher, I.: 4,5-Bis(4-methoxyphenyl)-2-cycloalkylthio-imidazole mit antiphlogistischer Wirkung. *Arch Pharm* (1983), 316(11): 934-940.
- [159] Koppermann, A.: Chalcone als COX-1-, COX-2- und 5-LOX-Inhibitoren zur topischen Anwendung. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2008.
- [160] Anschütz, R.; Schwickerath, K.: Ueber die Constitution der Einwirkungsproducte von Thioharnstoff oder Rhodanammonium und von Harnstoff auf Benzoin. *Liebigs Ann Chem* (1895), 284: 9-25
- [161] Diez-Barra, E.; Gonzalez, R.; de la Hoz, A.; Rodríguez, A.; Sánchez-Verdú, P.: Acetyl substituted benzenes. Useful cores for the synthesis of dendrimeric polyketones. *Tetr Lett* (1997), 38(49): 8557-8560.
- [162] Trost, B. M.; Curran, D. P.: Chemoselective oxidation of sulfides to sulfones with potassium hydrogen persulfate. *Tetr Lett* (1981), 22(14): 1287-1290.
- [163] Travis, B. R.; Sivakumar, M.; Hollist, G. O.; Borhan, B.: Facile oxidation of aldehydes to acids and esters with oxone. *Org Lett* (2003), 5(7): 1031-1034.
- [164] Bose, A. K.; Lal, B.: A facile replacement of hydroxyl by halogen with inversion. *Tetr Lett* (1973), 14(40): 3937-3940.
- [165] Friebolin, H.: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH; 1999. ISBN 3-527-29514-3.
- [166] International Union of Pure and Applied Chemistry: <http://www.iupac.org/goldbook/S05508.pdf> (Stand 1997)
- [167] Ducki, S.; Forrest, R.; Hadfield, J. A.; et al.: Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorg Med Chem Lett* (1998), 8(9): 1051-1056.
- [168] Zarghi, A.; Najafnia, L.; Daraee, B.; Dadrass, O. G.; Hedayati, M.: Synthesis of 2,3-diaryl-1,3-thiazolidine-4-one derivatives as selective Cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* (2007), 17(20): 5634-5637.
- [169] Cayman Chemical: COX Inhibitor Screening Assay Kit. <http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/560131/a/z> (Stand 2010)

- [170] Bertin Pharma: Assay of COX-1- and COX-2- activity. http://www.spibio.com/spibio/template/document.jsf;jsessionid=69EA8DDBE82DB44097204BE778DA7175?onglet=scientific&where=scientific&doc=dp6AssCOX-1_COX-2.html&title=Assay+of+COX-1+and+COX-2+activity (Stand 2010)
- [171] Cayman Chemical: Colorimetric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay. <http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/760111/a/z> (Stand 2010)
- [172] Cayman Chemical: COX Fluorescent Inhibitor Screening Assay. <http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/700100> (Stand 2010)
- [173] Noreen, Y.; Ringbom, T.; Perera, P.; Danielson, H.; Bohlin, L.: Development of a radiochemical cyclooxygenase-1 and -2 in vitro assay for identification of natural products as inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod* (1998), 61(1): 2-7.
- [174] White, H.; Glassman, A. T.: A simple radiochemical assay for prostaglandin synthetase. *Prostaglandins* (1974), 7(2): 123-129.
- [175] Lehr, M.: Synthese und Testung von 5-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-hemmenden Mono- und Diarylierten 2,3-Dihydro-1*H*-Pyrrolizinen und diarylierten Pyrrolen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 1989.
- [176] Ledergerber, G.; Hartmann, R.W.: Development of a screening assay for the in vitro evaluation of thromboxane A2 synthase inhibitors. *J Enz Inhib Med Chem* (1995), 9(4): 253-261.
- [177] Dannhardt, G.; Lehr, M.: In vitro-evaluation of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors using bovine neutrophils and platelets and HPLC. *J Pharm Pharmacol* (1992), 44(5): 419-424.
- [178] Sweeney, F. J.; Pereira, M. J.; Eskra, J. D.; Carty, T. J.: The use of 12-hydroxyheptadecatrienoic acid (HHT) as an HPLC/spectrophotometric marker for Cyclooxygenase pathway activity in resident rat peritoneal cells. *Prostaglandins Leucotrienes Med* (1987), 26(3): 171-177.
- [179] Dannhardt, G.; Flemmer, L.; Hartmann, R. W.; Kleber, A.; Schulze, E.: Spectrofluorimetric quantification of malondialdehyde for evaluation of cyclooxygenase-1/thromboxane synthase inhibition. *Arch Pharm* (1998), 331(11): 359-364.

- [180] IBL: Human COX-2 Assay Kit.
<http://www.ibl-america.com/pdf/newIBLelisa/27186.pdf> (Stand 2010)
- [181] Assay Designs: COX-II (human) Enzyme Immunometric Assay Kit.
<http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/redacteur/pdf/adi/ADI-900-094.pdf>
(Stand 2009)
- [182] Arbeitsanweisung COX-2 / Vollblut Testsystem (1998), AK Dannhardt
- [183] Handbuch: Correlate-EIATM; Prostaglandin E2 Enzyme Immunoassay Kit;
Catalog No. 900-001; Assay Designs Inc.
- [184] Cayman Chemical: Lipoxygenase Inhibitors Screening Assay Kit.
<http://www.caymanchem.com/pdfs/760700.pdf> (Stand 2010)
- [185] Cho, Y. S.; Kim, H. S.; Cheon, H. G.: Application of the ferrous oxidation-xylenol orange assay for the screening of 5-lipoxygenase inhibitors. *Analytical Biochemistry* (2006), 351(1): 62-68.
- [186] Breton, J.; Keller, P.; Chabot-Fletcher, M.; Hillegass, L.; DeWolf, W.; Griswold, D.: Use of a continuous assay of oxygen consumption to evaluate the pharmacology of 5-lipoxygenase inhibitors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (1993), 49(6): 929-937.
- [187] Aharony, D.; Stein, R. L.: Kinetic mechanism of guinea pig neutrophil 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* (1986), 261(25): 11512-11519.
- [188] Walstra, P.; Verhagen, J.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F.: Leukotriene formation by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* (1984), 795 (3): 499-503.
- [189] Jaatinen, T.; Laine, J.: Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. *Curr Protoc Stem Cell Biol* (2007), Chapter 2, Unit 2A.1
- [190] Verhagen, J.; Wassink, G. A.; Kijne, G. M.; Viëtor, R. J.; Bruynzeel, P. L.: Rapid, simple and efficient extraction of arachidonic acid metabolites, including the sulfidopeptide leukotrienes LTC₄ und LTD₄, using octadecyl reversed-phase extraction columns. *J. Chromatogr* (1986), 378(1): 208-214.
- [191] Baud, V.; Karin, M.: Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* (2001), 11(9): 372-377.
- [192] Nielsen, U. B.; Geierstanger, G. H.: Multiplexed sandwich assays in microarray format. *J Immunol Methods* (2004), 290(1-2): 107-120.

- [193] Handbuch: TiterZyme® EIA; human TNF- α Enzyme Immunometric Assay Kit; Catalog No. 900-099; Assay Designs Inc..
- [194] Cell Proliferation Kit II (XTT), Cat. No. 11 465 015 001, Roche Applied Science.
- [195] Paull, K. D.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R.; Parsons, J. L.; Risbood, P. A.; Barbera, W. A.; et al.: The synthesis of XTT: a new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. *J Heterocyclic Chem* (1988), 25(3): 911.
- [196] Roehm, N.W.; Rodgers, G. H.; Hatfield, S. M.; Glasebrook, A. L.: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immun Method* (1991), 142: 257-265.
- [197] Ziegler-Heitbrock, H. W.; Thiel, E.; Fütterer, A.; Herzog, V.; Wirtz, A.: Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* (1988), 41: 456-461.
- [198] OECD Guideline for testing of chemicals, 117, 30.03.1989
- [199] Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C.: A new substituent constant, π , derived from partition coefficients. *J Am Chem Soc* (1964), 86: 5175-5180.
- [200] Liu, X.; Tanaka, H.; Yamauchi, A.; Testa, B.; Chuman, H.: Determination of lipophilicity by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Influence of 1-octanol in the mobile phase. *J Chromatogr A* (2005), 1091(1-2): 51-59
- [201] Slater, B.; McCormack, A.; Avdeef, A.; Comer, J. E.: pH-metric log P. 4. Comparison of partition coefficients determined by HPLC and potentiometric methods to literature values. *J Pharm Sci* (1994), 83(9): 1280-1283.
- [202] CambridgeSoft Support Tech Note: Was ist der Unterschied zwischen logP und ClogP?
<http://www.cambridgesoft.com/services/DesktopSupport/KnowledgeBase/TechNotes/details/Default.aspx?TechNote=736&l=en> (Stand 2010)
- [203] Biobyte: ClogP 4.0. <http://www.biobyte.com/bb/prod/clogp40.html> (Stand 2010)
- [204] U.S. Food and Drug Administration (FDA): Definition IC50.
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/slides/3621s1d/sld036.htm> (Stand 2010)

- [205] Scholz, M.: Untersuchungen zu COX/LOX-Inhibitoren mit Hydroxylradikalfängereigenschaften – Synthese, Testung und Modelling. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2007.
- [206] Beetge, E.; du Plessis, J.; Müller, D. G.; Goosen, C.; van Rensburg, F. J.: The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAIDs on their transdermal absorption. *Int J Pharm* (2000), 193(2): 261-264.
- [207] Kolbe, L.; Immeyer, J.; Batzer, J.; et al.: Anti-inflammatory efficacy of Licochalcone A: correlation of clinical potency and in vitro effects. *Arch Dermatol Res* (2006), 298(1): 23-30.
- [208] Wei, B.; Teng, C.; Wang, J.; Won, S.; Lin, C.: Synthetic 2',5'-dimethoxychalcones as G2/M arrest mediated apoptosis-inducing agents and inhibitors of nitric oxide production in rat macrophages. *Eur J Med Chem* (2007), 42(5): 660-668.
- [209] Jung, J.; Jang, S.; Lee, Y.; et al.: Efficient Synthesis and Neuroprotective Effect of Substituted 1,3-Diphenyl-2-propen-1-ones. *J Med Chem* (2008), 51(13): 4054-4058.
- [210] Schneider, M. R.: 2-Alkyl-substituted 1, 1-bis(4-acetoxyphenyl)-2-phenylethenes. Estrogen receptor affinity, estrogenic and antiestrogenic properties, and mammary tumor inhibiting activity. *J Med Chem* (1986), 29(8): 1494-1498.
- [211] Petrenko-Kritschenko, P.: Ueber einige Derivate des Desoxybenzoin. *Chem Berichte* (1892), 25(2): 2239-2242.
- [212] Bauer, D. P.; Macomber, R. S.: Iodide catalysis of oxidations with dimethyl sulfoxide. Convenient two-step synthesis of α -diketones from α -methylene ketones. *J Org Chem* (1975), 40(13): 1990-1992.
- [213] Cooper, D. J.; Owen, L. N.: Cytotoxic Compounds. Part VII. α -Aryl- α -halogenoacetophenones, their enol acetates, and some related compounds. *J Chem Soc C* (1966), 533-540.
- [214] Steude, M.: Untersuchungen über Azole. 13. Ueber Thiazolderivate aus Brombrenztraubensäuren und Bromacetessigester. *Liebigs Ann Chem* (1898), 261(1): 22-47

- [215] Lehmann, M.; Scharfel; Hennecke, M.; Meier, H.: Dendrimers consisting of stilbene or distyrylbenzene building blocks synthesis and stability. *Tetr* (1999), 55(47): 13377-13394
- [216] Wen, L.; Li, M.; Schlenoff, J. B.: Porphyrin thin films from the interfacial polymerization of mercaptoporphyrins. *J Am Chem Soc* (1997), 119(33): 7726-7733

