

# Entwicklung von Inhibitoren der mikrosomalen Prostaglandin E Synthase 1

**Florian Rörsch**

aus Frankfurt am Main



vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität Frankfurt am Main

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. Thomas Prisner

Gutachter: Frau Prof. Dr. Sabine Grösch  
Herr Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Datum der Disputation:

*„Da es sehr förderlich für die Gesundheit ist,  
habe ich beschlossen glücklich zu sein!“*

Voltaire

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
1.1 Schmerzen und Entzündungen.....	7
1.2 Schmerztherapie.....	9
1.3 Schmerztherapeutika.....	10
1.3.1 Opioid-Analgetika.....	10
1.3.2 Nicht-Opioid-Analgetika - tNSAIDs und Coxibe.....	12
1.3.2.1 Nebenwirkungen von Nicht-Opioid-Analgetika tNSAIDs und Coxibe.....	13
1.3.3 Weitere Schmerztherapeutika.....	14
1.4 Die Arachidonsäurekaskade.....	16
1.4.1 Physiologie der Prostanoid.....	16
1.5 Prostaglandin E-Synthasen.....	20
1.5.1 Prostaglandin E Synthase 1 (mPGES-1).....	21
1.5.2 mPGES-1 als therapeutisches Ziel.....	22
1.5.3 mPGES-1-Inhibitoren.....	24
1.5.4 <i>In silico</i> -Screening nach mPGES-1-Inhibitoren.....	25
1.6 Vorarbeiten.....	26
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	27
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>28</b>
2.1 Chemikalien.....	28
2.2 Zellmedien.....	30
2.3 Puffer und Lösungen.....	31
2.4 Chemische Methoden.....	35
2.4.1 Synthese von FR4-Derivaten.....	35
2.4.2 Synthese von FR20-Derivaten.....	35
2.4.2.1 Synthese von 3-(3-Chlorbenzyl)-6-iod-2-propylquinazolin-4(3H)-on.....	35
2.4.2.2 Synthese von 2-Chlor-N-(3-(3-chlorbenzyl)-4-oxo-2-propyl-3,4-dihydroquinazolin-6-yl)-6-fluorbenzamide (FR20-Dev21).....	36
2.4.2.3 Synthese von 2,6-Dichlor-N-(3-(3-chlorbenzyl)-4-oxo-2-propyl-3,4-dihydroquinazolin-6-yl)benzamide (FR20-Dev23).....	37
2.4.2.4 Synthese von N-(3-(3-Chlorobenzyl)-4-oxo-2-propyl-3,4-dihydroquinazolin-6-yl)-2-methylbenzamide (FR20-Dev24).....	38
2.5 Biologische Methoden.....	39
2.5.1 Zellbasierte Methoden.....	39
2.5.1.1 Verwendete eukaryontische Zelllinien.....	39
2.5.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	40
2.5.1.3 Passagieren von eukaryontischen Zellen.....	40
2.5.1.4 Bestimmung der Zellzahl.....	41
2.5.1.5 Bestimmung der Zellviabilität (WST-Assay).....	41
2.5.1.6 Bestimmung der Hemmung der zellulären Prostanoid-Biosynthese.....	42
2.5.2 Proteinbiochemische Methoden.....	43
2.5.2.1 Extraktion der mikrosomalen Fraktion.....	43

2.5.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	44
2.5.2.3	Immunoblot-Analyse (Western-Blot) .....	44
2.5.2.4	mPGES-1 Assay .....	46
2.5.2.5	COX-1/2 Assay .....	47
2.5.3	Methoden mit humanem Vollblut .....	47
2.5.3.1	COX-1 Vollblut-Assay .....	47
2.5.3.2	COX-2 Vollblut-Assay .....	48
2.5.3.3	Leukotriene / HETEs-Vollblut-Assay .....	49
2.5.4	In Vivo Methoden .....	49
2.5.4.1	Genehmigung .....	50
2.5.4.2	Wirkstoffformulierung (Galenik) .....	50
2.5.4.3	<i>In Vivo</i> Pharmakologie .....	51
2.5.4.4	<i>In Vivo</i> Entzündungsmodell .....	52
2.6	LC-MS/MS Analytik .....	53
2.6.1	Quantitative Bestimmung von Prostanoiden .....	54
2.6.2	Quantitative Bestimmung von Leukotrienen und HETEs .....	57
2.6.3	Quantitative Bestimmung von FR4-Dev6 .....	60
2.7	Bioinformatische Methoden .....	62
2.7.1	Homologie Modelling .....	62
2.7.2	Docking .....	63
2.7.3	Protein Ligand Interaction Fingerprints (PLIF) .....	64
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>65</b>
3.1	Substanzklassenbezeichnung, Löslichkeit und Lagerung .....	65
3.2	Substanzklasse FR4 .....	65
3.2.1	FR4-Derivate .....	66
3.2.2	Interner Standard zu FR4-Dev6 .....	73
3.2.3	Quantitative Bestimmung von FR4-Dev6 und FR4-Dev6- <i>d</i> <sub>3</sub> .....	74
3.3	Substanzklasse FR20 .....	75
3.3.1	FR20-Derivate .....	76
3.3.1.1	Synthese neuer FR20-Derivate mit Quinazolinon-Grundgerüst .....	80
3.4	Aktivitätsbestimmung auf isoliertem humanem und murinem mPGES-1-Enzym .....	81
3.5	Selektivitätsbestimmung gegenüber COX-1/2 .....	84
3.6	Zellviabilität und Hemmung der mPGES-1 auf zellulärer Ebene .....	85
3.7	Einflüsse von mPGES-1-Inhibitoren auf die Arachidonsäurekaskade in humanem Vollblut .....	89
3.8	Wirkstoffformulierung (Galenik) .....	94
3.9	Pharmakokinetik von FR4-Dev6 in Mäusen .....	98
3.10	<i>In Vivo</i> Entzündungsmodell .....	107
3.11	Statistische Berechnungen .....	110
3.12	Homologie-Modell der offenen Konformation der mPGES-1 .....	112
3.13	Homologie-Modell der Nagetier-mPGES-1 (Maus und Ratte) .....	114
3.14	Protein-Ligand-Interaction-Fingerprints (PLIF) .....	116
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>119</b>
4.1	mPGES-1 als Zielmolekül in der Wirkstoffentwicklung .....	119
4.2	Screeningmethodik .....	121

4.3 Auswahl der Wirkstoffklassen .....	121
4.4 Struktur-Aktivitäts-Beziehungsanalyse der Benzensulfonamid- Strukturklasse .....	122
4.5 Struktur-Aktivitäts-Beziehungsanalyse der Quinazolinon-Strukturklasse .....	126
4.6 Speziesübergreifende Aktivitätsbestimmungen und mPGES-1 Assay..	129
4.6.1 Die mPGES-1 in Nagetieren – strukturelle Aspekte für das Wirkstoffdesign.....	131
4.7 Evaluierung von Zelltoxizität und zellulärer Aktivität von mPGES-1- Inhibitoren .....	134
4.8 Modulation der Arachidonsäurekaskade in komplexen Testsystemen .	140
4.9 <i>In Vivo</i> -Pharmakologie von mPGES-1-Inhibitoren .....	145
4.9.1 Evaluierung der speziesübergreifenden mPGES-1-Hemmung von Benzensulfonamid- und Quinazolinonderivaten .....	147
4.9.2 Selektion eines Dualspezies-mPGES-1-Inhibitors für pharmakologische <i>in vivo</i> -Untersuchungen.....	148
4.9.3 Entwicklung einer Formulierung zur oralen und parenteralen Applikation von FR4-Dev6.....	150
4.9.4 Bewertung pharmakokinetischer Eigenschaften nach oraler und intraperitonealer Gabe von FR4-Dev6 .....	153
4.9.5 Untersuchungen zur Wirksamkeit von FR4-Dev6 in einem <i>in vivo</i> -Entzündungsmodell .....	158
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>161</b>
<b>6 PERSPEKTIVE (AUSBLICK) .....</b>	<b>163</b>
<b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>165</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>168</b>
<b>9 ANHANG.....</b>	<b>185</b>
9.1 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit .....	185
9.2 Sonstige Veröffentlichungen .....	185
9.3 Lebenslauf .....	187
9.4 Förderung und Danksagung .....	189
9.5 Eidesstattliche Erklärung .....	191

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Schmerzen und Entzündungen

Schmerzen werden als unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis wahrgenommen<sup>2</sup> und üben unter physiologischen Bedingungen eine lebenswichtige Schutzfunktion aus. Unter günstigen Umständen kann so eine Schädigung des Körpers verhindert werden. Schmerzen können vielfältige Ursachen haben. Dabei unterscheidet man nozizeptiven Schmerz von inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen<sup>3</sup>. Ersterer wird durch thermische, chemische, mechanische oder elektrische Reize ausgelöst, welche auf Sensoren mit einer hohen Reizschwelle wirken - den so genannten Nozizeptoren. Wird dabei ein Schwellenwert überschritten, löst dies ein Aktionspotential am Nerv aus. Dieses Signal wird dann zum Rückenmark weitergeleitet, wo eine erste Signalverarbeitung stattfindet, bevor eine Weiterleitung über spinothalamische Bahnen ins Gehirn folgt (siehe Abbildung 1).

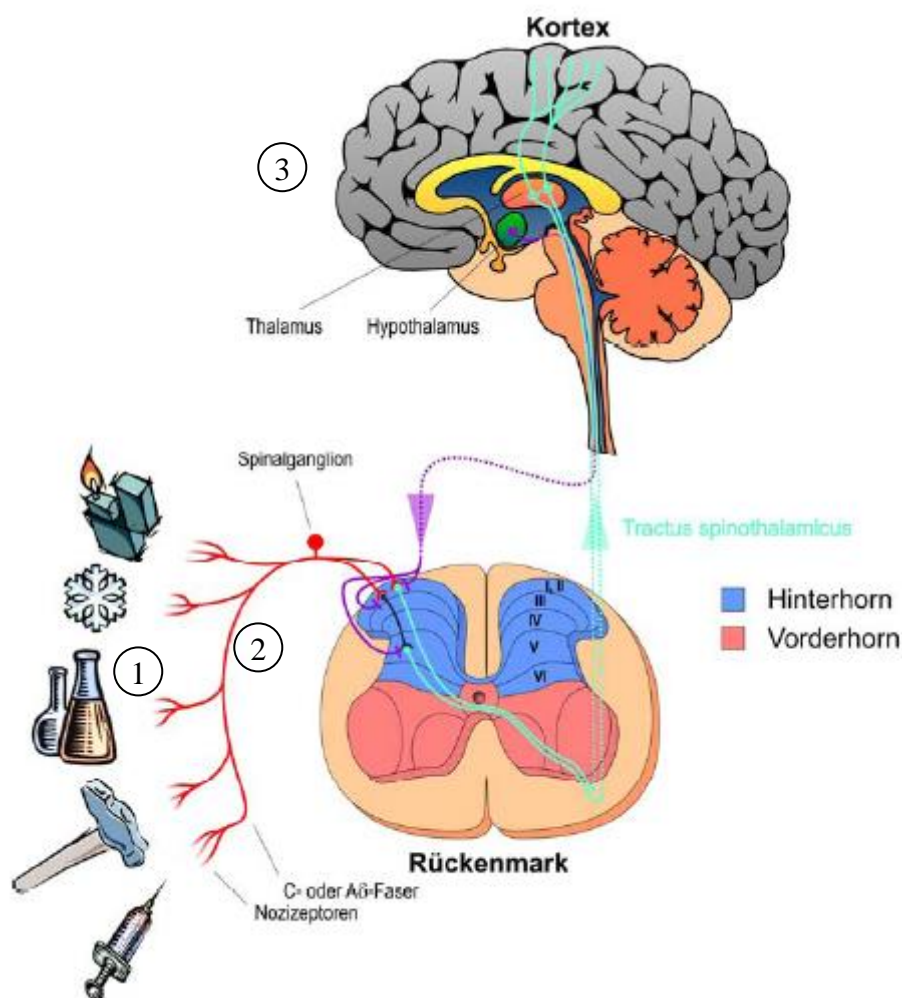
Inflammatorische Schmerzen können nach einer mechanischen Schädigung des Gewebes, Infektionen, Ischämien, Autoimmunerkrankungen, durch Tumore und verschiedene chemische Substanzen ausgelöst werden<sup>3</sup>. Dabei werden zahlreiche proinflammatorische Mediatoren lokal am Ort der Entzündung freigesetzt, die zuvor gar nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorhanden waren. Dieser inflammatorische Cocktail besteht aus Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Kininen, Purinen, Amininen, Ionen und Prostaglandinen, welche von lokal betroffenen Zellen, aber auch von ins entzündete Gewebe einwandernden Immunzellen freigesetzt werden<sup>4-5</sup>.

Länger anhaltende inflammatorische Reize können dazu führen, dass der Schwellenwert herabgesetzt wird. Insbesondere (chronische) Entzündungskrankheiten, wie rheumatische Arthritis, Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (UC), chronische Pankreatitis, Arteriosklerose, Sarkoidose, Glomerulonephritis usw., aber auch Infektionen, Tumorerkrankungen, Allergien

und verschiedene andere Erkrankungen können dadurch zu einer Hyperalgesie führen.

Neben dem Schmerz treten bei einer Entzündung meist weitere Symptome, wie Rötung, Schwellung, Überwärmung (eventuell Fieber) und eingeschränkte Funktion, auf. Eine Entzündung kann auch dann vorhanden sein, wenn nicht alle dieser Kardinalsymptome vorliegen.

Abhängig von Ursache, Intensität und Dauer dieser pathophysiologischen Symptome ist die medizinische Behandlung variabel. Es wird häufig eine



**Abbildung 1:** Schema der Schmerzweiterleitung<sup>1</sup>

Kombination aus kausaler Therapie und symptomatischer Therapie und eventuell anschließender präventiver bzw. prophylaktischer Maßnahmen



eingesetzt. Die kausale Therapie hat das Ziel die krankheitserregende Ursache zu beseitigen. Im Fall einer akuten nicht-chronischen Entzündung könnte das beispielsweise durch die Behandlung einer bakteriellen Infektion mit Antibiotika geschehen. Zusätzlich wird häufig eine symptomatische Therapie notwendig, um das Wohlbefinden des Patienten zu steigern. So wird beispielsweise bei der Behandlung der chronischen rheumatischen Arthritis (chronische Polyarthrit) je nach Schwere der Erkrankung neben krankheitskontrollierenden Medikamenten (engl. *Disease modifying anti-rheumatic drugs*, DMARD; z. B. Methotrexat) auch Analgetika (Schmerzmittel; z. B. Diclofenac) eingesetzt<sup>6</sup>.

## 1.2 Schmerztherapie

Laut dem aktuellen Arzneiverordnungsreport 2013 werden Analgetika allein in Deutschland jährlich über 38 Millionen mal verschrieben und befinden sich damit auf Platz 5 der meist verschriebenen Medikamente<sup>7</sup>. Auch in der Selbstmedikation spielen Analgetika eine zentrale Rolle – sie befanden sich 2011 mit einem Volumen von 445 Millionen Euro Umsatz auf Platz drei der umsatzstärksten freiverkäuflichen Medikamente (engl. „*Over the counter*“, OTC)<sup>8</sup>. Auf dem US-Markt ist das mit weitem Abstand am meisten verschriebene Präparat laut der Njardarson-Gruppe der Universität von Arizona ein Analgetikum (Kombinationspräparat bestehend aus Hydrocodone & Acetaminophen), unter den Top 10 wird es gleich drei mal gelistet<sup>9</sup>. Eine Analyse von IMS Health zu den am meisten verschriebenen Medikamenten weltweit im Jahr 2012 zeigt eine vergleichbare Tendenz: Schmerztherapeutika befinden sich hier auf Platz zwei (nach Onkologiemedikamenten)<sup>10</sup>. Warum werden so häufig Schmerzmedikamente eingesetzt? Eine Untersuchung der häufigsten Ursachen für einen Arztbesuch der Barmer Krankenkassen (Arztreport 2011<sup>11</sup>) listet Rückenschmerzen als zweit-wichtigstes Störungsbild (24 %). Daneben wurden in 10 % aller Fälle Bauch- und Beckenschmerzen diagnostiziert, in 5 % Schmerzen in Zusammenhang mit den weiblichen Genitalorganen und dem Menstruationszyklus, in 4 % Kopfschmerzen und in 4 % andernorts nicht klassifizierte Schmerzen. Dabei wurde noch nicht erfasst,

dass auch bei anderen Diagnosen Schmerz als Begleitsymptom auftreten kann. Auch der Report aus dem Jahr 2013 zeigt hier keine Veränderung<sup>12</sup>. Schmerzen sind also seit Jahren eine der häufigsten Ursachen für einen Arztbesuch. Darüber hinaus können viele Schmerzmedikamente rezeptfrei in Apotheken erworben werden und spielen eine zentrale Rolle in der Selbstmedikation. Unterstützt wird die Anwendung durch einen verhältnismäßig günstigen Preis und eine flächendeckende Verfügbarkeit.

### **1.3 Schmerztherapeutika**

Für die Schmerztherapie stehen der Medizin zahlreiche Medikamente mit antiphlogistischer, analgetischer und antipyretischer Wirkung zur Verfügung. Man unterscheidet traditionelle nichtsteroidale Antiphlogistika (tNSAIDs; engl. für *traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs*) und Coxibe, von Glukokortikoiden, Opioiden, Psychopharmaka, Biopharmazeutika (engl. *biologicals*), Anästhetika, sowie pflanzlichen und homöopathischen Präparaten. Ihre Wirkung entfalten sie dabei auf unterschiedlichen Ebenen der Schmerz- bzw. Entzündungskaskade, in verschiedenen Organen und Geweben und über verschiedene Mechanismen. Unterschieden werden dabei eine lokale Wirkung am Nozizeptor bzw. dessen Umgebung (siehe Abbildung 1, Nr. 1), eine Wirkung im Bereich der Signalweiterleitung über C- und A-Fasern ins Hinterhorn des Rückenmarks<sup>1</sup> (siehe Abbildung 1, Nr. 2), sowie eine Wirkung im Gehirn nach Verschaltung auf sekundäre Neurone und einer Weiterleitung in den Thalamus und von dort aus in weitere Gehirnareale (siehe Abbildung 1, Nr. 3).

Die Wirkung der gängigsten Analgetika- und Anästhetika-Gruppen und Wirkstoffe ist mittlerweile gut untersucht.

#### **1.3.1 Opioid-Analgetika**

Bei mittelstarken (Stufe 2) bis starken Schmerzen (Stufe 3) sollen laut WHO-Stufenschema Opioide eingesetzt werden. Diese können gegebenenfalls mit Nicht-Opioid-Analgetika (siehe Kapitel 1.3.2) kombiniert werden, da sie einen

anderen Wirkmechanismus aufweisen. Es werden schwach wirksame (z. B. Tramadol, Codein) von stark wirksamen Opioiden (z. B. Oxycodon, Fentanyl, Morphin, Methadon) unterschieden. Ihre schmerzstillende Wirkung wird dabei in Relation zu der von Morphin gesetzt. Schwach wirksame Opioide hemmen das Schmerzempfinden also geringer als Morphin, stark wirksame Opioide gleichgütig oder sogar stärker. Ihre Wirkung entfalten Opioide über das körpereigene schmerzhemmende System. Dieses besteht aus einer Gruppe von Opioid-Rezeptoren, welche durch endogene Peptide – den so genannten Endorphinen und Enkephalinen – aktiviert werden und darüber die Schmerzempfindung dämpfen. Dies ermöglicht dem Körper auch in extremen Krisensituationen (z. B. bei Verletzungen) noch handlungsfähig zu bleiben. Opioid-Analgetika nutzen dieses System, indem sie an dieselben Rezeptoren binden und damit äußerst effektiv das Schmerzempfinden reduzieren. Abgesehen von einigen niedrigdosierten Zubereitungen fallen Opioid-Analgetika in der Regel in Deutschland unter das Betäubungsmittelgesetz (BtMG) und bedürfen somit spezieller BtM-Rezepte.

Opioid-Analgetika zeigen neben Anästhetika die stärkste Schmerzhemmung. Da Opioide auf Grund ihrer euphorisierenden und sedierenden Wirkung auch missbräuchlich verwendet werden, werden die Abgabe und Einsatz ebenfalls überwacht. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Atemdepression, Vigilanzminderung und Obstipation (bei längerer Anwendung). Abhängigkeiten treten bei therapeutisch korrekter Anwendung eher selten auf und sollten daher nicht mit missbräuchlich häufig überdosierter Anwendung von nicht zugelassenen Opioiden (z. B. Heroin) verwechselt werden<sup>20</sup>. Insbesondere die Atemdepression steht in direktem Zusammenhang mit der analgetischen Potenz des Opioids, was eine strenge Überwachung des Patienten, vor allem beim Einsatz starker Opioide, notwendig macht. Der Einsatz von Opioiden ist deshalb nur dann sinnvoll, wenn eine ärztliche Überwachung möglich ist und mittlere, schwere bzw. chronische Schmerzen vorliegen, die nicht mit anderen Analgetika ausreichend therapiert werden können. Ausnahmen bilden niedrigdosierte Opioidpräparate, wie sie z. B. in Antitussiva (hustenreizstillenden) Arzneimitteln eingesetzt werden.

### 1.3.2 Nicht-Opioid-Analgetika - tNSAIDs und Coxibe

Die am häufigsten eingesetzten Schmerztherapeutika entstammen der Gruppe der Nicht-Opioid-Analgetika. Es werden zwei wichtige Wirkstoffgruppen unterschieden: Zum einen tNSAIDs (engl. für *traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs*), im deutschen Sprachraum auch als nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) bezeichnet, sowie Coxibe. Beide Gruppen werden primär zur Therapie von leichten Schmerzen (Stufe 1 laut WHO-Stufenschema) und Fieber eingesetzt, aber auch unterstützend bei der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, juvenile Arthritis, Osteoarthritis, Muskelentzündungen), sowie bei Opiat-Entzug zur Schmerzstillung, bei Erfrierungen und zur Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Zu den tNSAIDs zählen die Wirkstoffgruppen der Salicylsäurederivate (Acetylsalicylsäure etc.), Propionsäurederivate (Ibuprofen, Flurbiprofen, Naproxen etc.), Aryl-, Indol- und Anthranilelessigsäurederivate (Diclofenac, Indomethacin, Mefaminsäure etc.) und Oxicame (Piroxicam, Meloxicam etc.). Drei Vertreter – die Acetylsalicylsäure, Ibuprofen und Diclofenac – werden in der *Liste der unentbehrlichen Arzneimittel* der Weltgesundheitsorganisation bereits seit 1977 geführt<sup>13</sup>.

Die Zahl der zugelassenen Coxibe ist in den letzten Jahren deutlich gesunken, nachdem einige Hersteller ihre Präparate vom Markt nehmen mussten (Rofecoxib, Lumiracoxib, Valdecoxib). Drei Coxibe sind allerdings noch zugelassen: Parecoxib, Etoricoxib und Celecoxib.

tNSAIDs hemmen konzentrations- und wirkstoffabhängig die Cyclooxygenasen 1 und/oder 2<sup>14-16</sup>, während Coxibe nur die Cyclooxygenase 2 hemmen, was beide Gruppen deutlich von den Opioid-Analgetika abgrenzt. Beide COX-Isoformen sind zentrale Enzyme der Arachidonsäurekaskade und katalysieren die Umwandlung der Arachidonsäure zu Prostaglandin H<sub>2</sub>, welches wiederum von einer Reihe weiterer Enzyme zu Prostaglandin D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub>, I<sub>2</sub> (Prostacyclin) und Thromboxan A<sub>2</sub> umgewandelt werden kann. Prostaglandin E<sub>2</sub> wirkt als pro-nozizeptive und pro-inflammatorischer Lipidmediator, spielt aber auch eine wichtige physiologische Rolle (siehe Kapitel 1.4.1).

### **1.3.2.1 Nebenwirkungen von Nicht-Opioid-Analgetika tNSAIDs und Coxibe**

Beim Einsatz von tNSAIDs kann es insbesondere zu gastrointestinalen Nebenwirkungen kommen<sup>24</sup>, bedingt durch die Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) im Magen, welche dort konstitutiv expremiert wird und eine wichtige protektive Funktion ausübt. Die Hemmung der COX-1 im Magen führt zu einer erhöhten Magensäuresekretion, verringerter Bikarbonat- und Schleimsekretion bei gleichzeitiger direkter Reizung durch die Azidität der Wirkstoffe. Dies kann bei längerfristigen Einnahme zu einem Ulcus und Magenblutungen führen, die unbehandelt lebensgefährlich werden können<sup>25-26</sup>. Coxibe hemmen im Gegensatz zu tNSAIDs nur die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und zeigen deshalb deutlich weniger gastrointestinale Komplikationen. tNSAIDs und Coxibe zeigen zudem häufig renale Nebenwirkungen, was ebenfalls in Verbindung mit den in der Niere konstitutiv expremierten Cyclooxygenasen steht. Insbesondere bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz kann bei Einnahme von tNSAIDs eine zusätzlich verringerte Filtrationsrate und verminderte Natrium-Resorption<sup>27</sup> gemessen werden, wodurch die Ausbildung von Bluthochdruck begünstigt wird. In schlimmen Fällen kann es zu akutem Nierenversagen kommen, insbesondere wenn zusätzlich ACE-Inhibitoren und Diuretika eingenommen werden. Besonders ältere Menschen mit multimorbiden Erkrankungen nehmen häufig mehrere dieser Medikamente ein, was deren Nebenwirkungen potenzieren kann.

Sowohl tNSAIDs als auch Coxibe zeigen ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen<sup>24</sup>. Die Inzidenz ist bei beiden Wirkstoffgruppen in etwa vergleichbar, wenn auch Unterschiede zwischen den einzelnen Wirkstoffen festgestellt wurden. So zeigt Celecoxib beispielsweise eine geringere Inzidenz für kardiovaskuläre Komplikationen als Rofecoxib. Rofecoxib musste deshalb 2004 vom Markt genommen werden, nachdem in einer Phase III-Studie eine stark erhöhte Rate an Herz-Kreislaufkrankungen festgestellt wurde<sup>28-29</sup>. Vor allem Herzinfarkte, Schlaganfälle und Angina Pectoris stellen eine lebensbedrohliche Gefahr dar, weshalb Patienten mit bekannter

Herzinsuffizienz von der Verwendung von tNSAIDs und Coxiben abgeraten wird<sup>30</sup>.

Die Wirkung (und Nebenwirkungen) von tNSAIDs und Coxiben wird auf biochemischer Ebene im Detail in Kapitel 1.4 erläutert.

### **1.3.3 Weitere Schmerztherapeutika**

Lokal-Anästhetika werden zur Betäubung der Schmerzrezeptoren eingesetzt. Heutige Wirkstoffe (Lidocain, Ropivacain, Bupivacain, etc.) besitzen im Gegensatz zu Betäubungsmitteln keine euphorisierende oder suchterzeugende Wirkung. Auf Grund ihrer teilweise schnellen Wirkung und kurzen Wirkdauer eignen sie sich vor allem für kurze chirurgische Eingriffe. Ihre Wirkung entfalten sie über die Blockade von Natriumkanälen (bei höheren Konzentrationen auch der Kaliumkanäle) und verhindern damit die Bildung von Aktionspotentialen am Neuron.

Allgemeinanästhetika (Narkotika) wirken dahingegen zentralnervös und schalten neben dem Schmerzempfinden auch das Bewusstsein aus und werden bei größeren operativen und diagnostischen Maßnahmen eingesetzt.

Anästhetika eignen sich zurzeit nur für einen kurzfristigen, stark überwachten Einsatz, da ihre betäubende Wirkung starken Einfluss auf die Wahrnehmung, Motilität und das Bewusstsein hat. Insbesondere können Störungen der Atmung und des Herz-Kreislauf-Systems sowie Übelkeit und Erbrechen auftreten.

Glucocorticoide zählen zu den steroidalen Antirheumatika, was sie strukturell und funktionell von den zuvor genannten nicht-steroidalen Antirheumatika (siehe Kapitel 1.3.2) abgrenzt. Endogene Glucocorticoide (vor allem Cortisol und Corticosteron) werden in der Nebennierenrinde gebildet und haben ein breites physiologisches Wirkspektrum. In hoher Konzentration wirken sie immunsuppressiv und antiinflammatorisch. Daher werden therapeutische Glucocorticoide insbesondere bei starken allergischen Erkrankungen (z. B. Asthma bronchiale, Anaphylaxie), schweren Infektionen (Sepsis) und anderen

entzündlichen Erkrankungen eingesetzt. Glucocorticoide haben außerdem eine analgetische Wirkung und werden sehr häufig in der adjuvanten Krebs-Therapie eingesetzt<sup>17</sup>. Auch bei der Behandlung von durch Metastasen verursachten Knochenschmerzen, neuropathischen und viszeralen Schmerzen finden Glucocorticoide ihre Anwendung<sup>18</sup>. Ihre breite Wirkung wird auf die Bindung an Steroidrezeptoren, aber auch auf die Hemmung der Prostaglandinsynthese zurückgeführt. Steroidrezeptoren werden sowohl zentralnervös als auch peripher gefunden. Glucocorticoide können die Blut-Hirn-Schranke passieren und daher sowohl im Gehirn/Rückenmark als auch in der Peripherie wirken<sup>19</sup>. Auf Grund ihrer lipophilen Strukturen können sie außerdem gut in die Haut eindringen, was ihre topische Anwendung ermöglicht.

In der kurzfristigen Anwendung zeigen Glucocorticoide wenige Nebenwirkungen, bei längerfristiger Anwendung können allerdings Osteoporose, Myopathien, kardiovaskuläre und gastrointestinale Nebenwirkungen, psychischen Nebenwirkungen, Ödeme, Gewichtszunahme, Schwächung der Immunabwehr und viele weniger häufige Nebenwirkungen auftreten<sup>21-22</sup>.

Die Gruppe der Psychoparhamaka wird vorwiegend zur Behandlung psychischer und neurologischer Erkrankungen eingesetzt. Sie beeinflusst den Neurotransmitterhaushalt bzw. neurologische Strukturelemente. Auf Grund ihrer neuromodulatorischen Wirkung können Psychopharmaka allerdings auch zur Schmerztherapie eingesetzt werden. Insbesondere Antidepressiva und Antikonvulsiva eignen sich für die Behandlung neuropathischer Schmerzen. Diese werden deutlich von inflammatorischen Schmerzen abgegrenzt (weshalb nicht-steroidale Analgetika hier keine Wirkung zeigen).

Psychopharmaka eignen sich nicht für eine Akuttherapie, da ihre analgetische Wirkung erst nach 1 - 2 Wochen eintritt. Sie werden daher hauptsächlich bei neuropathischen und chronischen Schmerzen eingesetzt, bei denen andere Medikamentenklassen keine Wirkung zeigen oder deren Einsatz in der Langzeittherapie stärkere Nebenwirkungen zur Folge hätten. Zu den

Nebenwirkungen von Psychopharmaka zählen vor allem Müdigkeit, Mundtrockenheit, Herzrhythmusstörungen, Glaukome und Gewichtszunahme<sup>23</sup>.

## 1.4 Die Arachidonsäurekaskade

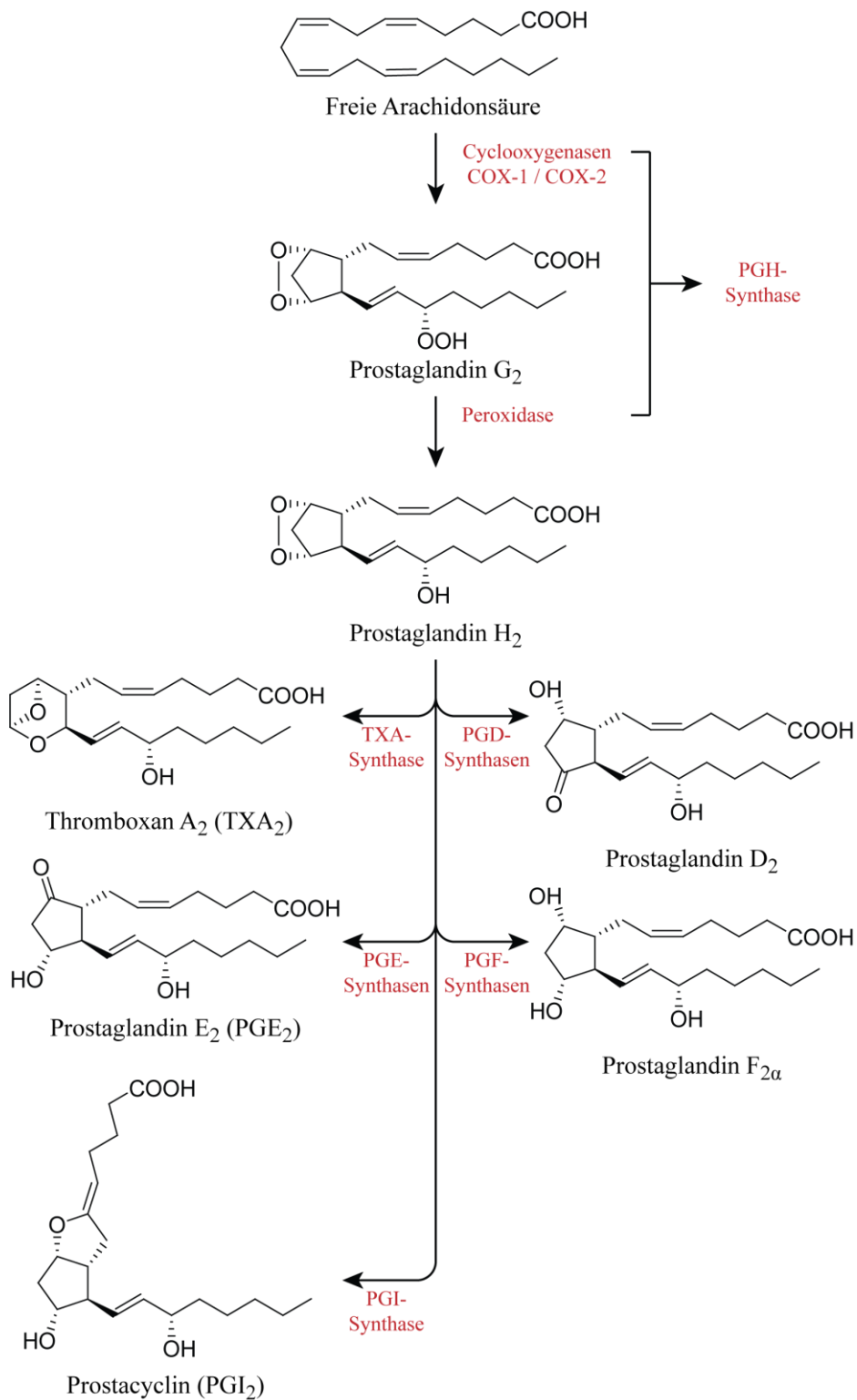
Die zentrale Wirkung aller Cyclooxygenasewirkstoffe (tNSAIDs und Coxibe) wird durch eine Inhibition einer oder beider Cyclooxygenasen erreicht. Diese befinden sich an zentraler Stelle der Arachidonsäurekaskade, deren Name von der obersten Fettsäure der Kaskade herrührt - der C<sub>20</sub>-Fettsäure Arachidonsäure (all-cis- $\Delta$ 5,8,11,14-Eicosatetraensäure bzw. 20:4  $\omega$ -6). Die KEGG-Datenbank<sup>31</sup> umfasst zur Zeit 37 Enzyme und 75 Fettsäurederivate in der Arachidonsäurekaskade. Die Fettsäuren werden in Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane, Leukotriene, Eicosatetraensäuren und Lipoxine unterteilt. Arachidonsäure wird primär über die Nahrung aufgenommen oder aus der Omega-6-Fettsäure Linolsäure über die Zwischenstufen  $\gamma$ -Linolensäure (GLA) und Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure (DGLA) synthetisiert und in veresterter Form in Zellmembranen eingebaut. Das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) katalysiert wiederum die hydrolytische Spaltung von Phospholipiden und setzt dadurch Arachidonsäure aus Membranlipiden frei. Neben der PLA<sub>2</sub> können die Phospholipide auch durch die Phospholipase C (PLC) zu Diacylglycerol (DAG) und dann durch die Diacylglycerol-Lipase (DAGL) weiter zu Arachidonsäure umgewandelt werden<sup>32</sup>.

Die Arachidonsäure kann nun in den verschiedenen Stoffwechselwegen der Arachidonsäurekaskade weiter verstoffwechselt werden.

### 1.4.1 Physiologie der Prostanoiden

Einer der bekanntesten Stoffwechselwege der Arachidonsäure umfasst die Gruppe der Prostanoiden (siehe Abbildung 2). Dazu zählen die Prostaglandine, Thromboxane und Prostacycline. Sie werden alle aus der Arachidonsäure gebildet. Dazu katalysieren die beiden Isoenzyme COX-1/2 aus Arachidonsäure in zwei Schritten Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>).





**Abbildung 2:** Ausschnitt der Arachidonsäurekaskade, der die Generierung der biologisch aktiven Prostanoiden PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> zeigt.

Im ersten Schritt wird das Intermediat Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) durch einen Ringschluss der Kohlenstoffatome C<sub>8</sub> und C<sub>12</sub> gebildet, welches anschließend in einem weiteren Reaktionszentrum mit Peroxidasefunktion zu PGH<sub>2</sub> umgewandelt wird.

Das chemisch instabile PGH<sub>2</sub> dient nun als Substrat für fünf Prostaglandinsynthasen, die daraus die biologisch aktiven Prostanoid Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) bilden<sup>33</sup>. Die gebildeten Prostanoid können nun entweder über einen spezifischen Prostaglandin-Transporter (PGT) aus der Zelle freigesetzt werden, passiv über die Zellmembran diffundieren oder durch Bindung an das Multidrug-Resistenz-Protein MRP4 transportiert werden<sup>34-36</sup>. In autokriner oder parakriner Weise binden sie an spezifische G-Protein gekoppelte Prostaglandin-Rezeptoren (PG) auf der Membranoberfläche. Diese PG besitzen sowohl eine extrazelluläre Domäne zur Bindung eines Liganden, wie auch eine intrazelluläre Effektor-domäne, an die das G-Protein binden kann. Diese Domänen sind über sieben Transmembranhelices miteinander verbunden.

So bindet Thromboxan nach seiner Freisetzung an die TP-Rezeptoren TP<sub>α</sub> und TP<sub>β</sub>, PGD<sub>2</sub> an die DP-Rezeptoren DP<sub>1</sub> und DP<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> an die FP-Rezeptoren FP<sub>α</sub> und FP<sub>β</sub>, PGI<sub>2</sub> an den IP-Rezeptor und PGE<sub>2</sub> an einen der vier EP-Rezeptoren (EP<sub>1</sub> bis EP<sub>4</sub>). Neben G-Protein gekoppelten Rezeptoren können Prostanoid auch über nukleare Rezeptoren wie den Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptoren (PPAR) ihre Wirkung entfalten.

Die Wirkung der Prostanoid ist vielfältig: PGI<sub>2</sub> führt über einen Anstieg des cAMP-Spiegels in Endothelzellen zu einer Vasodilatation, hemmt die Thrombozytenaggregation und vermindert die T-Zellproliferation.

PGD<sub>2</sub> fördert ebenfalls die Vasodilatation und steuert über erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Level die Erschlaffung der glatten Muskulatur des Uterus und Gastrointestinaltrakts, führt in den Atemwegen zur Bronchokonstriktion und induziert die Chemotaxis von Immunzellen.

PGF<sub>2α</sub> führt zu einer Erhöhung von IP<sub>3</sub> und regt damit die Uteruskontraktion an.

TXA<sub>2</sub> ist der Gegenspieler von PGI<sub>2</sub> und erhöht die Thrombozytenaggregation, während es kardiovaskulär zu einer Vasokonstriktion und in den Atemwegen zur Bronchokonstriktion beiträgt.

PGE<sub>2</sub> führt über die Aktivierung des EP<sub>1</sub>-Rezeptors (G<sub>αq</sub>-gekoppelt, führt zur Aktivierung der Phospholipase C und Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung) zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur von Bronchien und des Gastrointestinaltrakts; über den EP<sub>2</sub>-Rezeptor (G<sub>αs</sub>-gekoppelt, führt zur Aktivierung der Adenylylcyclase (AC) und Erhöhung der cAMP-Konzentration) Gegenteil zu einer Relaxation der Muskulatur von Bronchien, des Gastrointestinaltrakts und Blutgefäßen und bewirkt damit eine Blutdrucksenkung. Bindet PGE<sub>2</sub> an den EP<sub>3</sub>-Rezeptor (G<sub>αi</sub>-gekoppelt, führt zu einer Verringerung der cAMP-Konzentration) so wird die Magensäuresekretion gehemmt und die Uteruskontraktion während der Geburt verstärkt. Ferner wird die Lipolyse und Neurotransmitterfreisetzung gehemmt. PGE<sub>2</sub> fördert über den EP<sub>4</sub>-Rezeptor (G<sub>αs</sub>-gekoppelt, führt zur Aktivierung der AC und Erhöhung der cAMP-Konzentration) die Schleimsekretion im Magen und hält den Ductus arteriosus Botalli offen<sup>38</sup>. PGE<sub>2</sub> ist darüber hinaus das in der Niere am meisten gebildete Prostanoid und bewirkt dort ebenfalls eine Gefäßerweiterung und Förderung der Durchblutung.

Bei der Schmerzvermittlung hat PGE<sub>2</sub> zwei Funktionen<sup>26</sup>:

- In der Peripherie sensibilisiert PGE<sub>2</sub> Nozizeptoren über eine Phosphorylierung von TRPV1-Ionenkanälen (engl. für *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*) und Natriumkanälen.
- Auf Rückenmarksebene hemmt PGE<sub>2</sub> glycinerge inhibitorische Interneurone und führt somit zu einer verstärkten Schmerzweiterleitung.

Die Expression der Prostanoid-Rezeptoren, Prostanoidsynthesen und der Cyclooxygenasen bilden ein organ- und zelltypspezifisches Muster, welches für die breite Funktionalität der Prostanoiden verantwortlich ist. Während man davon ausgeht, dass COX-1 konstitutiv exprimiert wird, ist die COX-2 in den meisten Geweben induzierbar. Zahlreiche proinflammatorische und pronozizeptive Mediatoren regen die Expression von COX-2 an und führen damit zu einer erhöhten Prostanoidkonzentration. Vor allem PGE<sub>2</sub> hat eine zentrale pathophysiologische Rolle bei der Vermittlung von Schmerzen<sup>39-40</sup>,

(chronischen) Entzündungserkrankungen<sup>41-44</sup>, Hyperalgesie und Fieber<sup>45</sup>. Daneben wurde ein erhöhter PGE<sub>2</sub>-Level in verschiedenen Tumorgeweben gemessen<sup>46</sup>. So führt PGE<sub>2</sub> in kolorektalen Tumoren über den Ras-Erk- und GSK3-β-catenin-Signalweg zu erhöhter Zellproliferation<sup>47-48</sup>, über den PI3K-Akt-PPARδ-, BCL-2- und NF-κB-Signalweg zu einer erhöhten Zellviabilität<sup>49-50</sup> und über den SRC-EGFR-PI3K-Akt-Signalweg zu verstärkter Migration und Invasivität<sup>51-52</sup>. Ein erhöhter PGE<sub>2</sub>-Level wurde auch in hepatozellulären Krebsformen<sup>53</sup>, in Bauchspeicheldrüsen<sup>54</sup>, Lungen- und Brustkrebs festgestellt<sup>55-56</sup>.

Nebenwirkungen heutiger tNSAIDs und Coxibe sind vor allem mit der physiologischen Rolle der Cyclooxygenasen und damit verbunden mit den fünf terminalen Prostanoiden verbunden. So treten vor allem dort Nebenwirkungen auf, wo die COX-1 konstitutiv expremiert ist und eine wichtige physiologische Rolle hat: in Magen, Niere und Herz. In der Haut, Lunge, Leber und im Gehirn wird sie auch expremiert, spielt aber eine tendenziell untergeordnete Rolle bei zentralen physiologischen Funktionen. Die Nebenwirkungen sind auf eine Reduktion der Prostanoiden in diesen Geweben zurückzuführen. Vor allem die Reduktion von PGE<sub>2</sub> im Magen und der Niere wird für die gastrointestinalen und renalen Nebenwirkungen verantwortlich gemacht, während die kardiovaskulären Effekte auf eine Beeinflussung von TXA<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> zurückzuführen sind, die unter anderem die Vasokonstriktion bzw. -dilatation regeln. Nebenwirkungen der Lunge sind zum einen auf eine Reduktion des PGD<sub>2</sub>-Levels zurückzuführen, welches dort eine bronchokonstriktive Funktion ausübt, zum anderen auf ein gleichzeitig erhöhtes Level an Leukotrienen.

## 1.5 Prostaglandin E-Synthasen

Die meisten Nicht-Opioid-Analgetika zielen darauf ab, das für die Schmerzvermittlung wichtige PGE<sub>2</sub> zu reduzieren. Die Wirkstoffe inhibieren dazu konzentrationsabhängig die Aktivität beider Cyclooxygenasen (tNSAIDs) oder nur die COX-2 (Coxibe). Damit fehlt den in der Kaskade nachfolgenden Enzymen das Substrat zur Generierung der terminalen Prostanoiden. Die

Umwandlung von  $\text{PGH}_2$  zu  $\text{PGE}_2$  wird von drei Prostaglandin E-Synthasen katalysiert: der zytosolischen Prostaglandin E-Synthase (cPGES<sup>57</sup>) und zwei mikrosomalen Prostaglandin E-Synthasen (mPGES-1<sup>58</sup> und mPGES-2<sup>59</sup>). Während die cPGES im Zytosol lokalisiert ist, akkumuliert die mPGES-1 hauptsächlich an der perinuklearen Membran und die mPGES-2 im Golgi<sup>60</sup>. Es konnte für die drei Prostaglandin-Synthasen eine unterschiedliche Kopplung an die Substrat-liefernden Cyclooxygenasen festgestellt werden. So bezieht die cPGES-1 das Substrat  $\text{PGH}_2$  hauptsächlich von der COX-1, die mPGES-1 von der COX-2 und die mPGES-2 von COX-1 und COX-2<sup>57, 61</sup>.

### 1.5.1 Prostaglandin E Synthase 1 (mPGES-1)

Die Prostaglandin E Synthase 1 (mPGES-1 bzw. PTGES) ist eine 16 kDa große homotrimere Isomerase. Strukturell zählt sie zur Familie der MAPEG-Enzyme (engl. *membrane associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism*) und benötigt für ihre katalytische Funktion den Kofaktor Glutathion. Gen-Transkripte wurden im Gehirn und der Lunge, nicht aber in Herz, Leber oder Darm von Nagetieren gefunden. Nach einer Behandlung mit dem proinflammatorischen Stimulanz Lipopolysaccharid (LPS) konnte in all diesen Geweben mRNA-Transkripte detektiert werden<sup>61</sup>. Eine konstitutive Expression der mPGES-1 auf Proteinebene wurde in Lunge, Milz, Niere und Magen von Mäusen festgestellt. Mittels *in situ*-Hybridisierungstechnik konnte die mPGES-1 außerdem im Gehirn von Ratten detektiert werden. Weiterhin konnte die mPGES-1 nicht in gesundem humanem Herzgewebe detektiert<sup>61</sup>, wohingegen sie nach einem Infarkt oder Diabetes deutlich detektierbar war<sup>62</sup>. Eine konstitutive Expression wurde außerdem in urogenitalem Gewebe<sup>63</sup>, der Magenschleimhaut, Milz, residenten peritonealen Makrophagen und Leber-Kupfferzellen<sup>64</sup> festgestellt. In diesen Geweben wird deshalb eine Kopplung der mPGES-1 mit einer physiologischen Funktion angenommen. Eine stark erhöhte Expression der mPGES-1 konnte nach Stimulation mit verschiedenen proinflammatorischen bzw. hormonellen Substanzen festgestellt werden. Eine Koinduktion von mPGES-1 und COX-2 durch LPS konnte erstmals in

Makrophagen beobachtet werden<sup>65</sup>, was die starke Kopplung dieser beiden Enzyme unterstützt. Neben LPS wurde eine Induktion der mPGES-1 auch mittels Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) erreicht<sup>58</sup>, während eine Behandlung mit dem Glucocorticoid Dexamethason den Effekt wiederum komplett aufheben konnte. Diese wichtige Beobachtung ergänzt somit auch die Erklärung der antinozizeptiven und antiinflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden über den Prostaglandinpfad.

Auf transkriptioneller Ebene konnten Deckmann et al. eine Beteiligung der des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, sowie der Histon-Deacetylase HDAC1 (engl. für *Histone deacetylase 1*) am EGR1-Promotor nachweisen, die einen maßgeblichen Einfluss auf die mPGES-1-Expression haben<sup>66-67</sup>.

Ein dreidimensionales Strukturmodell der mPGES-1 konnte erstmals von Jegerschold et al. 2008 publiziert werden, welches mittels Elektronenkristallographie aufgedeckt wurde<sup>68</sup>. Die Struktur enthält den Kofaktor Glutathion. Darüber hinaus wurde postuliert, dass das Enzym in einer geschlossenen Konformation kristallisiert wurde. Kürzlich wurde zudem eine weitere Kristallstruktur mit einer deutlich verbesserten Auflösung publiziert, die genauere Einblicke in die Struktur und Funktionalität der mPGES-1 zulässt<sup>69</sup>.

### **1.5.2 mPGES-1 als therapeutisches Ziel**

Alle zurzeit auf dem Markt befindlichen Analgetika, Antipyretika und Antiphlogistika zeigen mehr oder weniger ausgeprägte Nebenwirkungen (siehe Kapitel 1.3.6). Abhängig von der Wirkstoffgruppe (Opioide, tNSAIDs, Coxibe, Glucocorticoide, Psychopharmaka) ist zudem die Anwendung auf bestimmte Erkrankungen eingeschränkt. Die am häufigsten angewendeten Schmerzmedikamente der Nicht-Opioidklasse (tNSAIDs und Coxibe) zeigen eine hohe Inzidenz für gastrointestinale, renale und kardiovaskuläre Risiken. Insbesondere in der adjuvanten Begleittherapie bei (chronisch) inflammatorischen Erkrankungen zur Linderung der entzündungsbedingten Symptome (Schmerz, Überwärmung, Schwellung etc.) ist diese Gruppe an Medikamenten nur sehr schwer substituierbar. Alternative Medikamente können

zudem ebenfalls in der Langzeitanwendung zu erheblichen Nebenwirkungen führen (siehe Glucocorticoide bzw. Opioiden).

Es besteht somit ein hoher Bedarf an neuartigen Therapeutika mit einem sichereren Anwendungsprofil. Zahlreiche neue chemische Substanzen (insbesondere Coxibe) konnten zwar das Risiko für gastrointestinale Risiken senken, zeigen aber vergleichbare Nebenwirkungen in anderen Bereichen. Gerade für multimorbide Patienten und solche mit einer bereits bestehenden oder vorangegangenen Herz-Kreislauf-Erkrankung gibt es in diesen Substanzklassen keine ausreichend sicheren Medikamente. Das Problem besteht weniger in der Substanzvielfalt als dem gemeinsamen therapeutischen Zielmolekül (COX-1/2).

Die mPGES-1 stellt hier ein alternatives Zielmolekül dar. Die mPGES-1 befindet sich in derselben Kaskade wie die Cyclooxygenasen und wurde als eines von drei hauptverantwortlichen Enzymen bei der Generierung von PGE<sub>2</sub> ermittelt. Zahlreiche Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen der Funktion von tNSAIDs/Coxiben und den biologischen Auswirkungen auf die Prostanoiden wurden in den letzten Jahren durchgeführt. Zwei Hauptprobleme wurden dabei festgestellt:

1. Die Hemmung der Cyclooxygenasen reduziert das Level aller Prostanoiden und blockiert damit sowohl erwünschte physiologische als auch pathophysiologische Funktionen dieser Fettsäuren.
2. Die systemische unspezifische aber auch die spezifische Hemmung einer oder beider Cyclooxygenasen führt abseits des gewünschten Zielgewebes zu Nebenwirkungen.

Das erste Problem kann vermutlich mit einem Wechsel zu mPGES-1-Wirkstoffen gelöst, zumindest aber verändert werden. Selektive mPGES-1-Inhibitoren reduzieren nur den PGE<sub>2</sub>-Level. Untersuchungen an mPGES-1-Knockout-Tieren bestätigten eine günstige analgetische Wirkung durch das Ausschalten dieses Zielmoleküls, deuten aber auch auf ein mögliches neues Problem – dem so genannten Prostanoid-Shunting - hin. Durch das Ausschalten der mPGES-1 könnte es zu einem Überschuss an PGH<sub>2</sub> kommen,

welches dann in einem erhöhten Level der anderen Prostanoiden münden könnte<sup>70</sup>.

mPGES-1-Inhibitoren beeinflussen vor allem die induzierbare Form der PGE<sub>2</sub>-Synthasen. Das Enzym ist insbesondere in inflammatorischen Erkrankungen und Tumoren stark exprimiert, was die pathophysiologische Rolle unterstreicht. Zahlreiche physiologische Funktionen werden über die beiden anderen (konstitutiv exprimierten) Prostaglandin E-Synthasen gesteuert, daher wird davon ausgegangen, dass spezifische mPGES-1 Inhibitoren ein günstigeres Nebenwirkungsprofil aufweisen<sup>71-72</sup>.

### 1.5.3 mPGES-1-Inhibitoren

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Substanzen mit einer inhibitorischen Funktion auf die mPGES-1 bekannt. Dazu zählen die beiden hochpotenten Wirkstoffgruppen der Phenanthrenimidazole<sup>73</sup> und Indole<sup>74</sup>. Für beide Wirkstoffgruppen wurden allerdings nur wenige biologische Parameter veröffentlicht. Auch bei den in der Zwischenzeit zahlreich erschienenen neueren Wirkstoffen (siehe z. B. Chang et al.<sup>75</sup>) werden hauptsächlich *in vitro*-Aktivitätsdaten publiziert. Mittlerweile wurden einige Patente für mPGES-1-Inhibitoren angemeldet. Deren Wirksamkeit am Menschen bleibt bislang noch offen. Mit Spannung werden erste Ergebnisse von mPGES-1-Inhibitoren in humanen Studien erwartet (z. B. von PF-4693627<sup>76</sup>). Der zukünftige Erfolg von mPGES-1-Inhibitoren ist sehr stark mit dem Nebenwirkungsprofil verbunden. Die Entwicklung strukturell neuer Wirkstoffe bietet die Grundlage für weitergehende Untersuchungen zur Rolle der mPGES-1 in physiologischen und pathophysiologischen Funktionen. In den letzten Jahren hat sich außerdem gezeigt, dass viele bekannte Wirkstoffe neben ihrem eigentlichen Zielmolekül auch noch weitere Moleküle beeinflussen. Diese so genannten Off-Target-Effekte können sowohl synergistische Wirkung haben, aber auch für Nebenwirkungen verantwortlich sein. Für die Wirkstoffentwicklung entsteht hier ein ganz neues Anwendungsfeld: Wirkstoffe, die gezielt mehrere synergistische



Zielmoleküle beeinflussen (engl. *Multitarget-Drugs*) könnten zu einer verstärkten Wirkung bei gleichzeitig reduzierter Belastung führen.

Für die Schmerzhemmung, Entzündungshemmung und Krebstherapie wurden unter anderem Dualinhibitoren vorgeschlagen, die neben der mPGES-1 auch die 5-Lipoxygenase (5-LOX) hemmen<sup>77-81</sup>, sowie COX/5-LOX-Inhibitoren<sup>82</sup> und weitere Kombinationen<sup>83-84</sup>.

#### **1.5.4 *In silico*-Screening nach mPGES-1-Inhibitoren**

Die Wirkstoffsuche (engl. *Drug Screening*) ist einer der ersten und entscheidenden Schritte bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe und Medikamente. Hier wird aus einer mehr oder weniger großen Auswahl an Substanzen eine wesentlich kleinere Gruppe ausgewählt, die dann in späteren Schritten optimiert werden. Die Methodik, welche darüber entscheidet, ob eine Substanz in die engere Auswahl aufgenommen wird hat somit maßgeblichen Einfluss auf den späteren Erfolg. Beim bekannten Hochdurchsatzscreening (engl. *High Throughput Screening, HTS*) wird eine sehr große Anzahl an Substanzen in einem stark vereinfachten Modellversuch (Assay) getestet. Die Auswahl des Modells und die Diversität der eingesetzten Substanzbank limitiert das Ergebnis. So können „nur“ Strukturklassen gefunden werden, die in der Substanzbank vorhanden sind. Ein Vorteil dieser Methodik sind direkte, experimentell gewonnene Ergebnisse, die bei großen Substanzbanken und einem guten Assay bereits hochpotente Treffer (engl. *Hits*) liefern können. Nachteilig sind die extrem hohen Kosten für Material, Instrumente und Personal, sowie teilweise eingeschränkte Aussagekraft<sup>85-86</sup>. Letzteres vor allem deshalb, weil die Screening-Assays stark auf Geschwindigkeit optimiert werden müssen, um in vergleichsweise kurzer Zeit eine Große Anzahl Tests durchführen zu können. Dadurch wird in der Regel der Umfang der zu bestimmenden Zielwerte und die Komplexität des Assays eingeschränkt (z. B. Versuche mit bakteriell angereichertem Enzym statt Versuche mit intakten Zellen).

Das virtuelle (computergestützte) Screening bietet einen alternativen Ansatz. Substanzbanken liegen in digitaler Form vor oder werden im Zuge der eingesetzten Methodik generiert. Die „Filtermethode“ ist ein computergestütztes Verfahren, welches ebenfalls eine kleine Gruppe an potentiell aktiven Substanzen zum Ziel hat. Genauso wie beim HTS-Screening entscheiden auch hier der Umfang und die Diversität der Substanzdatenbank und die eingesetzte Methode über das Ergebnis. Die Substanzdatenbank kann allerdings deutlich größer sein, während des Verfahrens vergrößert (*de novo*-Screeningmethoden) oder verkleinert werden und Moleküle enthalten, die auf Grund ihrer Komplexität in Substanzbanken kaum vorkommen. Vorteile des virtuellen Screenings sind niedrigere Kosten, eine größere Strukturdiversität (je nach Datenbank!) und die Möglichkeit vorhandenes Wissen in die Auswahlmethodik einbauen zu können. Schwierig kann unter Umständen die Auswahl der Substanzdatenbank werden (teure Lizenzen, evtl. keine Informationen über Patente und Syntheserouten). Die Auswahl der geeigneten Methode entscheidet maßgeblich über das Ergebnis. Wird beispielsweise eine schlecht aufgelöste Kristallstruktur eines Rezeptors für ein rezeptorbasiertes Screening verwendet, kann es sein, dass sich bei späteren Tests im Labor herausstellt, dass keines der ausgewählten Moleküle überhaupt aktiv ist.

Eine Kombination aus HTS und *in silico*-Screening bietet schließlich die Möglichkeit die Vorteile beider Ansätze zu verbinden, um zuverlässigere Ergebnisse zu generieren. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Studien zu *in silico*-Screenings nach mPGES-1-Inhibitoren bekannt, weshalb erstmals computergestützte Verfahren für dieses Zielmolekül getestet wurden (siehe Kapitel 1.6). In der Zwischenzeit konnten parallel zu dieser Arbeit weitere Gruppen *in silico*-Methoden erfolgreich für das Screening nach mPGES-1-Inhibitoren anwenden<sup>87-91</sup>.

## 1.6 Vorarbeiten

Während der vorangegangenen Diplomarbeit<sup>92</sup> wurden computergestützte Methoden eingesetzt, um nach strukturell neuartigen mPGES-1-Inhibitoren zu

suchen. Dazu wurden ligandenbasierte Methoden auf mehrere Datenbanken mit insgesamt über 1.000.000 Molekülen angewendet. Da zu diesem Zeitpunkt nur wenige strukturelle Informationen über die mPGES-1 bekannt waren - allerdings bereits erste potente Inhibitoren publiziert waren - wurden zwei ligandenbasierte Screeningmethoden ausgewählt: Ein Pharmacophormodell und eine Kombination aus selbstorganisierenden Karten<sup>93</sup> (engl. *Self-organizing maps, SOMs*) und SQUIRREL<sup>94</sup> (Sophisticated Quantification of InteRaction Relationship). Dazu wurden die potentesten veröffentlichten mPGES-1-Inhibitoren (Phenanthrenimidazole und Indole) als Grundlage eingesetzt. In einem darauffolgenden *in vitro*-Screening konnte die Eignung dieses Ansatzes bestätigt werden – zahlreiche der getesteten Moleküle zeigten eine Hemmung der enzymatischen Aktivität der mPGES-1.

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Für diese Arbeit wurden aus den Ergebnissen der Diplomarbeit zwei Substanzen (FR4 und FR20) für intensive Struktur-Aktivitäts-Beziehungsanalysen ausgewählt. Beide Substanzen hemmen die enzymatische Aktivität der mPGES-1 und sind strukturell stark unterschiedlich in Bezug auf ihr Grundgerüst (Benzensulfonamid und Quinazolinon), ihre Azidität (sauer und neutral), Größe, Synthese usw. Ziel dieser Arbeit war der Aufbau von zwei Substanzbanken um diese Leitstrukturen und eine umfangreiche Charakterisierung dieser Klassen in Bezug auf enzymatische und zelluläre Aktivität, Toxizität und Einfluss auf die Arachidonsäurekaskade. Weiterhin sollte ermittelt werden, ob es Unterschiede in der Hemmung der mPGES-1 aus verschiedenen Spezies (Mensch, Maus) gibt.

Optional sollte in Abhängigkeit der Aktivität in komplexen Modellversuchen und der Toxizität eine Formulierung und anschließende *in vivo*-Evaluierung pharmakologischer Parameter und Studien zur Wirksamkeit in mPGES-1-relevanten pathophysiologischen *in vivo*-Modellen erfolgen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
5S-Hydroxyeicosatetraensäure	Cayman Chemical, Michigan, USA
5S-Hydroxyeicosatetraensäure- $d_8$	Cayman Chemical, Michigan, USA
6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$	Cayman Chemical, Michigan, USA
6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}-d_4$	Cayman Chemical, Michigan, USA
$\pm 8$ -Hydroxyeicosatetraensäure	Cayman Chemical, Michigan, USA
$\pm 11$ -Hydroxyeicosatetraensäure	Cayman Chemical, Michigan, USA
12S-Hydroxyeicosatetraensäure	Cayman Chemical, Michigan, USA
12S-Hydroxyeicosatetraensäure- $d_8$	Cayman Chemical, Michigan, USA
15S-Hydroxyeicosatetraensäure	Cayman Chemical, Michigan, USA
15S-Hydroxyeicosatetraensäure- $d_8$	Cayman Chemical, Michigan, USA
20-Hydroxyeicosatetraensäure	Cayman Chemical, Michigan, USA
20-Hydroxyeicosatetraensäure- $d_6$	Cayman Chemical, Michigan, USA
Acetonitril super gradient grade	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Acetonitril ROTISOLV $\geq 99,95$ % LC-MS Grade	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure zur Analyse 89-91%	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxidsulfat APS	Roth, Karlsruhe
Bradford (Proteinreagenz.Bradford)	Sigma-Aldrich, Seelze
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
BSA Albumin Fraktion V fettfrei	Sigma-Aldrich, Seelze
Complete, Mini, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat ( $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ )	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Fisher Scientific, Loughborough, UK
DTT	AppliChem, Darmstadt

Produkt	Hersteller
EDTA	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat (FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethylacetat	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin wasserfrei (Gycerol)	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O CHROMASOLV Plus for HPLC	Sigma-Aldrich, Seelze
H <sub>2</sub> O ROTISOLV LC-MS Grade	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	KMF Laborchemie, Lohmar
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	AppliChem, Darmstadt
L-Glutathion, reduced SigmaUltra 98-100%	Sigma-Aldrich, Seelze
Leukotrien B <sub>4</sub>	Cayman Chemical, Michigan, USA
Leukotrien B <sub>4</sub> - d <sub>4</sub>	Cayman Chemical, Michigan, USA
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Miglyol (mittelkettige Triglyceride)	Fagron, Barsbüttel
n-Hexan zur Analyse	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel de Haen, Seelze
Natriumhydrogenphos.-di 2H <sub>2</sub> O pA (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Odysse Blocking Buffer	Li-COR, Bad Homburg
PBS ohne Ca/Mg	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pen-Strep, Gibco	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Precision Plus Protein Standard	BioRad, München
Propanol-2 p.a.	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Prostaglandin D <sub>2</sub>	Cayman Chemical, Michigan, USA

Produkt	Hersteller
Prostaglandin D <sub>2</sub> -d <sub>4</sub>	Cayman Chemical, Michigan, USA
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Cayman Chemical, Michigan, USA
Prostaglandin E <sub>2</sub> -d <sub>4</sub>	Cayman Chemical, Michigan, USA
Prostaglandin F <sub>2α</sub>	Cayman Chemical, Michigan, USA
Prostaglandin F <sub>2α</sub> -d <sub>4</sub>	Cayman Chemical, Michigan, USA
Prostaglandin H <sub>2</sub>	Larodan, Malmö, Schweden
ProteinMarker SeeBlue Plus2 pre-stained	Invitrogen, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 + L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCL)	AppliChem, Darmstadt
SDS (Dodecylsulfate NA )	Serva, Heidelberg
Temed pA	Roth, Karlsruhe
TRIS base	Sigma-Aldrich, Seelze
Thromboxan B <sub>2</sub>	Cayman Chemical, Michigan, USA
Thromboxan B <sub>2</sub> -d <sub>4</sub>	
Trypanblau Lsg. 0,4 %	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
WST-1 Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Zitronensäure-Monohydrat, Riedel de Haen	Sigma-Aldrich, Seelze

## 2.2 Zellmedien

### Medium für HeLa-Zellen

Grundmedium: RPMI 1640 1x + L-Glutamin + Hepes (25 mM)

Zusätze: 1 % Penicillin / Streptomycin

10 % FCS

### **Medium für RAW-Zellen**

Grundmedium: RPMI 1640 1x + GlutaMAX  
Zusätze: 100 Einheiten/mL Penicillin G und 100 µg/mL Streptomycin  
10 % FCS

### **Medium für NIH-Zellen**

Grundmedium: Dulbecco's MEM mit 4.5 g/L Glukose + Pyruvat  
Zusätze: 100 Einheiten/mL Penicillin G und 100 µg/mL Streptomycin  
10 % FCS

### **Einfriermedium**

RPMI + 10 % FCS + 5 % DMSO  
oder 90 % FCS + 10 % DMSO

## **2.3 Puffer und Lösungen**

### **0,2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (200 ml)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,444 g
H <sub>2</sub> O	194,556 ml

### **0,2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (500 ml)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	22,823 g
H <sub>2</sub> O	477,177 ml

### **KPI-Puffer 0,1 M, pH 7,4 (KPI)**

0,2 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19 ml
0,2 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	81 ml
H <sub>2</sub> O	ad 200 ml

mit 30 % HCL auf pH 7,4 einstellen

### **KPI-Puffer mit GSH und Proteasehemmer (KPI<sup>+</sup>)**

0,1 M, pH 7,4 KPI-Puffer 10 ml

Zusätze:

1 Tablette Complete™ (Mini, EDTA-free, Roche)

2,5 mM GSH (entspricht 100 µl 250 mM Stocklösung)

### **250 mM Glutathion (GSH), reduziert**

M = 307,33 g/mol

Glutathion 0,15366 g

H<sub>2</sub>O 2 ml

Zu je 100 µl aliquotieren

Lagerung: -20°C

### **100 mM Glutathion (GSH), reduziert**

M = 307,33 g/mol

Glutathion 61,47 mg

H<sub>2</sub>O 2 ml

Zu je 100 µl aliquotieren

Lagerung: -20°C

### **Homogenisierungs-Medium (HM)**

0,1 M Kpi-Puffer, pH 7,4 10 ml

0,25 M Sucrose 0,855 g

1 Tablette Complete™ (Mini, EDTA-free, Roche)

1 mM GSH (entspricht 100 µl 100 mM Stocklösung)

### **0,1 M FeCl<sub>2</sub>-Lösung**

FeCl<sub>2</sub> (198,81 g/mol) 0,99405 g

H<sub>2</sub>O ad 50 ml



### **2M Zitronensäure-Lösung**

Zitronensäure-Monohydrat (210,14 g/mol)	21,014 g
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml

### **Stop-Lösung**

0,1 M FeCl <sub>2</sub>	20 ml
2 M Zitronensäure-Lösung	2 ml
H <sub>2</sub> O	28 ml

### **PGH<sub>2</sub>-Lösung**

M = 352,5 g/mol

Stocklösung: 1 mg / 0,5 ml (entspricht 5,67 mM)

PGH<sub>2</sub>-Stocklösung 7,1 µl + 1 ml KPI+-Puffer

### **WB-Laufpuffer (10x SDS Laufpuffer)**

TRIS(base)	30 g
Glycin	150 g
SDS	10 g
Aqua dest	ad 1000 ml

### **WB-Blockingpuffer (BB)**

Milchpulver (5%)	1,25 g
in PBS	25 ml

Alternativ

50 % PBS: 50 % Odyssee Blocking-Puffer

### **Lämmli-Puffer (4x)**

0,2 M TRIS	0,24 g (Trizma base)
10 % SDS	1 g
0,004 % Bromphenolblau	400 µl
40 % Glycerol	4 ml
H <sub>2</sub> O	Ad 10 ml

+ DTT(1 M) frisch zugeben

Mit HCl (37%) auf pH 6,8 einstellen

### **TRIS- Puffer**

0,5 M	pH 6,8	60,57 g/l
1 M	pH 7,5	121,14 g/l
1,5 M	pH 8,8	181,71 g/l

TRIS (hydroxymethyl)-Aminomethan verwenden

pH Einstellung mit HCl (37 %)

### **10x PBS-Puffer**

NaCl	100 g
KCl	2,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	17,7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g

ad 1000 ml Aqua dest.

### **10x TBS-Puffer**

1 M Tris Base	121,14 g/l
1,5 M NaCl	60 g/l

ad 1000 ml Aqua dest.

mit HCl auf pH 7,5 einstellen.

## **2.4 Chemische Methoden**

### **2.4.1 Synthese von FR4-Derivaten**

Die Herstellung und Qualitätsüberprüfung aller Substanzen der FR4-Klasse erfolgte durch Theresa Thieme und Thomas Hanke unter der Anleitung und Betreuung von Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz. Alle Substanzen weisen eine Reinheit von mindestens 95% auf.

### **2.4.2 Synthese von FR20-Derivaten**

Drei Derivate der FR20-Serie (FR20-Dev21, FR20,Dev23, FR20-Dev24) wurden in der Arbeitsgruppe von Jun.-Prof. Dr. Ewgenij Proschak in Zusammenarbeit mit Estel.la Buscató synthetisiert. Prinzipiell ist die im Folgenden angeführte Methode aber nicht auf die Synthese dieser drei Substanzen beschränkt.

#### **2.4.2.1 Synthese von 3-(3-Chlorbenzyl)-6-iod-2-propylquinazolin-4(3H)-on**

In ein Mikrowellengefäß mit konischem Ende wurde eine Lösung aus 5-Iodanthranilsäure (0.5 g, 1.901 mmol, 1 Equiv.), Buttersäure (0.167 g, 1.901 mmol, 1 Equiv.) und Triphenylphosphit (0.639 g, 2.091 mmol, 1.1 Equiv.) in 2 mL wasserfreiem Pyridin gegeben. Das Mikrowellengefäß wurde verschlossen und für 10 min bei 150°C bestrahlt. Nach dem Abkühlen wurde 3-Chlorbenzylamin (0.269 g, 1.901 mmol, 1 Equiv.) hinzugegeben und erneut für 5 min bei 230°C bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat rückgelöst, mit NaHCO<sub>3</sub> (2 × 10 mL) und 10% HCl (2 × 10 mL) gewaschen und anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde mit Unterdruck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie über Kieselsäuregel mit Hexan-Ethylacetat (50:50, v/v) aufgereinigt. 100 mg (12% Ausbeute) eines cremefarbenen Feststoffs konnten damit hergestellt werden.

<sup>1</sup>H-NMR (MeOD): δ 8.60 (br, 1H), 8.19 (dd, J = 3.4, 8.6 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.33 (m, 3H), 5.46 (s, 2H), 2.87 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 1.73 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 1.00 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

MS (ESI, 70 eV) m/z (%): 439.2 (100%).

#### **2.4.2.2 Synthese von 2-Chlor-N-(3-(3-chlorbenzyl)-4-oxo-2-propyl-3,4-dihydroquinazolin-6-yl)-6-fluorbenzamide (FR20-Dev21)**

In einen Rundkolben wurde Kupferiodid (1 mg, 0.005 mmol, 0.01 Equiv.), 2-Chlor-6-fluorbenzamid (0.114 g, 0.657 mmol, 1.2 Equiv.) und K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.232 g, 1.094 mmol, 2 Equiv.) gefüllt, welcher anschließend entlüftet und daraufhin mit Argon befüllt wurde. N,N'-Dimethylethylendiamin (4 mg, 0.055 mmol, 0.1 Equiv.), 3-(3-Chlorbenzyl)-6-iod-2-propylquinazolin-4(3H)-on (0.240 g, 0.547 mmol, 1 Equiv.) und Tetrahydrofuran (10 mL) wurden unter Argonstrom hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 110 °C für 23 h gerührt. Die resultierende hellbraune Suspension wurde abgekühlt und durch ein 1 cm Pad aus Kieselsäuregel mit 20 mL Ethylacetat gefiltert. Das Filtrat wurde aufkonzentriert und der Rückstand mittels Säulenchromatographie über Kieselsäuregel mit Hexan-Ethylacetat (50:50 v/v) aufgereinigt. 189 mg (71 % Ausbeute) eines cremefarbenen Feststoffs konnten damit hergestellt werden.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.19 (br, 1H), 8.68 (d, J = 2.4, 1H), 8.05 (dd, J = 2.4, 8.8 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.79–7.43 (m, 6H), 7.17 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 2.76 (t, J = 14.8 Hz, 2H), 1.77 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 0.96 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 163.5, 161.7, 160.5, 156.8, 156.1, 143.9, 139.7, 136.6, 133.7, 132.0, 130.9, 127.9, 126.6, 125.8, 124.9, 120.3, 115.7, 114.8, 45.2, 35.8, 19.8, 13.6.

MS (ESI, 70 eV) m/z (%): 484.5 (100%).

Anal. Kalk. für  $C_{25}H_{20}Cl_2FN_3O_2$ : C, 61.99, H, 4.16, N, 8.68. Gefunden: C, 61.95, H, 4.12, N, 8.64.

### 2.4.2.3 Synthese von 2,6-Dichlor-N-(3-(3-chlorbenzyl)-4-oxo-2-propyl-3,4-dihydroquinazolin-6-yl)benzamide (FR20-Dev23)

In einen Rundkolben wurde Kupferiodid (3 mg, 0.015 mmol, 0.05 Equiv.), 2,6-Dichlorbenzamid (0.09 g, 0.478 mmol, 1.5 Equiv.) und  $K_3PO_4$  (0.132 g, 0.638 mmol, 2 Equiv.) gefüllt, welcher anschließend entlüftet und daraufhin mit Argon befüllt wurde. N,N'-Dimethylethylendiamin (3 mg, 0.031 mmol, 0.1 Equiv), 3-(3-Chlorbenzyl)-6-iod-2-propylquinazolin-4(3H)-on (0.140 g, 0.319 mmol, 1 Equiv.) und Tetrahydrofuran (10 mL) wurden unter Argonstrom hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 110 °C für 23 h gerührt. Die resultierende hellbraune Suspension wurde abgekühlt und durch ein 1 cm Pad aus Kieselsäuregel mit 20 mL Ethylacetat gefiltert. Das Filtrat wurde aufkonzentriert und der Rückstand mit EtOH/Wasser umkristallisiert. 80 mg (50% Ausbeute) eines weißen Feststoffs konnten damit hergestellt werden.

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.18 (br, 1H), 8.70 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 8.05 (dd, J = 3.3, 9.2 Hz, 1H), 7.76–7.21 (m, 7H), 7.15 (m, 1H), 5.48 (s, 2H), 2.77 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 1.78 (q, J = 9.6 Hz, 2H), 0.95 (t, J = 8.2 Hz, 3H).

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 162.3, 161.3, 155.9, 143.5, 142.6, 139.4, 136.9, 136.0, 133.6, 131.9, 131.1, 128.2, 126.4, 125.3, 119.9, 115.4, 45.4, 35.7, 19.6, 13.3.

MS (ESI, 70 eV) m/z (%): 500.3 (100%).

Anal. Kalk. für  $C_{25}H_{20}Cl_3N_3O_2$ : C, 59.96, H, 4.03, N, 8.39. Gefunden: C, 60.19, H, 4.21, N, 8.36.

#### 2.4.2.4 Synthese von N-(3-(3-Chlorobenzyl)-4-oxo-2-propyl-3,4-dihydroquinazolin-6-yl)-2-methylbenzamide (FR20-Dev24)

In einen Rundkolben wurde Kupferiodid (43 mg, 0.228 mmol, 0.2 Equiv.), 2-Methylbenzamide (0.185 g, 1.368 mmol, 1.2 Equiv.) und  $K_3PO_4$  (0.484 g, 2.280 mmol, 2 Equiv.) gefüllt, welcher anschließend entlüftet und daraufhin mit Argon befüllt wurde. N,N'-Dimethylethylendiamin (40 mg, 0.456 mmol, 0.4 Equiv.), 3-(3-Chlorobenzyl)-6-iod-2-propylquinazolin-4(3H)-on (0.5 g, 1.140 mmol, 1 Equiv.) und Tetrahydrofuran (10 mL) wurden unter Argonstrom hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 110 °C für 23 h gerührt. Die resultierende hellbraune Suspension wurde abgekühlt und durch ein 1 cm Pad aus Kieselsäuregel mit 20 mL Ethylacetat gefiltert. Das Filtrat wurde aufkonzentriert und der Rückstand mittels Flashchromatography über Kieselsäuregel mit Hexan-Ethylacetat (0 → 80% Ethylacetat, 4 %/min) aufgereinigt. 179 mg (35 % Ausbeute) eines cremefarbenen Feststoffs konnten damit hergestellt werden.

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.69 (br, 1H), 8.74 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.13 (dd,  $J = 2.3, 8.8$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.56 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 7.49–7.33 (m, 6H), 7.07 (m, 1H), 5.45 (s, 2H), 2.76 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 1.76 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 0.96 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  168.2, 161.4, 155.8, 143.0, 139.4, 136.9, 135.6, 133.4, 130.7, 129.9, 129.1, 126.9, 125.8, 124.7, 120.3, 115.6, 45.3, 36.0, 19.4, 19.1, 13.6.

MS (ESI, 70 eV)  $m/z$  (%): 446.5 (100%).

Anal. Kalk. für  $C_{26}H_{24}ClN_3O_2$ : C, 70.03, H, 5.42, N, 9.42. Gefunden: C, 69.94, H, 5.33, N, 9.21.

## **2.5 Biologische Methoden**

### **2.5.1 Zellbasierte Methoden**

#### **2.5.1.1 Verwendete eukaryontische Zelllinien**

Für die zellbiologischen Versuche wurden drei verschiedene eukaryotische Zelllinien verwendet: HeLa, RAW und NIH. HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) und wurden für die Anreicherung von humanem mPGES-1-Enzym, für toxikologische Untersuchungen und die Bestimmung der Aktivität von Wirkstoffen auf zellulärer Ebene eingesetzt. Die murinen Zelllinien RAW 264.7 (Makrophagen) und NIH-3T3 (Fibroblasten) wurden für die Anreicherung von muriner mPGES-1 verwendet. HeLa und RAW entstammen der Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany). RAW 264.7-Zellen wurden über die American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) bezogen.

Folgende Zellkulturmedien wurden verwendet:

- HeLa: RPMI-Medium 1640 mit hohem Glukosegehalt, L-Glutamin und 25 mM HEPES
- RAW: RPMI-Medium 1640 mit hohem Glukosegehalt und GlutaMAX.
- NIH: Dulbecco's MEM-Medium mit 4.5 g/L Glukose und Pyruvat

Alle Medien wurden mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 100 Einheiten/mL Penicillin G und 100 µg/mL Streptomycin (Invitrogen, Darmstadt) versetzt.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank (Hera safe, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Alle Kulturflaschen, -platten und Verbrauchsmaterial waren steril verpackt oder wurden vor der Benutzung steril autoklaviert.

Die Zellen wurden in einem Heraeus Hera Cell Inkubator 240 (Heraeus, Hanau) bei 37 °C, einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

### **2.5.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die verwendeten Zellen können für längere Zeit in flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden, ohne dass sie dadurch ihre Vitalität verlieren. Dazu lässt man HeLa-, RAW-, oder NIH-Zellen in einer Kulturflasche (Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen) bis zu einer Zelldichte von etwa 75 % heranwachsen. Daraufhin wurde das Medium abgesaut und Zellen mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Die adhären Zellen wurden dann mit Trypsin-Lösung vom Boden der Flasche abgelöst. Um die zellschädigende Wirkung des Trypsins zu verringern wurden die Zellen nun in frischem Medium aufgenommen und in ein 15 mL Reaktionsgefäß (Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen) überführt. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension bei 1.100 rpm für 4 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Nach dem Abnehmen des Mediums wurde das Zellpellet nun, in einer der Zellzahl entsprechenden Menge Einfriermedium resuspendiert und in Kryo-Röhrchen aliquoriert. Das anschließende Einfrieren geschah in sukzessiven Schritten, beginnend bei 10 Min. auf Eis über 24 Stunden bei -80 °C und letztendlich der Endlagerung im Stickstofftank.

Um die tiefgefrorenen Zellen aufzutauen, wurde ein Kryo-Röhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und kurz im 37 °C warmen Wasserbad (Julabo SW 22, JULABO Labortechnik GmbH Seelbach) angetaut. Die Zellsuspension wurde nun in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und mit frischem 37 °C warmem Medium verdünnt. Die Suspension wurde anschließend bei 1.100 rpm circa 3 Minuten lang zentrifugiert und das Medium abgenommen, um das Einfriermedium komplett von den Zellen zu entfernen. Nach dem erneuten resuspendieren in Kulturmedium wurden die Zellen für eine Anzucht in Flaschen oder Platten ausgesät.

### **2.5.1.3 Passagieren von eukaryontischen Zellen**

HeLa-, RAW- und NIH-Zellen geraten in eine Stresssituation, wenn sie zu wenig Raum zum Wachsen haben. Deshalb müssen sie vor Erreichen der Konfluenz ausgedünnt werden. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit



Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wurde frisches Medium hinzugegeben und die Zellen in ein 15 oder 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Zellen zentrifugiert, das Trypsin/Medium-Gemisch abgesaugt und frisches Kulturmedium hinzugegeben. Nach dem Auszählen der Zellen wurde eine entsprechende Menge Zellen auf neuen Kulturflaschen oder -schalen ausgesät. Medium und Trypsin wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

#### **2.5.1.4 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl in einer Zellsuspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss AG, Oberkochen) bestimmt. Dazu wurden 20 µL Suspension mit 20 µL Trypanblau-Lösung (0,18 %) gemischt und auf eine Zählkammer gegeben. Trypanblau bindet an intrazelluläre Proteine toter Zellen. Lebende Zellen nehmen Trypanblau nicht auf und können somit gut von toten Zellen unterschieden werden.

Es wurden die lebenden Zellen in 2 Großquadraten a 16 Kleinquadraten ausgezählt und mit dem Kammerfaktor  $10^4$  multipliziert. Alternativ wurden 4 Großquadrate gezählt und die Summe durch 2 geteilt. Mit eingerechnet ist bei dieser Zählmethode bereits die Verdünnung mit Trypanblau.

Zellzahl / mL = Anzahl gezählter Zellen [2 Großquadrate] \*  $10^4$

Zellzahl / mL = Anzahl gezählter Zellen [4 Großquadrate] / 2 \*  $10^4$

#### **2.5.1.5 Bestimmung der Zellviabilität (WST-Assay)**

Zur Bestimmung der Zellviabilität von humanen HeLa-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Testsubstanzen wurde das wasserlösliche Tetrazoliumsalz (WST-1, Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Der Test prüft die Funktionsfähigkeit der Atmungskette<sup>160</sup>. Er lässt sich gut in Mikrotiterplatten durchführen und ist damit - wie auch der mPGES-1-Assay - gut parallelisierbar. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit dasselbe Zellsystem verwenden zu können, das auch zur Amplifizierung des mPGES-1-Enzyms und für die spätere Bestimmung der zellbasierten PGE<sub>2</sub>-Hemmung eingesetzt wurde. Weitere

Vorteile sind die günstigen Materialkosten, einfache Durchführung und kurze Durchlaufzeiten. Methodisch bedingt lassen sich allerdings nur bedingt Aussagen über die anderen zellschädigenden Kategorien treffen. Die Zellproliferation könnte beispielsweise auch dann eingeschränkt sein, wenn die Testsubstanzen nicht die Atmungskette beeinflussen. Umgekehrt schränkt eine defekte Atmungskette so ziemlich jede Zellaktion ein, da nur noch bedingt Energie zur Verfügung gestellt werden kann.

Es wurden  $3 \times 10^3$  HeLa-Zellen in 100  $\mu\text{L}$  Nährmedium je Ansatz in einer 96-Lochplatte für 24 h bei 37 °C kultiviert. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit frischem Medium stimuliert, welches IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) + TNF $\alpha$  (5 ng/mL) enthielt. Simultan wurden dem Medium verschiedene Konzentration der Testsubstanzen (1, 10 oder 100  $\mu\text{M}$ ) bzw. das Vehikel (DMSO) zugesetzt. Nach 24 h wurden 10  $\mu\text{L}$  des WST-1-Reagenz je Ansatz zum Medium gegeben und für weitere 90 min bei 37 °C inkubiert. Der Farbumschlag wurde bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm in einem 96-Loch-Spektrophotometer gemessen (SpectraFluor Plus, Tecan, Crailsheim, Germany).

#### **2.5.1.6 Bestimmung der Hemmung der zellulären Prostanoid-Biosynthese**

Ziel des Versuchs ist die Abschätzung des antagonistischen bzw. agonistischen Potentials von Testsubstanzen auf die zelluläre Synthese terminaler Prostanoiden, insbesondere PGE<sub>2</sub>.

Dazu wurden  $2 \times 10^4$  HeLa-Zellen in 24-Lochplatten für 24 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, welches 1 ng/mL IL-1 $\beta$  und 5 ng/mL TNF $\alpha$  enthielt, um die entzündungsabhängige Produktion von PGE<sub>2</sub> zu stimulieren. In einem Kontrollansatz wurde dem Medium statt dessen PBS zugesetzt. Zusätzlich wurden dem Medium die Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen (1, 10 oder 100  $\mu\text{M}$ ) bzw. das Vehikel (DMSO) zugesetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden 400 -

500 µL Medium abgenommen und bei -80 °C bis zur Extraktion der Prostanoiden gelagert.

## **2.5.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.5.2.1 Extraktion der mikrosomalen Fraktion**

Für die Präparation von mikrosomaler Fraktion aus humanen HeLa- Zellen bzw. murinen RAW- oder NIH-Zellen wurden etwa  $3 \times 10^6$  Zellen für 24 h bei 37 °C in entsprechendem Medium kultiviert. Das Zellmedium wurde anschließend durch frisches Medium ersetzt. Als proinflammatorischer Stimulus wurde dem HeLa- und NIH-Medium IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) + TNF $\alpha$  (5 ng/mL) bzw. dem RAW-Medium 10 mg/mL LPS zugesetzt. Nach 16 h Inkubationsdauer wurden das Medium abgesaugt, die Zellen in 2 mL PBS abgeschabt und bei 5000 rpm für 2 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis, wurde das Pellet in 800 µL Kaliumphosphat-Puffer (Kpi-Puffer) mit 1x Tablette Complete Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim) je 10 mL, 0.25 M Sukrose und 1 mM reduziertem Glutathion (GSH) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann sonifiziert (3x 10 s, niedrigste Energie, keine Intervalle), in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und bei 10.000 g, 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand mit der subzellulären Fraktion (das Pellet enthält die nukleare und mitochondriale Fraktion) wurde anschließend in 1,5 mL-Ultrazentrifugationsgefäße überführt und bei 45.000 rpm für 2 h bzw. 53.000 rpm für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands (cytosolische Fraktion) entspricht das Pellet der mikrosomalen Fraktion, welche bei -80 °C gelagert wurde. Zum Homogenisieren wurden zum Pellet 100 µL Kpi<sup>+</sup>-Puffer gegeben und die Lösung sonifiziert (10-30 s). Der Proteingehalt wurde mittels Bradford-Methode ermittelt.

### 2.5.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Um vergleichbare Proteinmengen in einem Versuch einsetzen zu können, wurde in zellulären Extrakten zuerst die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt<sup>95</sup>.

Hierzu wird zuerst eine Standardreihe (0-10 µL BSA) in zweifacher Bestimmung in einer 96-Lochplatte vorgelegt, außerdem ebenfalls in Zweifachbestimmung jeweils 1 µL des Proteinextraktes. Jede Probe wird auf 10 µL mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Dazu wird jeweils 200 µL Bradfordreagenz gegeben. Die photometrische Bestimmung erfolgt bei einer Absorption von 595 nm Wellenlänge in einem SPECTRAFluorPlus von Tecan (Tecan Deutschland GmbH Krailsheim), nach 15 s schütteln. Die Proteinmenge in den Testproben wird dann anhand der Standardreihe ermittelt.

### 2.5.2.3 Immunoblot-Analyse (Western-Blot)

Zum Nachweis spezifischer Proteine in einem Proteinextrakt wurde ein Western-Blot (WB) durchführen. Dabei werden die Proteine gelelektrophoretisch anhand ihrer Größe und Ladung in einem Gel aufgetrennt. Danach werden die Proteine auf eine Membran geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Die Bindung wird dann über Fluoreszenz oder Substratumsetzung detektiert.

Für meine Arbeit wurden SDS-Gele verwendet. Folgende Zusammensetzung ergibt zwei Gele.

<u>Trenngel</u>		<u>Sammelgel</u>	
H <sub>2</sub> O	2,39 mL	H <sub>2</sub> O	2,4 mL
Tris (1,54 M)	2,46 mL	Tris (0,5 M, pH 6,8)	1 mL
Acrylamidlösung	5 mL	Acrylamidlösung	0,5 mL
SDS	98,4 µL	SDS	40 µL
APS	49,2 µL	APS	40 µL
TEMED	4,92 µL	TEMED	4 µL

Nach dem Gießen der Gele wurden diese in eine Gelelektrophoreseapparatur eingespannt. Die Apparatur wurde mit 1x WB-Laufpuffer aufgefüllt und jeweils 50 µg Protein je Geltasche mit 4x-Lämmli-puffer im Verhältnis 5:1 (4 Teile Protein plus 1 Teil Lämmli) aufgetragen.

Für einen Größenvergleich wurde der Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein Standard verwendet. Die Proteine wurden bei 120 Volt ca. 90 Minuten lang aufgetrennt. Das Übertragen der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman, Brentford, UK) geschah in einer Wet-Blotting-Apparatur (BioRad, München) bei konstanter Spannung von 100 Volt für 60 Min.

Das Bandenmuster wurde mit einer Ponceau-Färbung detektiert, indem die Membran für etwa 5 Minuten in Ponceau-Rot-Lösung gelegt und anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen wurde.

Um unspezifische Antikörperbindungen an die Membran zu verringern wurden diese für eine Stunde mit WB-Blockingpuffer (BB) geblockt.

Der verwendete primäre Antikörper richtete sich gegen das Protein mPGES-1, nicht aber gegen mPGES-2 oder cPGES (Agrisera, Vännäs, Schweden bzw. Cayman, Ann Arbor, USA). Er wurde mit der Membran bei 4 °C über Nacht bzw. über das Wochenende inkubiert (Verdünnung 1:400 in 0,05 % Tween in TBS + 2 % Milchpulver). Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit 0,01 % Tween in TBS wurde die Membran mit einem Zweitantikörper inkubiert (1 h, dunkel, bei Raumtemperatur (RT), Verdünnung 1:10.000 in Odyssey-Blockingpuffer + 0,1 % Tween in PBS, 1:1 gemischt), der sich gegen die FC-Domäne des Erstantikörpers richtete (Anti-Rabbit) und fluoreszenzgekoppelt war. Die Detektion erfolgte nach dreimaligem Waschen mit einem Odyssey Scanner (LI-COR, Bad Homburg) bei 680 nm Wellenlänge.

Als Ladekontrolle wurde eine Antikörperinkubation durchgeführt, die gegen das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin (Verdünnung 1:10.000 in Odyssey-Blockingpuffer + 0,1 % Tween in PBS, 1:1 gemischt) gerichtet war.

#### 2.5.2.4 mPGES-1 Assay

Der Assay wurde dazu verwendet das inhibitorische *in vitro*-Potential von Testsubstanzen auf die mPGES-1 abzuschätzen.

Dazu wird das Substrat Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) durch das Enzym mPGES-1 zum Produkt Prostaglandin E<sub>2</sub> umgewandelt. Das Enzym wurde durch Zellextraktion und Ultrazentrifugation stark angereichert. Einflüsse durch Inhibitoren können durch den relativen Vergleich des Produktlevels ermittelt werden. Da die mPGES-1 eine hohe katalytische Aktivität besitzt und das eingesetzte Substrat PGH<sub>2</sub> bei Raumtemperatur autokatalytisch schnell zu den terminalen Prostanoiden umgewandelt wird, wurde der Versuch auf Eis durchgeführt.

Der Aktivitätsassay wurde auf Basis der Methode von Thoren et al.<sup>96</sup> durchgeführt. Dazu wurden je Ansatz 0,15 mg/mL (HeLa, NIH) bzw. 0,3 mg/mL (RAW) mikrosomale Fraktion in KPI<sup>+</sup>-Puffer eingesetzt. Nach einer Vorinkubationsphase von 30 min bei RT mit den Testsubstanzen bzw. Vehikel wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µM PGH<sub>2</sub> (Larodan, Malmö, Schweden) gestartet. Als Negativkontrolle (nicht-enzymtische Umwandlung von PGH<sub>2</sub>) wurde das gleiche Volumen KPI<sup>+</sup>-Puffer eingesetzt. Nach 1 min wurde die Reaktion durch Zugabe einer Stop-Lösung (Konzentration im Assay: 40 mM FeCl<sub>2</sub>, 80 mM Zitronensäure) beendet. Um das Produkt zu stabilisieren wurden jeweils 100 µl Reaktionsgemisch mit 100 µl EDTA-Lösung (0,15 M) gemischt und anschließend bei -80°C gelagert.

Der Versuch wurde in 96-Lochplatten durchgeführt und die maximale DMSO-Konzentration betrug 1 %.

### **2.5.2.5 COX-1/2 Assay**

Zur Bestimmung der direkten Hemmung der COX-1 bzw. COX-2 wurde ein Inhibitor-Screening Kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) nach Herstelleranleitung verwendet. Der Assay basiert auf der enzymatischen Umsetzung des Substrates Arachidonsäure durch die Cyclooxygenasen zum Produkt  $\text{PGH}_2$ , welches anschließend durch  $\text{SnCl}_2$  zum stabileren  $\text{PGF}_{2\alpha}$  umgewandelt wird. Die eingesetzten Enzyme entstammen dem Schaf (COX-1) oder sind human rekombinant (COX-2).

100  $\mu\text{L}$  des Reaktionsgemischs wurden mit 200  $\mu\text{L}$  Methanol verdünnt und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Extraktion/Messung gelagert.

### **2.5.3 Methoden mit humanem Vollblut**

Zur Bestimmung potentieller Effekte von Testsubstanzen auf verschiedene Eicosanoide in humanem Blut, wurde für jede Substanz ein Eicosanoid-Profil gemessen. Dazu wurde jede Substanz in drei Versuchen eingesetzt, in denen jeweils unterschiedliche Eicosanoide gebildet wurden. Ein agonistischer Effekt wurde angenommen, wenn das relative Level eines Eicosanoids 33 % über der Kontrolle lag, ein antagonistischer Effekt wenn das relative Level um mindestens 33 % gesenkt war.

#### **2.5.3.1 COX-1 Vollblut-Assay**

Während der Hämostase werden über den COX-1/Thromboxan-A-Synthase-Pfad große Mengen Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) gebildet.  $\text{TXA}_2$  wirkt lokal vasokonstriktiv und steigert die Thromozytenaggregation.

Um Auswirkungen auf den  $\text{TXA}$ -Level zu untersuchen, wurde humanes venöses Blut von gesunden freiwilligen Spendern verwendet, die während der vorangegangenen mindestens 7 Tage keine NSARs eingenommen hatten. Das Blut wurde in neutralen Monovetten (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht) ohne Koagulationshemmer gesammelt. Je Probe wurden 500  $\mu\text{L}$  Blut mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen in 1,5 mL-

Reaktionsgefäßen gemischt und bei 37 °C für 1 h inkubiert, um die Blutgerinnung zu fördern. Negativkontrollen wurden statt dessen direkt auf Eis abgekühlt, um die Blutplättchenaktivierung zu unterbinden. Positivkontrollen enthielten statt der Testsubstanz das gleiche Volumen an DMSO. Als Kontrollsubstanz wurde der selektive COX-1-Hemmer SC-560 (5 µM, Cayman Chemical, Michigan, USA) eingesetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt um die TXA<sub>2</sub>-Produktion zu stoppen, bevor das Blut durch Zentrifugation (4 °C, 2000 rpm, 20 min, Eppendorf 5417R) in feste Bestandteile und Plasma separiert wurde. Das Plasma wurde in frische 1,5 mL-Reaktionsgefäße oder 96-Lochplatten überführt und bei -80° C bis zur Extraktion der Prostanoiden gelagert.

### **2.5.3.2 COX-2 Vollblut-Assay**

Die mPGES-1-Expression ist im Blut zum großen Teil an die Expression der COX-2 gekoppelt. Zahlreiche proinflammatorische Stimuli (z. B. LPS) erhöhen das Proteinlevel beider Enzyme und damit auch die Synthese terminaler Prostanoiden, insbesondere PGE<sub>2</sub>. In diesem Versuch wurde die Hemmung der COX-2/mPGES-1-vermittelten PGE<sub>2</sub>-Synthese in humanem Vollblut untersucht. Dazu wurde das Blut gesunder freiwilliger Spender, die während der vorangegangenen mindestens 7 Tage keine NSARs eingenommen hatten, in Monovetten mit NH<sub>4</sub>-Heparin (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht) gesammelt, welches die Koagulation unterdrückt. 500 µL des heparinisierten Blutes wurden in einer 24-Lochplatte zu verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen gegeben. Um die COX-1-vermittelte Prostanoid-Synthese zu unterdrücken wurde dem Blut zusätzlich 10 µg/mL Acetylsalicylsäure zugesetzt. Nach einer 15-minütigen Vorkubationsphase bei 37 °C wurde dem Blut 500 µg/mL (10 µg/mL Endkonzentration) Lipopolysaccharid (LPS, aus *E. Coli* O111:B4 Sigma-Aldrich, Seelze) in autologem Plasma zugesetzt. Negativkontrollen wurden statt dessen PBS in autologem Plasma zugesetzt. Positivkontrollen enthielten statt der Testsubstanz das gleiche Volumen an DMSO. Als Kontrollsubstanz wurde der selektive COX-2-Hemmer Celecoxib (5 µM, LC



Laboratories, Woburn, USA) eingesetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt, und das Plasma durch Zentrifugation (4 °C, 2000 rpm, 20 min, Eppendorf 5417R) gewonnen. Das Plasma wurde in frische 1,5 mL-Reaktionsgefäße oder 96-Lochplatten überführt und bei -80° C bis zur Extraktion der Prostanoiden gelagert.

### **2.5.3.3 Leukotriene / HETEs-Vollblut-Assay**

Um Einflüsse auf die Leukotrien/HETE-Synthese in humanem Blut zu untersuchen wurden 500 µL heparinisiertes Vollblut mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen in eine 24-Lochplatte gegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert, bevor dem Blut 20 µM Calciumionophor (A23187, Sigma-Aldrich, Seelze) in autologem Plasma hinzugefügt wurden.

Negativkontrollen wurde stattdessen DMSO in autologem Plasma zugesetzt. Positivkontrollen enthielten statt der Testsubstanz das gleiche Volumen an DMSO. Als Kontrollsubstanz wurde der 5-LOX-Hemmer Zileuton (5 µM, freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Jun.-Prof. Dr. Proschak zur Verfügung gestellt) eingesetzt.

Nach weiteren 15 min Inkubation bei 37 °C wurden die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt und das Plasma nach Zentrifugation (4 °C, 2000 rpm, 20 min, Eppendorf 5417R) abgenommen und bei -80 °C bis zur Extraktion der Prostanoiden gelagert.

### **2.5.4 In Vivo Methoden**

Für alle Tierversuche wurden ausschließlich männliche C57Bl/6J-Mäuse mit einem Gewicht zwischen 22 g und 25 g von kommerziellen Züchtern erworben (Harlan bzw. Charles River). Das Gewicht wurde ein Tag vor Versuchsdurchführung kontrolliert. Alle Tiere hatten stets Zugang zu Futter und Wasser und wurden während der Versuche kontinuierlich überwacht.

#### **2.5.4.1 Genehmigung**

Alle Tierversuche wurden im Einklang mit dem gültigen Tierschutzgesetz durchgeführt und wurden zuvor durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt. Der Antrag wurde von Frau PD Dr. Sabine Grösch gestellt und wird unter dem Aktenzeichen V54-19C20/15-F95/44 geführt. Die Haltung der Tiere und alle Versuche wurden in der im Antrag angegebenen Einrichtung (Zentrale Forschungseinrichtung des Klinikums der JWG-Universität Frankfurt) durchgeführt.

#### **2.5.4.2 Wirkstoffformulierung (Galenik)**

Die Applikation von Wirkstoffen in Tiermodellen erfordert spezielle Anforderungen an die Formulierung. Zum einen sollte der Wirkstoffträger in der eingesetzten Konzentration keine toxischen Eigenschaften aufzeigen, besser noch keine Nebenwirkungen erzeugen. Zum anderen sollten biophysikalische Parameter wie pH-Wert, Viskosität, Temperaturstabilität etc. in einem Toleranzbereich liegen, der sowohl die Applikation ermöglicht, den Wirkstoff nicht schädigt und vor allem dem Tier möglichst geringes Leid zufügt.

In dieser Arbeit wurde eine Formulierung für die Substanz FR4-Dev6 entwickelt. Dazu wurden geringe Mengen des Feststoffs in 1,5 mL-Reaktionsgefäße eingewogen. Anschließend wurde eine entsprechenden Menge Lösungsmittel dazugegeben, intensiv gevortext und die Mischung für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Die Mischung wurde anschließend optisch auf ungelöste Partikel untersucht. Konnte keine vollständige Löslichkeit festgestellt werden, wurde die Mischung für 15 min in einem Ultraschallbad sonifiziert.

Da die benötigte Löslichkeit in veterinärmedizinischen Vehikeln nur für DMSO festgestellt werden konnte, wurden in allen weiteren Tierversuchen mit der Testsubstanz FR4-Dev6 eine Mischung aus 5 % DMSO und 95 % Miglyol 812N (Mittelkettige Triglyceride, FAGRON GmbH & Co. KG, Barsbüttel) (v/v) gewählt. Das verwendete Miglyol entspricht der Ph Eur 7.0-Spezifikation und wurde als Diluent (Verdünnungsmittel) eingesetzt. Sowohl DMSO, wie auch Miglyol wurden vor Verwendung mittels 0,22 µm-Filtration (Millex-GV, PVFD-Membran, Merck KGaA, Darmstadt) steril filtriert. Der Wirkstoff wurde stets am Tag vor der

Verwendung angesetzt. Dazu wurde eine entsprechende Menge FR4-Dev6 in 15 mL Braunglas-Gewindeflaschen (Supelco / Sigma-Aldrich, Seelze) eingewogen und unter einer Sterilbank durch Zugabe von DMSO gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit Miglyol verdünnt. Die entstandene Mischung wurde gevortext und bis zur Verwendung bei RT dunkel gelagert. Die Formulierung hat eine farblose bis schwach gelbliche Farbe (durch das Miglyol) und ist viskoser als Wasser (Dynamische Viskosität von Miglyol laut Datenblatt 30 mPa\*s). Vor Verwendung wurde die Mischung erneut gevortext.

### **2.5.4.3 *In Vivo* Pharmakologie**

In diesem Versuch wurde untersucht, ob und wie schnell der mPGES-1-Inhibitor FR4-Dev6 absorbiert wird, wie die Substanz im Körper verteilt wird (Distribution) und wie schnell die Metabolisierung bzw. Exkretion abläuft. Außerdem sollten etwaige kurzfristige Nebenwirkungen observiert werden.

Es wurden zwei Administrationsformen für die Applikation des Wirkstoffs gewählt: oral und intraperitoneal. Für beide Verabreichungswege wurde dieselbe Formulierung gewählt (siehe 2.5.4.2). Als Kontrolle wurde jeweils das Vehikel ohne Wirkstoff eingesetzt.

Für die perorale Applikation wurden 1 mL-Spritzen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) mit einem Schlundsondenaufsatz verwendet, für die intraperitoneale Gabe wurden 23 G 1"-Kanülen (0,6 mm Außendurchmesser, 25 mm Länge, Becton Dickinson GmbH) verwendet. Kanülen mit geringerem Durchmesser konnten auf Grund der Viskosität der Formulierung nicht verwendet werden. Jedes Tier erhielt eine einmalige Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht (KG) der Testsubstanz FR4-Dev6 bzw. eine entsprechendes Volumen Vehikel. Die Wirkstoffkonzentration der Formulierung betrug 1,25 mg/mL. Je 1 g Körpergewicht wurden 8 µL der Formulierung eingesetzt.

Nach der Applikation wurden die Tiere in den Käfig zurückgesetzt. Zu definierten Zeitpunkten (3 min [nur intraperitoneal], 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h) wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub> getötet und anschließend durch kardiale Punktion das Blut entnommen. Dem Blut wurden 100 I.E. Heparin

(ratiopharm GmbH, Ulm) zugesetzt, bevor das Plasma durch Zentrifugation separiert wurde. Weiterhin wurden folgende Organe teilweise oder vollständig entnommen: Leber, Lunge, Niere, Milz, Gehirn, Magen, Dünndarm, Dickdarm. Alle Organe wurden in PBS gewaschen und von eventuell anhaftendem Fettgewebe befreit. Magen, Dünndarm und Dickdarm wurden zusätzlich mit PBS durchgespült, um den Inhalt zu entfernen. Alle Proben wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

Je Zeitpunkt und Applikationsform wurden jeweils sechs Tiere mit dem Wirkstoff (FR4-Dev6) bzw. drei Tiere mit dem Vehikel behandelt.

#### **2.5.4.4 *In Vivo* Entzündungsmodell**

Neben pharmakologischen Fragestellungen sollte die Frage untersucht werden, ob der mPGES-1-Inhibitor FR4-Dev6 eine anti-inflammatorische Wirkung erzielen kann. Dazu wurde ein *in vivo*-Modell gewählt, bei der eine proinflammatorische Substanz (Zymosan A aus *Saccharomyces cerevisiae*) in einer der beiden Hinterpfoten einer Maus injiziert wird. Die dadurch entstehende starke lokale Schwellung der Pfote hat nach etwa 6 Stunden ihren Höhepunkt erreicht und kann mittels Plethysmometer quantifiziert werden.

Zielparameter dieser Untersuchung waren zum einen das Pfootenvolumen, zum anderen die quantitative Konzentrationsbestimmung von Prostanoiden, Leukotrienen und HETEs Hydroxyeicosanoidtetraensäuren (engl. *Hydroxyeicosatetraenoic acids*), sowie der Testsubstanz FR4-Dev6 im Pfootengewebe.

Ein Tag vor der Wirkstoffadministration wurde das basale Pfootenvolumen ermittelt. Um Schwankungen bei der Messung auszugleichen wurde das Volumen mindestens drei Mal bestimmt und der Mittelwert gebildet.

Die Testsubstanz FR4-Dev6 wurde in zwei Konzentrationen (10 mg/kg KG und 100 mg/kg KG) eingesetzt. Die Kontrollgruppen (Negativkontrolle und Positivkontrolle) erhielten statt dessen das Vehikel (siehe 2.5.4.2). Zusätzlich wurde einer weiteren Kontrollgruppe Celecoxib verabreicht (10 mg/kg KG in der selben Formulierung). Die Wirkstoffkonzentrationen der Formulierungen betragen 1,25 mg/mL (10 mg/kg KG FR4-Dev6- und Celecoxib-Gruppe) bzw.

12,5 mg/mL (100 mg/kg KG FR4-Dev6-Gruppe). Je 1 g Körpergewicht wurden 8 µL der Formulierung eingesetzt. Anschließend wurde den Tieren 20 µL Zymosan A (Sigma-Aldrich, Seelze) einer 10 mg/mL-Suspension in sterilem PBS *Planta pedis sinistra* (in die linke Fußsohle) injiziert. Die Negativkontrollgruppe erhielt statt dessen 20 µL steriles PBS. Nach der Applikation wurden die Tiere in den Käfig zurückgesetzt. 6 h nach der Zymosan-Injektion wurde das Pfotenvolumen der entzündeten Pfote drei Mal gemessen und der Mittelwert gebildet. Die Tiere wurden anschließend durch CO<sub>2</sub> getötet und durch kardiale Punktion das Blut entnommen. Dem Blut wurden 100 I.E. Heparin zugesetzt (ratiopharm GmbH, Ulm), bevor das Plasma durch Zentrifugation separiert wurde. Weiterhin wurde das Pfotenödemgewebe entnommen. Alle Proben wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

## 2.6 LC-MS/MS Analytik

Bei dieser Technik wird Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) gekoppelt. Dies ermöglicht die Auftrennung der Analyten in der Probe mittels HPLC und anschließende Detektion der Masse. Zusätzlich zur Detektion der Muttermasse eines Analyten wird nach einer Fragmentierung der Ionen in einer Kollisionszelle ein weiteres Spektrum aufgenommen. Diese Tandemmassenspektren erhöhen die Sensitivität und Selektivität.

Für meine Messungen wurde ein LC-MS/MS, bestehend aus einer HPLC-Einheit (Agilent 1200 series, Agilent Technologies GmbH, Böblingen) und einem Tandemmassenspektrometer (AB SCIEX QTRAP 5500, Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Diese waren über ein Schaltventil (VICI, Valco Instruments, Schenk, Schweiz) verbunden. Für die Stickstoffzufuhr wurde eine Anlage der Firma CMC Instruments (Eschborn) eingesetzt. Die Proben wurden über einen Autosampler (HTC PAL, CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) automatisiert entnommen und injiziert. Die Kühlung erfolgte bis zur Probenentnahme in einer Kühleinheit (PAL Stack

Cooler, CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) bei 4 °C. Die Geräte wurden über die Software Analyst (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies Instruments) in der Version 1.5 angesteuert.

Die quantitative Spurenanalytik erfolgte im Arbeitskreis von Frau Dr. Nerea Ferreirós Bouzas.

### 2.6.1 Quantitative Bestimmung von Prostanoiden

Vor der Messung wurden die Prostanoiden aus verschiedenen (biologischen) Matrices extrahiert. Im Folgenden wird die Extraktion aus Phosphatpuffer/FeCl<sub>2</sub>-/Zitronensäure-Lösung (KPI<sup>+</sup>/STOP), COX-Assay-Puffer (RB/MeOH), Zellkulturmedien, sowie humanem und murinem Blutplasma beschrieben.

Folgende Zusammensetzungen wurden verwendet:

Matrix			
KPI <sup>+</sup> /STOP	RB/MeOH	Zellkulturmedium	Plasma
100 µL Probe	70 µL Probe	400-500 µL Probe (RPMI- oder DMEM-Medium)	50-200 µL Probe
700 µL H <sub>2</sub> O	700 µL H <sub>2</sub> O	400 µL 45 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	600 µL 45 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
100 µL 0,15M EDTA	100 µL 0,15M EDTA	100 µL 0,15M EDTA	100 µL 0,15M EDTA
-	-	-	10 µL 2 mg/mL BHT
20 µL IS	20 µL IS	20 µL IS	20 µL IS
20 µL Methanol	20 µL Methanol	20 µL Methanol	20 µL Methanol

IS = Interner Standard, BHT = Butylhydroxytoluol

Der interne Standard enthielt 25 ng/mL PGE<sub>2-d4</sub>, 25 ng/mL PGD<sub>2-d4</sub>, 25 ng/mL TXB<sub>2-d4</sub>, 50 ng/mL PGF<sub>2α-d4</sub>, 37.5 ng/mL 6-keto-PGF<sub>1α-d4</sub>.

Nach dem Zusammenfügen der einzelnen Bestandteile wurde die Mischung intensiv gevortext. Anschließend wurde die Mischung zentrifugiert und auf eine Festphasenextraktionssäule (30 mg Bond Elut NEXUS 96 round-well plate, Agilent Technologies GmbH, Böblingen) aufgetragen, welche zuvor mit 1 mL MeOH und 1 mL H<sub>2</sub>O konditioniert wurden. Nach dem Auftragen der

Probenmischung wurde die Säule mit 1 mL 30 % MeOH gewaschen und anschließend 7 min getrocknet. Die Prostanoiden wurden mit 1 mL Hexan/Ethylacetat/Isopropanol (30:65:5 v/v/v) eluiert.

Für die Extraktion von Prostanoiden aus Gewebe wurde folgende Zusammensetzung verwendet:

Matrix
<b>Gewebe</b>
2-50 mg Probe
200 µL PBS
20 µL IS
20 µL Methanol
5 Mahlkugeln
600 µL Ethylacetat (2x)

Nach dem Zusammenfügen der einzelnen Bestandteile in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen wurde das Gewebe in einer Schwingmühle (MM400, Retsch GmbH, Haan) für 2 min bei 25 Hz nassvermahlen. Die eingesetzten Mahlkugeln waren mit Zirkoniumoxid beschichtet. Nach dem Gewebeaufschluss wurden die Reaktionsgefäße für 2 min bei 5000 rpm (Eppendorf 5424, Hamburg) zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde erneut 600 µL Ethylacetat zur Probe gegeben, vermahlen, zentrifugiert und der Überstand überführt.

Das Eluat der Festphasenextraktion bzw. der Ethylacetatüberstand der Flüssig/flüssig-Extraktion wurde bei 45 °C unter kontinuierlichem Stickstoffstrom abgedampft. Dazu wurden folgende Evaporatoren verwendet: VapoTherm mobil II (Barkey GmbH & Co. KG, Leopoldshöhe), Evaporator (Liebisch Labortechnik, Bielefeld) oder TurboVap96 (Caliper Life Sciences GmbH, Rüsselsheim). Die Probe wurde dann in 100 µL Acetonitril/H<sub>2</sub>O/Ameisensäure (20:80:0,0025 v/v/v) resuspendiert und in 1,5 mL-Gewindeflaschen (10 mm Durchmesser, klar, Macherey-Nagel, Düren) mit 250 µL Micro Inserts (Macherey-Nagel) und 10 mm Schraubkappen mit eingelegtem Septum (Macherey-Nagel) überführt oder direkt in einer 96-Lochplatte resuspendiert.

Die Messung der Prostanoiden PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub> und 6keto-PGF<sub>1α</sub> erfolgte auf Basis der Methode von Ronald Schmidt<sup>1</sup>. TXB<sub>2</sub> wurde an Stelle des instabilen TXA<sub>2</sub> und 6keto-PGF<sub>1α</sub> statt PGI<sub>2</sub> gemessen.

Zur Quantifizierung wurde jeweils eine Standardreihe vermessen. Diese bestand aus 13 Standards mit einer effektiven Konzentration zwischen 0,1 ng/mL und 1250 ng/mL für PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, 6keto-PGF<sub>1α</sub> und TXB<sub>2</sub> bzw. zwischen 0,4 ng/mL und 5000 ng/mL für PGF<sub>2α</sub>. Eine zusätzliche "Blank"-Kontrolle enthielt keinen Standard, aber internen Standard, eine "Doubleblank"-Kontrolle enthielt weder Standard, noch internen Standard. Zusätzlich wurden regelmäßig Qualitätskontrollen und Lösungsmittelkontrollen vermessen.

Die beiden Lösungsmittel (mobile Phase A: H<sub>2</sub>O + 0,0025 % v Ameisensäure, mobile Phase B: Acetonitril + 0,0025 % v Ameisensäure) wurden nach dem in Tabelle 1 angegebenen Verhältnis gemischt. Als HPLC-Säule wurde eine Synergi 4u Hydro-RP 80A 150x2 mm 4 micron (Phenomenex, Aschaffenburg) mit entsprechender Vorsäule verwendet.

**Tabelle 1:** Bei der Prostanoid-Messung eingesetzte Mischverhältnisse der Lösungsmittel (Pumpengradient)

Zeit (min)	Durchflussrate (µl/min)	Lösungsmittel A (%)	Lösungsmittel B (%)
0	300	90	10
1	300	90	10
2	300	60	40
3	300	60	40
4	300	50	50
6	300	50	50
8	300	10	90
9	300	10	90
10	300	90	10
16	300	90	10



Folgende Geräteparameter wurden verwendet:

Ionenquelle ( <i>Ion Source</i> ):	Turbo Spray
Kollisionsgas ( <i>Collision Gas</i> ):	Low
Gasvorhang ( <i>Curtain Gas</i> ):	40 psi
Ionenquelle Gas 1 ( <i>Ion Source Gas 1</i> ):	30 psi
Ionenquelle Gas 2 ( <i>Ion Source Gas 2</i> ):	80 psi
Ionen-Zerstäuber Ladung ( <i>Ion Spray Voltage</i> ):	-4500 V
Temperatur:	450 °C
Quadrupole (alle)	MRM-Modus

Das Tandem-Massenspektrometer wurde im negativen Ionenmodus verwendet.

Folgende Massenübergänge wurden bei der Messung ermittelt:

Analyt (PGD <sub>2</sub> ):	m/z	351,2 -> 251,1
Analyt (PGE <sub>2</sub> ):	m/z	351,2 -> 271,2
Analyt (PGF <sub>2α</sub> ):	m/z	353,1 -> 309,2
Analyt (TXB <sub>2</sub> ):	m/z	369,1 -> 169,1
Analyt (6keto-PGF <sub>1α</sub> ):	m/z	369,1 -> 162,9
IS (PGD <sub>2-d4</sub> ):	m/z	355,1 -> 237,0
IS (PGE <sub>2-d4</sub> ):	m/z	355,1 -> 275,1
IS (PGF <sub>2α-d4</sub> ):	m/z	357,1 -> 313,2
IS (TXB <sub>2-d4</sub> ):	m/z	373,1 -> 173,0
IS (6keto-PGF <sub>1α-d4</sub> ):	m/z	373,2 -> 167,1

## 2.6.2 Quantitative Bestimmung von Leukotrienen und HETEs

Die Messung von Leukotrienen und HETEs in verschiedenen (biologischen) Matrices erfordert eine andere Extraktions- und Messmethode, welche im Folgenden beschrieben wird. Die Extraktion erfolgte aus humanem und murinem Plasma oder Gewebe.

Folgende Zusammensetzungen wurden verwendet:

Matrix
<b>Plasma</b>
50-200 µL Probe
20 µL IS
20 µL Methanol
600 µL Ethylacetat (2x)

IS = Interner Standard

Der interne Standard enthielt 25 ng/mL LTB<sub>4-d4</sub>, 25 ng/mL 5(S)-HETE<sub>-d8</sub>, 25 ng/mL 12(S)-HETE<sub>-d8</sub>, 25 ng/mL 15(S)-HETE<sub>-d8</sub> und 25 ng/mL 20-HETE<sub>-d6</sub>.

Nach dem Zusammenfügen der einzelnen Bestandteile wurde die Mischung intensiv gevortext und die Reaktionsgefäße für 2 min bei 5000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5424, Hamburg). Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde erneut 600 µL Ethylacetat zur Probe gegeben, gevortext, zentrifugiert und der Überstand überführt.

Für die Extraktion von Leukotrienen aus Gewebe wurde folgende Zusammensetzung verwendet:

Matrix
<b>Gewebe</b>
2-50 mg Probe
200 µL PBS
20 µL IS
20 µL Methanol
5 Mahlkugeln
600 µL Ethylacetat (2x)

Nach dem Zusammenfügen der einzelnen Bestandteile in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen wurde das Gewebe in einer Schwingmühle (MM400, Retsch GmbH) für 2 min bei 25 Hz nassvermahlen. Die eingesetzten Mahlkugeln waren mit Zirkoniumoxid beschichtet. Nach dem Gewebeaufschluss wurden die Reaktionsgefäße für 2 min bei 5000 rpm (Eppendorf 5424) zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde erneut

600 µL Ethylacetat zur Probe gegeben, vermahlen, zentrifugiert und der Überstand überführt.

Der Überstand wurde anschließend abgedampft (siehe 2.6.1) und danach in 100 µL Methanol/H<sub>2</sub>O (50:50 v/v) resuspendiert und in 1,5 mL-Gewindeflaschen mit 250 µL Micro Inserts und 10 mm Schraubkappen mit eingelegtem Septum überführt oder direkt in einer 96-Lochplatte resuspendiert.

Zur Quantifizierung wurde jeweils eine Standardreihe vermessen. Diese bestand aus 13 Standards mit einer effektiven Konzentration zwischen 0,25 ng/mL und 2500 ng/mL für LTB<sub>4</sub>, 5(S)-HETE, (±)11-HETE (optional), 12(S)-HETE, 15(S)-HETE und 20-HETE. Eine zusätzliche "Blank"-Kontrolle enthielt keinen Standard, aber internen Standard, eine "Doubleblank"-Kontrolle enthielt weder Standard, noch internen Standard. Zusätzlich wurden regelmäßig Qualitätskontrollen und Lösungsmittelkontrollen vermessen.

Die beiden Lösungsmittel (mobile Phase A: H<sub>2</sub>O + 0,0075 % v Ammoniak, mobile Phase B: Acetonitril + 0,0075 % v Ammoniak) wurden nach dem in Tabelle 2 angegebenen Verhältnis gemischt. Als HPLC-Säule wurde eine Gemini-NX 5u C18 110A 150x2 mm 5 µm Partikelgröße (Phenomenex, Aschaffenburg) mit entsprechender Vorsäule verwendet.

**Tabelle 2:** Bei der Leukotrien/HETE-Messung eingesetzte Mischverhältnisse der Lösungsmittel (Pumpengradient)

Zeit (min)	Durchflussrate (µl/min)	Lösungsmittel A (%)	Lösungsmittel B (%)
0	500	85	15
10	500	60	40
12	500	10	90
13	500	10	90
13,5	500	85	15
17,5	500	85	15

Folgende Geräteparameter wurden verwendet:

Ionenquelle ( <i>Ion Source</i> ):	Turbo Spray
Kollisionsgas ( <i>Collision Gas</i> ):	Medium
Gasvorhang ( <i>Curtain Gas</i> ):	30 psi
Ionenquelle Gas 1 ( <i>Ion Source Gas 1</i> ):	50 psi
Ionenquelle Gas 2 ( <i>Ion Source Gas 2</i> ):	50 psi
Ionen-Zerstäuber Ladung ( <i>Ion Spray Voltage</i> ):	-4500 V
Temperatur:	550°C
Quadrupole (alle)	MRM-Modus

Das Tandem-Massenspektrometer wurde im negativen Ionenmodus verwendet. Jede Ionenspur wurde pro MRM-Zyklus 50 ms lang betrachtet.

Folgende Massenübergänge wurden bei der Messung ermittelt:

Analyt (LTB <sub>4</sub> ):	m/z	335,1 -> 195,0
Analyt (5(S)-HETE):	m/z	319,1 -> 301,1
Analyt ((±)11-HETE):	m/z	319,1 -> 167,0
Analyt (12(S)-HETE):	m/z	319,1 -> 179,1
Analyt (15(S)-HETE):	m/z	319,1 -> 219,2
Analyt (20-HETE):	m/z	319,1 -> 301,2
IS (LTB <sub>4</sub> - <i>d4</i> ) :	m/z	339,1 -> 197,0
IS (5(S)-HETE- <i>d8</i> ):	m/z	327,2 -> 116,0
IS (12(S)-HETE- <i>d8</i> ):	m/z	327,1 -> 184,2
IS (15(S)-HETE- <i>d8</i> ):	m/z	327,2 -> 182,0
IS (20-HETE- <i>d6</i> ):	m/z	325,2 -> 281,1

### 2.6.3 Quantitative Bestimmung von FR4-Dev6

Die Extraktion von FR4-Dev6 erfolgt mit den selben Methoden wie für Leukotriene/HETEs (siehe 2.6.2). Da auch die Messung unter denselben Bedingungen (Gradient, Säule, Geräteparameter etc.) stattfindet, kann die

Substanz FR4-Dev6 in derselben Probe in einem Durchlauf zusammen mit Leukotrienen und HETEs quantitativ bestimmt werden.

Als interner Standard wurde entweder 15(S)-HETE-*d*<sub>8</sub> oder eine dreifach deuterierte Variante von FR4-Dev6 (FR4-Dev6-*d*<sub>3</sub>) eingesetzt, nachdem diese von Thomas Hanke synthetisiert wurde.

Für die Messung von FR4-Dev6 und FR4-Dev6-*d*<sub>3</sub> wurde das Massenspektrometer von Frau Dr. Nerea Ferreirós Bouzas eingestellt. Dazu wurde jeweils eine 10 ng/mL Lösung in Methanol direkt injiziert und die substanzspezifischen Parameter im Tuning-Modus optimiert. Die in Tabelle 3 angegebenen optimierten Parameter wurden dann in die finale Methode übernommen

**Tabelle 3:** Massenübergänge und zugehörige Spannungen der MRM-Methode Abkürzungen: M<sub>1</sub> = m/z der Verbindung, M<sub>2</sub> = m/z des Fragments, t = Zeit je MRM-Zyklus, DP = declustering potential, EP = entrance potential, CE = collision energy, CXP = cell exit potential

Analyt	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	t	DP	EP	CE	CXP
	m/z	m/z	[ms]	[V]	[V]	[V]	[V]
FR4-Dev6	416.5	252.2	30	-210	-10	-36	-21
	416.5	252.6	30	210	-10	-34	-17
	416.5	63.7	30	210	-10	-116	-5
	416.5	64.6	30	210	-10	-90	-9
	416.5	75.6	30	210	-10	-82	-9
FR4-Dev6- <i>d</i> <sub>3</sub>	419.2	253.1	30	-135	-10	-39	-10
	419.2	141.0	30	-135	-10	-26	-12
	419.2	140.0	30	-135	-10	-53	-8

## 2.7 Bioinformatische Methoden

### 2.7.1 Homologie Modelling

Die LTC4S-Kristallstruktur 2PNO<sup>97</sup> besteht wie die mPGES-1 aus einem Homotrimer. Das Rückgrad dieser Struktur wurde mit PyMOL<sup>98</sup> sequenzunabhängig mit der mPGES-1-Struktur aligniert. Dazu wurde die implementierte "super"-Funktion eingesetzt. Die LTC4S-Struktur 2PNO wurde nur in einer Auflösung von 3,3 Å ermittelt. Eine zweite Kristallstruktur (PDB-ID: 2UUH<sup>99</sup>) konnte in einer Auflösung von 2.15 Å ermittelt werden, besteht aber nur aus einer Einheit. Daher wurde jede Einheit des Trimers einzeln durch jeweils eine Einheit der höher aufgelösten Struktur ersetzt. Das finale Homologie-Modell wurde mit der Software MODELLER<sup>100</sup> in der Version 9.7 berechnet. Dazu wurde zuerst ein Alignment der LTC4S-Struktur mit der Aminosäuresequenz der mPGES-1 berechnet. Anschließend wurde eine komparative Modellberechnung durchgeführt. Dabei wurden die beiden Bewertungsmethoden GA341<sup>101</sup> und DOPE<sup>102</sup> (*Discrete Optimized Protein Energy*) verwendet.

Das finale Modell wurde daraufhin einer Qualitätsbewertung mit PROCHECK<sup>103</sup> unterzogen. In einer Ramachandran-Darstellung, die die Qualität von phi-psi-Torsionswinkeln aufzeigt, wurden 11 (3 %) Aminosäurereste in unerwünschten Regionen gefunden. Diese Reste liegen alle in strukturell variablen Schleifen-Regionen (engl. *Loop*) oder am N-Terminus des Proteins. Alle stereochemischen Parameter (Peptidbindungs-Planarität, Wasserstoffbrücken-Energien, tetraedrische Torsionen der  $\alpha$ -Kohlenstoffe, Chi-Winkel) der Median-Rückgrad und -Seitenketten waren in einem erwarteten Bereich, der auf einem Satz hochaufgelöster Strukturen basiert.

Die humane mPGES-1 unterscheidet sich in der Aminosäuresequenz von der anderer Spezies. Ein entsprechendes Sequenzalignment wurde mittels BLASTP-Algorithmus über die Webseite [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)<sup>104</sup> berechnet. Dazu wurde die mPGES-1-Aminosäuresequenz (UniProt-ID: O14684) gegen die

uniprotkb-Sequenzdatenbank aligniert (Matrix: blosum62, Treshold 10, Gapped true). Anschließend wurde ein multiples Aligment der gefundenen Sequenzen verschiedener Spezies mittels Clustal Omega-Algorithmus<sup>105</sup> über dieselbe Webseite berechnet. Dazu wurden die Standardparameter verwendet (Gonnet-Matrix, Gap-open-Penalty 6 Bit, Gap-Extension 1 Bit).

Orthologe Modelle der offenen Konformation der mPGES-1 für die Spezies Maus (*mus musculus*) und Ratte (*rattus norvegicus*) wurden erstellt, indem jede nicht-konservierte Aminosäure mit der Software PyMol ersetzt wurde. Entsprechende Rotamere wurden mit der Software MOE (Chemical Computing Group, Montreal, Kanada; Version 2009-10) inspiziert und ausgewählt.

### 2.7.2 Docking

Alle inhibitorisch aktiven Substanzen wurden mit der MOE-Software in das Homologie-Modell der offenen Konformation der humanen mPGES-1 gedockt. Potentielle Bindetaschen wurden mit dem "site finder"-Algorithmus ermittelt. Die größte Bindetasche wurde für das Docking ausgewählt. Für jede Substanz wurden dafür mit der "LowModeMD"-Methode<sup>106</sup> 3D-Konformere berechnet (Iterationslimit: 10.000, RMS-Gradient: 0.005 Å, RMSD-Limit: 0.25 Å, Spannungs-Grenzwert [engl. *strain cutoff*]: 7 kcal/mol, Maximale Anzahl Konformere: 10.000). 1.330 Konformere (FR4-Serie) bzw. 7.473 (FR20-Serie) wurden dadurch errechnet.

Das Docking wurde mit der "triangle matcher placement"-Methode und London dG-Scoring-Funktion durchgeführt. Eine Kraftfeld-Optimierung (Standard-Parameter) mit flexiblen Rezeptor-(mPGES-1)-Seitenketten und finaler Bewertung mit London dG-Methode wurde daran angeschlossen. Konformationsisomere der Liganden durch rotierbare Bindungen wurden erlaubt. Für das Docking wurde der Kofaktor Glutathion aus dem Modell entfernt.

### 2.7.3 Protein Ligand Interaction Fingerprints (PLIF)

Protein-Liganden-Interaktions-Fingerabdrücke (aus dem engl. *Protein Ligand Interaction Fingerprints*) wurden mit der MOE-Software über das eingebaute PLIF-Modul generiert. Dafür wurden folgende Interaktionstypen berücksichtigt: Seitenketten-Wasserstoffbrücken-Donoren (D), Seitenketten-Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (A), Rückgrad-Wasserstoffbrücken-Donoren (d), Rückgrad-Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (a), Lösungsmittel-Wasserstoffbrücken (O), Ionische Wechselwirkungen (I), Oberflächen-Kontakt (C). Das untere Interaktions-Limit wurde auf 1 % für die Interaktionen D, A, d, a, O, 5 % für I und 20 Å<sup>2</sup> für C gesetzt, das obere Limit auf 10 % für D, A, d, a, O, I und 50 Å<sup>2</sup> für C.



## **3 ERGEBNISSE**

Ziel dieser Arbeit ist Suche, Charakterisierung und Optimierung von Wirkstoffen, die einen Einfluss auf die mikrosomale Prostaglandin E Synthase 1 haben. Dazu wurden, basierend auf den Vorarbeiten der Diplomarbeit zwei unterschiedliche Substanzklassen ausgewählt.

### **3.1 Substanzklassenbezeichnung, Löslichkeit und Lagerung**

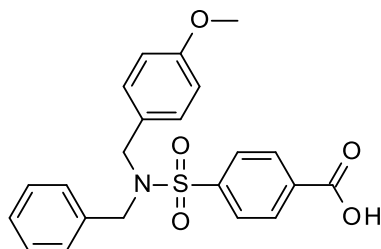
Die Namen der Substanzklassen sind frei gewählt und beziehen sich auf die Identifikationsnummer des initialen Screenings. Alle Derivate der jeweiligen Leitstruktur beginnen mit der Identifikationsnummer der Leitstruktur und einer zusätzlichen Nummer. Jede Nummer ist eindeutig und bezeichnet in dieser Arbeit immer dieselbe chemische Struktur.

Alle im Folgenden aufgelisteten Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, in DMSO gelöst. Der Feststoff wurde bei Raumtemperatur dunkel gelagert, die gelöste Substanz bei -20 °C.

### **3.2 Substanzklasse FR4**

Das Grundgerüst der Substanzklasse besteht aus einem Sulfonamid. An den Stickstoff wurden zwei Reste gekoppelt ( $R_1$  und  $R_2$ ), während an der Seite des Schwefels ein substituierter Benzylrest ( $R_3$ ) charakteristisch ist. Die Leitstruktur sowie alle Derivate weisen einen positiven LogP-Wert auf (LogP zwischen 2,54 und 7,64) und haben eine molare Masse zwischen 305,4 g/mol und 479,6 g/mol.

## Leitstruktur



### Chemische Bezeichnung

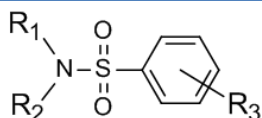
4-[Benzyl(4-methoxybenzyl)sulfamoyl]benzoessäure

### Eigenschaften

Molare Masse: 411,47 g/mol

LogP: 4,81

## Grundgerüst



### Chemische Bezeichnung

Benzolsulfonamid

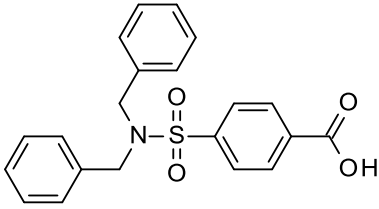
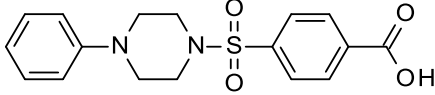
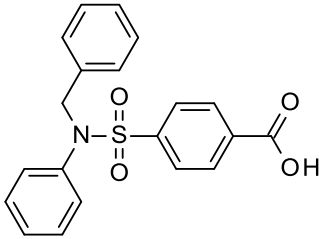
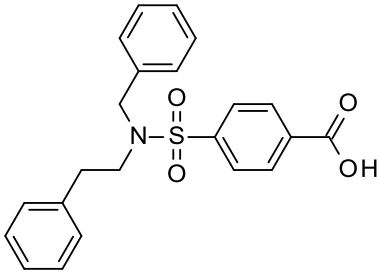
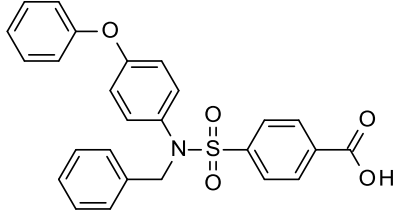
### 3.2.1 FR4-Derivate

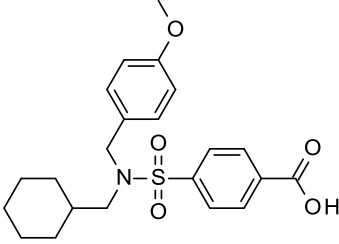
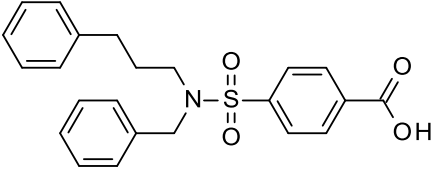
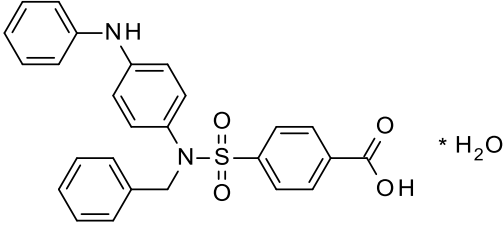
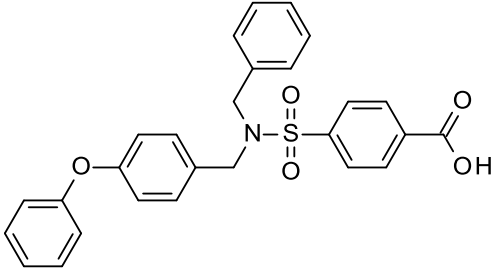
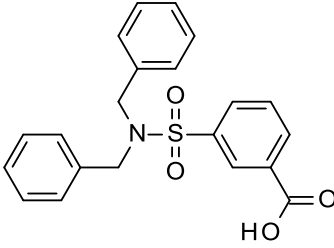
Alle in Tabelle 4 aufgelisteten Derivate wurden von Theresa Thieme und / oder Thomas Hanke aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz synthetisiert. Dabei wurde auf Basis bereits bestehender Analysedaten sowie veröffentlichter SAR-Ergebnisse entschieden, welche chemischen (Seiten-)gruppen ersetzt oder erweitert werden sollten. Insbesondere die Aktivitäts-Strukturbeziehungsanalysen um das Phenanthrenimidazol-Grundgerüst wurden dabei als Grundlage für Strukturoptimierungen herangezogen<sup>73, 130</sup>, aber auch die der Indol-basierten Substanzen, welche von MK-886 abgeleitet sind<sup>74</sup>, sowie der Oxacam-basierten Substanzen<sup>131</sup>. Insgesamt wurden dabei 32 Derivate um die Leitstruktur FR4 hergestellt.

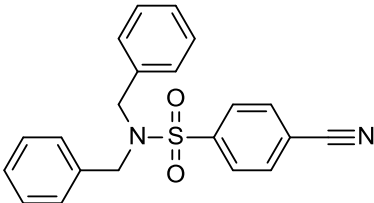
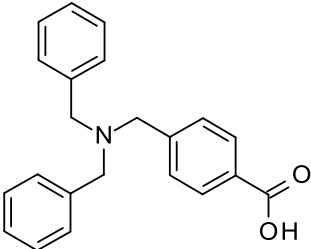
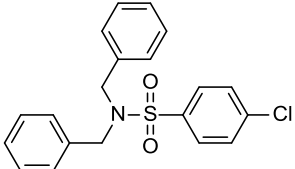
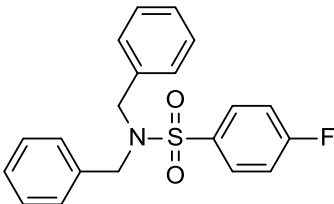
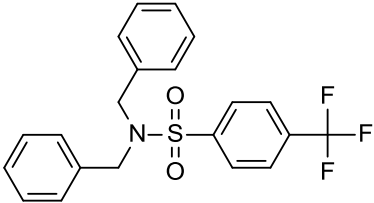
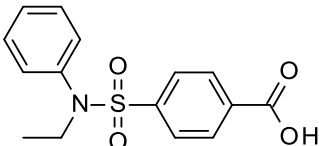
Die Identität und Reinheit ( $\geq 95\%$ ) aller Substanzen wurde von Theresa Thieme und Thomas Hanke mit geeigneten Methoden überprüft und sichergestellt. Dazu wurden  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , Massenspektren und Elementaranalysen verwendet. Die Derivate FR4-Dev31 und FR4-Dev32 konnten nicht mehr

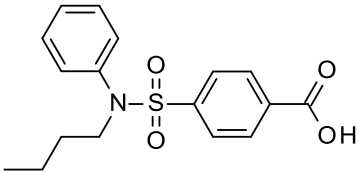
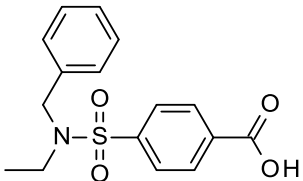
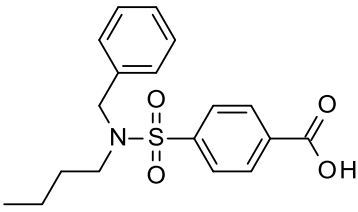
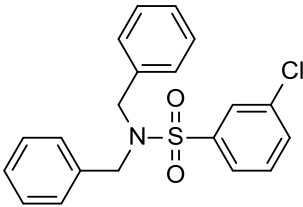
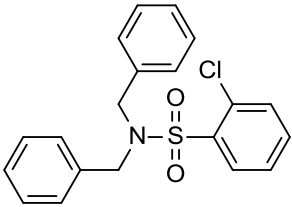
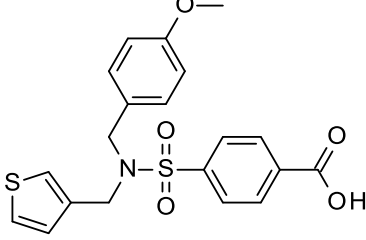
charakterisiert werden, da die Synthese erst kurzfristig abgeschlossen werden konnte. Der Vollständigkeit halber sind sie aber dennoch hier aufgelistet.

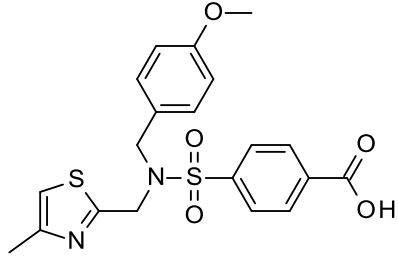
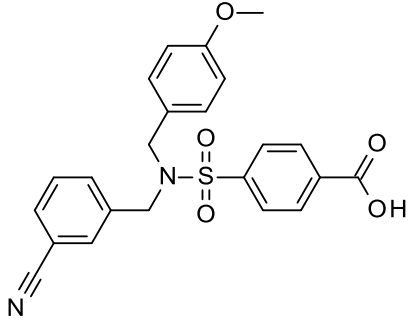
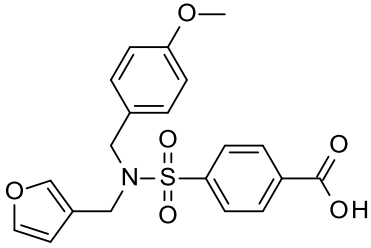
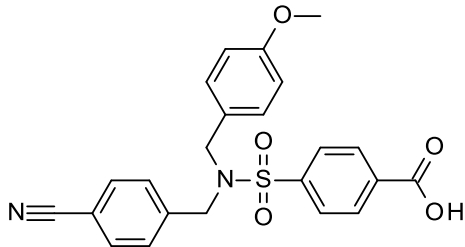
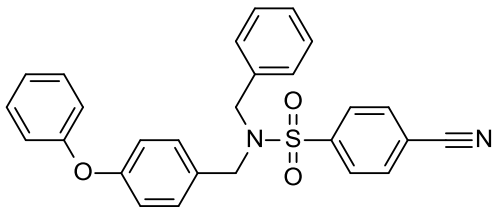
**Tabelle 4:** 32 Derivate um die Benzolsulfonamid-Leitstruktur FR4 wurden für Analysen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung und pharmakologische Profilbildungen verwendet

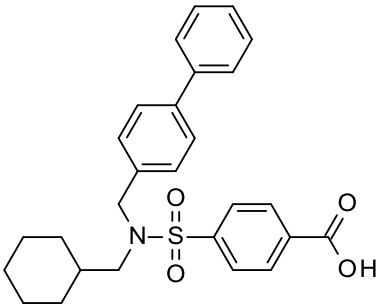
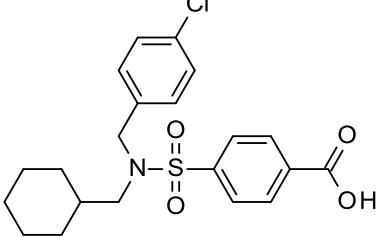
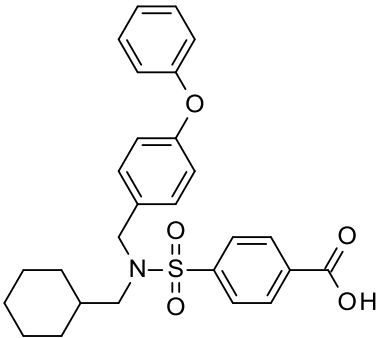
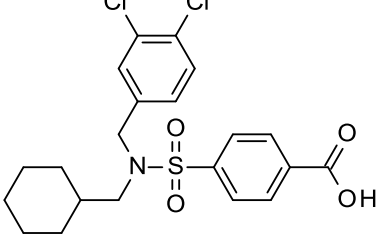
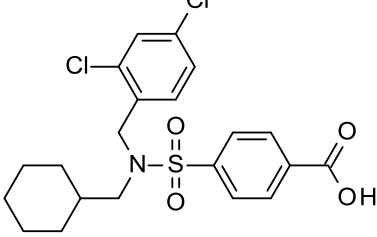
Bezeichnung	Struktur
FR4-Dev1	
FR4-Dev2	
FR4-Dev3	
FR4-Dev4	
FR4-Dev5	

Bezeichnung	Struktur
FR4-Dev6	
FR4-Dev7	
FR4-Dev8	
FR4-Dev9	
FR4-Dev10	

Bezeichnung	Struktur
FR4-Dev11	
FR4-Dev12	
FR4-Dev13	
FR4-Dev14	
FR4-Dev15	
FR4-Dev16	

Bezeichnung	Struktur
FR4-Dev17	
FR4-Dev18	
FR4-Dev19	
FR4-Dev20	
FR4-Dev21	
FR4-Dev22	

Bezeichnung	Struktur
FR4-Dev23	
FR4-Dev24	
FR4-Dev25	
FR4-Dev26	
FR4-Dev27	

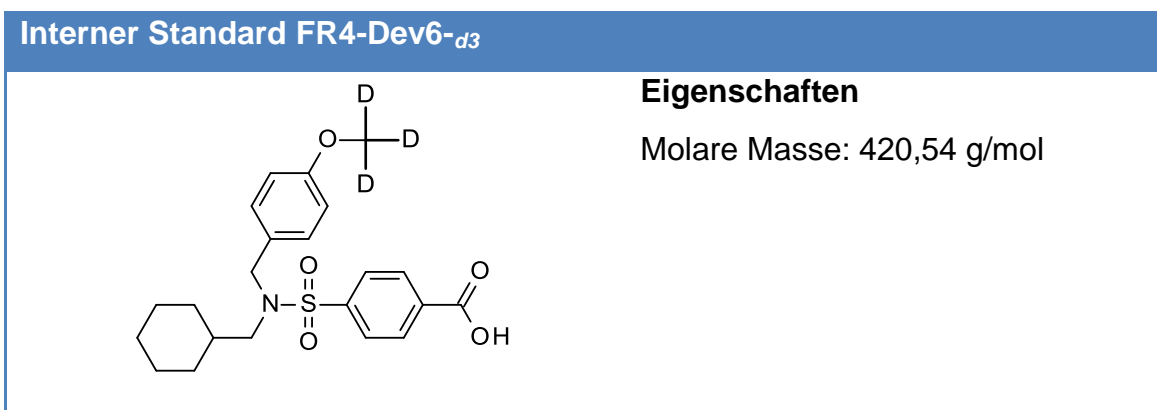
Bezeichnung	Struktur
FR4-Dev28	
FR4-Dev29	
FR4-Dev30	
FR4-Dev31	
FR4-Dev32	



### 3.2.2 Interner Standard zu FR4-Dev6

Die Substanz FR4-Dev6 wurde für pharmakokinetische *in vivo*-Untersuchungen eingesetzt. Dazu wurde die Substanz mittels LC-MS/MS in biologischen Matrices, wie Gewebe und Plasma, quantitativ bestimmt. Der Einsatz eines internen Standards ermöglicht dabei zum einen eine leichtere Findung des Analyten, da die Retentionszeiten von Analyt und internem Standard, auf Grund der extrem ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, in der Regel nahezu identisch sind. Zum anderen bietet der interne Standard die Möglichkeit Schwankungen bei der Probenaufbereitung bzw. der Messung auszugleichen, da die Peakfläche des Analyten in Relation zur Peakfläche des internen Standards gesetzt werden kann und damit eine relative Bezugsgröße zur Verfügung steht.

Der interne Standard FR4-Dev6-*d*<sub>3</sub> wurde von Thomas Hanke synthetisiert. Der IS ist dreifach deuteriert, unterscheidet sich also im Vergleich zu FR4-Dev6 nur durch den Austausch von drei Wasserstoffatomen durch die deuterierte Variante (siehe Abbildung 3). Das eingesetzte Massenspektrometer war in der Lage den Analyten und internen Standard auf Grund der Massenunterschiede (417,5 g/mol für den Analyten / 420,5 für den IS) zu trennen.



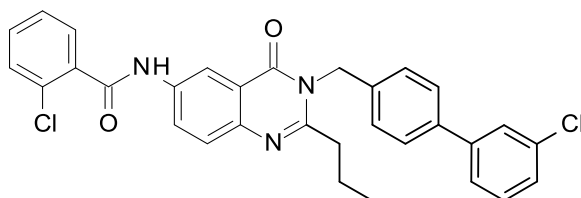
**Abbildung 3:** Struktur des dreifach deuterierten internen Standards zu FR4-Dev6

### 3.2.3 Quantitative Bestimmung von FR4-Dev6 und FR4-Dev6-<sub>d3</sub>

Für pharmakologische Analysen war es notwendig die absolute Konzentration der Testsubstanz FR4-Dev6 messen zu können. Insbesondere für die Berechnung kinetischer Parameter im Plasma und die Verteilung der Substanz in verschiedene Gewebe wird eine Methode zur Quantifizierung benötigt. In dieser Arbeit wurde dafür Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS-MS) eingesetzt. Diese Methode erfordert eine Etablierung einer eigenen Chromatographie- und Messmethode für jede Substanz, sowie einer zuverlässigen Probenaufbereitung im Vorfeld. Da einer der größten Vorteile von LC/MS-MS die Multikomponentenanalyse ist, wurde eine parallele Detektion von FR4-Dev6 mit den effektorischen Fettsäuren der Prostanoid- bzw. Leukotrien/HETE-Kaskaden angestrebt. Für diese beiden Kaskaden standen bereits etablierte Methoden zur Verfügung. Eine Integration der substanzspezifischen Parameter in die Prostanoid-Methode ergab eine niedrige Empfindlichkeit bei der quantitativen Bestimmung von FR4-Dev6. Die untere Quantifizierungsgrenze (engl. *lower limit of quantitation* (LLOQ)) lag bei etwa 0,1 ng/mL (Konzentration bezogen auf die Probe). Zudem war die Peakform teilweise nicht kontinuierlich parabelförmig. Die Integration in die Leukotrien/HETE-Methode erbrachte neben einer besseren Peakform auch einen vergleichbaren LLOQ im Plasma und einen niedrigeren LLOQ von etwa 0,005 ng/mL in Gewebeproben. Die obere Quantifizierungsgrenze (engl. *highest limit of quantitation* (HLOQ)) liegt bei etwa 250 ng/mL. Die beste Übereinstimmung von Analyt-/IS-Fläche zu Analyt-/IS-Konzentration der Kalibrierkurve wurde mittels quadratischer Regression und einer  $1/x^2$ -Gewichtung erzielt (r-Wert größer 0,99). Eine Beeinträchtigung der Selektivität der Leukotriene/HETEs und dazugehöriger IS durch FR4-Dev6 oder FR4-Dev6-<sub>d3</sub> konnte nicht festgestellt werden. Bezüglich der Robustheit ist anzumerken, dass Schwankungen in der Retentionszeit von FR4-Dev6 und dazugehörigem IS festgestellt wurden. Es wird vermutet, dass eine pH-Abhängigkeit des Fließmittels die Ursache ist, da frisch angesetzte Fließmittel zu einer niedrigeren Retentionszeit führen.

### 3.3 Substanzklasse FR20

#### Leitstruktur



#### Chemische Bezeichnung

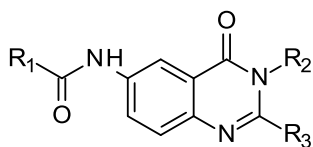
2-Chloro-N-[3-[[4-(3-chlorophenyl)phenyl]methyl]-4-oxo-2-propyl-quinazolin-6-yl]benzamide

#### Eigenschaften

Molare Masse: 542,46 g/mol

LogP: 6,83

#### Grundgerüst



#### Chemische Bezeichnung

N-(4-oxo-3,4-dihydroquinazolin-6-yl)formamid

Das Grundgerüst bildet ein 4-Chinazolinon (engl. 4-*Quinazolinone*), an das über eine Amidbrücke der Rest  $R_1$  gebunden ist. Über Position 2 und 3 wurden weitere Variationen eingeführt ( $R_2$  und  $R_3$ ). Zusätzlich wurden vier weitere Derivate mit in die Bibliothek aufgenommen, die von diesem Schema leicht abweichen. Derivat FR20-Dev28 hat an Position 7 zusätzlich einen Pyrrolidin-Substituenten, FR20-Dev29 hat statt der Amidbrücke einen Harnstoff-Linker, FR20-Dev30 hat die Amidbrücke an Position 3 statt 6 und FR20-Dev31 eine Grundgerüstvariation, bei der das Quinazolinon durch ein Benzoxazinon (Sauerstoff, statt Stickstoff an Position 1) ersetzt wurde. Der LogP-Wert der Substanzklasse liegt zwischen 1,89 und 7,31, die molare Masse zwischen 259,7 g/mol und 542,5 g/mol.

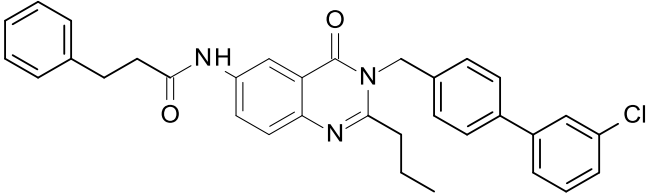
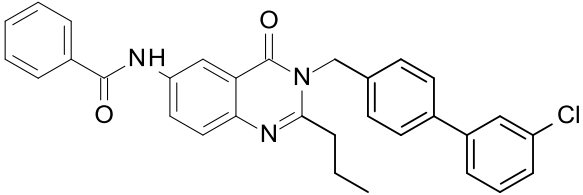
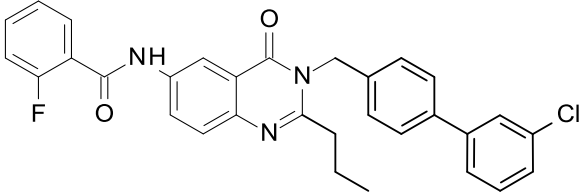
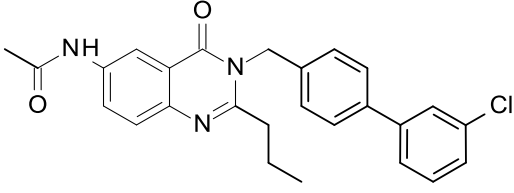
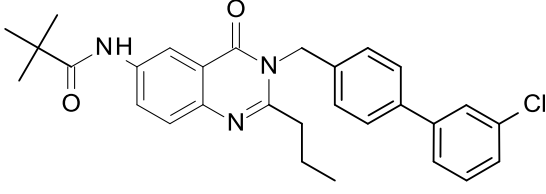
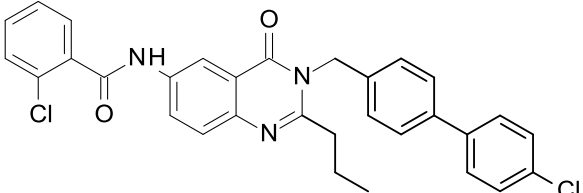
### 3.3.1 FR20-Derivate

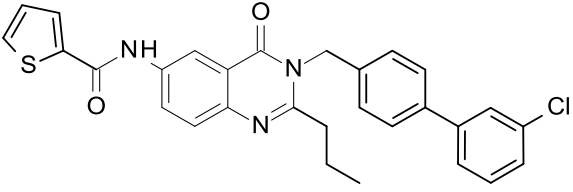
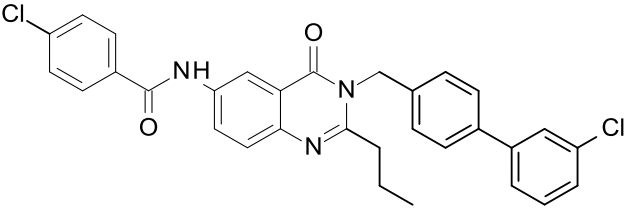
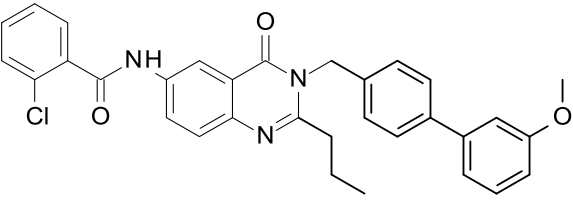
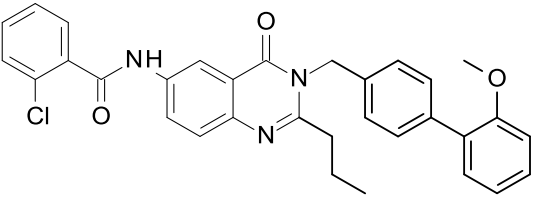
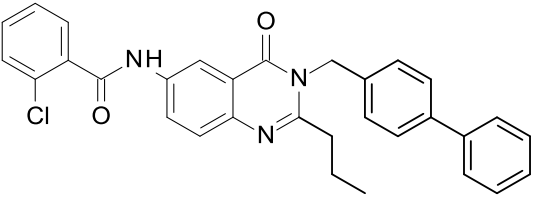
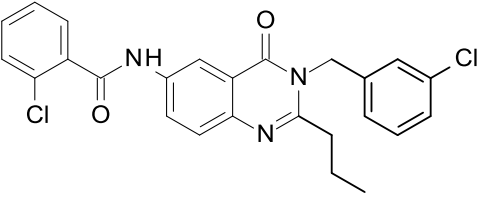
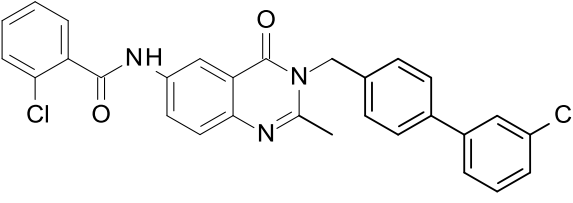
Die in Tabelle 5 aufgelisteten Derivate wurden mit Ausnahme von FR20-Dev21, FR20-Dev23 und FR20-Dev24 von Asinex ([www.asinex.com](http://www.asinex.com), Moskau, Russland) bezogen. Diese drei Derivate wurden von Estel.la Buscató aus der Arbeitsgruppe von Jun.-Prof. Dr. Ewgenij Proschak und mir synthetisiert.

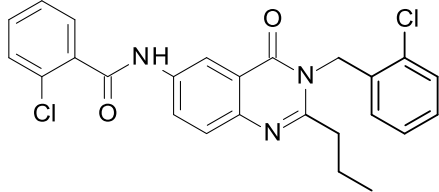
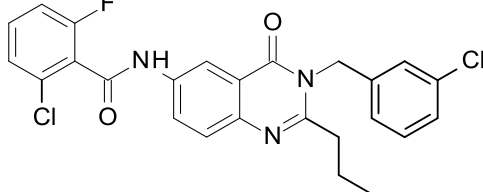
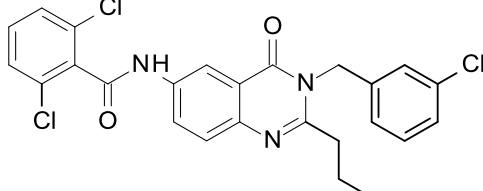
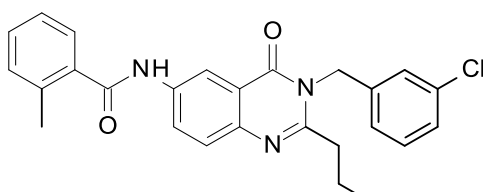
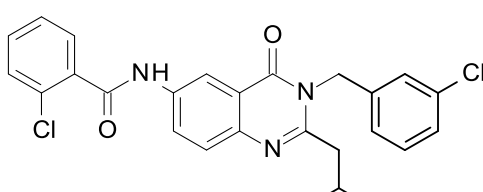
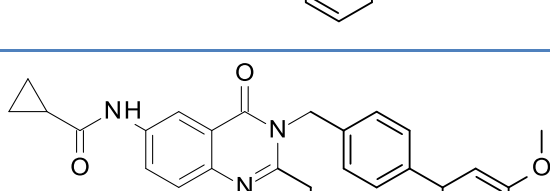
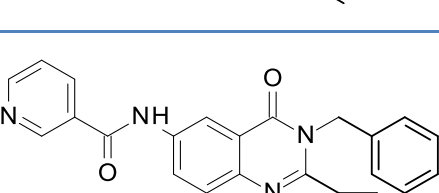
Die eigene Synthese war nötig um die begrenzte strukturelle Diversität der kommerziellen Datenbanken erweitern zu können. Die vorgestellte Synthesestrategie (siehe Schema 1) ermöglicht chemische Modifikationen an mindestens drei Resten des Quinazolinon-Grundgerüsts und bietet damit eine breite Palette an Substitutionsmöglichkeiten. Weitere Vorteile sind die schnelle Durchführbarkeit und geringe Menge an benötigtem Ausgangsmaterial. Ein Nachteil ist die teils aufwändige Aufreinigungsprozedur mittels Säulen- bzw. Flashchromatographie, die nötig wird, da neben den erwünschten Produkten auch größere Mengen Nebenprodukte entstehen. Insbesondere die Synthese des Zwischenprodukts (Di-substituiertes 3H-Quinazolin-4on) liefert nur eine Ausbeute von 12 %, während die Endprodukte FR20-Dev21, -23 und -24 Ausbeuten zwischen 35 % und 71 % liefern. Hier könnte eine Optimierung der Synthese- und Aufreinigungsparameter die Effizienz deutlich steigern.

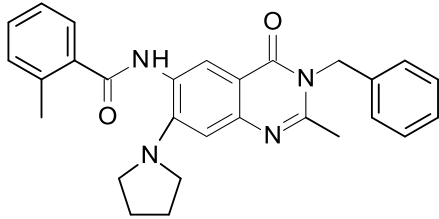
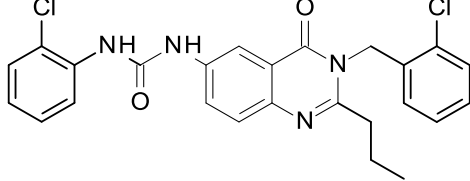
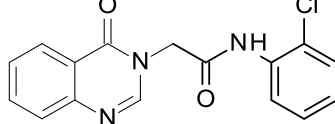
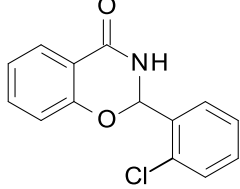
Die Identität und Reinheit ( $\geq 95\%$ ) aller Substanzen wurde mit geeigneten Methoden überprüft und sichergestellt. Dazu wurden  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , Massenspektren und Elementaranalysen verwendet. Für die gekauften Derivate garantiert der Hersteller entsprechende Qualitätsprüfungen.

**Tabelle 5:** 24 Derivate um die Quinazolinon-Leitstruktur FR20 wurden für Analysen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung und pharmakologische Profilbildungen verwendet

Bezeichnung	Struktur
FR20-Dev1	
FR20-Dev2	
FR20-Dev3	
FR20-Dev4	
FR20-Dev5	
FR20-Dev6	

Bezeichnung	Struktur
FR20-Dev7	
FR20-Dev8	
FR20-Dev9	
FR20-Dev10	
FR20-Dev11	
FR20-Dev12	
FR20-Dev13	

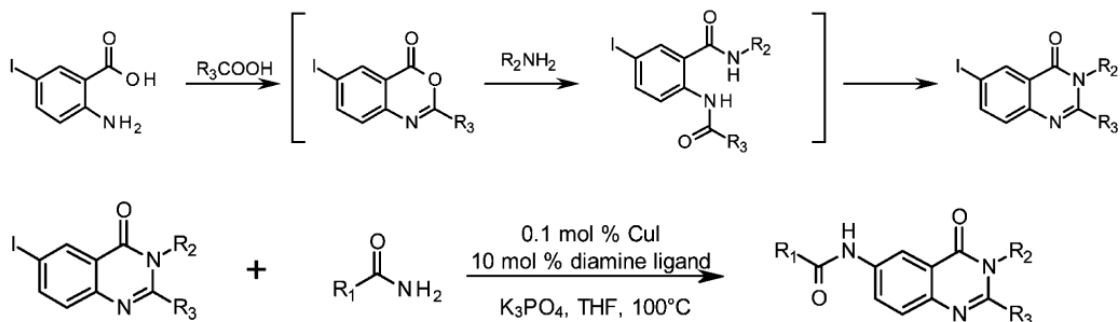
Bezeichnung	Struktur
FR20-Dev14	
FR20-Dev21	
FR20-Dev23	
FR20-Dev24	
FR20-Dev25	
FR20-Dev26	
FR20-Dev27	

Bezeichnung	Struktur
FR20-Dev28	
FR20-Dev29	
FR20-Dev30	
FR20-Dev31	

### 3.3.1.1 Synthese neuer FR20-Derivate mit Quinazolinon-Grundgerüst

Die drei Derivate FR20-Dev21, FR20-Dev23 und FR20-Dev24 wurden nach der in Schema 1 angegebenen Methode synthetisiert. Die Synthese umfasst drei Schritte. Das intermediäre Benzoxazinon entsteht durch Kondensation von 5-Iodoanthranilsäure mit Buttersäure und anschließender Dehydratation. Sukzessives Hinzufügen von 3-Chlorbenzylamin ergibt das 2,3-disubstituierte 6-Iodo-3H-quinazolin-4-on. Für diese Schritte wurde eine Synthesemikrowelle verwendet<sup>107</sup>. Der dritte Schritt umfasst eine an Goldberg angepasste Reaktion<sup>108</sup>, bei der eine Kupfer-katalysierte N-Arylierung von Amidin mit einem Heteroaryl-Iodid stattfindet. Die Reaktion wird durch Kupferiodid (CuI), N,N'-dimethylethylendiamin und K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> vermittelt.





**Schema 1:** Synthese-Route für Substanzen mit Quinazolinon-Grundgerüst

### 3.4 Aktivitätsbestimmung auf isoliertem humanem und murinem mPGES-1-Enzym

Um das inhibitorische Potential der beiden Substanzklassen auf die Zielstruktur mPGES-1 (engl. *target*) abzuschätzen, wurden alle Substanzen bei einer definierten Konzentration von 5  $\mu$ M für die FR4-Serie (Tabelle 6) und 1  $\mu$ M für die FR20-Serie (Tabelle 7) eingesetzt. Diese Konzentrationen wurden gewählt, da für die FR4-Klasse auf Basis der Leitstrukturaktivität eine Aktivität unter 10  $\mu$ M und für die FR20-Klasse von deutlich unter 1  $\mu$ M angestrebt wurde.

Von 32 getesteten Derivaten der FR4-Strukturklasse hemmten 13 das humane mPGES-1-Enzym zu mehr als 30 %, 11 davon stärker als die Leitstruktur FR4. Für fünf dieser Derivate wurde eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve erzeugt und darauf basierend der  $IC_{50}$  berechnet. Während die Leitstruktur einen  $IC_{50}$  von 14  $\mu$ M aufwies, lag dieser für die Derivate teils deutlich darunter (0,8  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M). Das angegebene Konfidenzintervall gibt die Spanne an, in der der wahre  $IC_{50}$ -Wert der jeweiligen Substanz mit 95 % Wahrscheinlichkeit zu finden ist.

**Tabelle 6:** Aktivitätsbestimmung der Benzolsulfonamid-Klasse auf isoliertem humanem und murinem (aus RAW- und NIH-Zellen) mPGES-1-Enzym. Die Hemmung wurde bei 5  $\mu$ M berechnet, die  $IC_{50}$ -Berechnungen basieren auf mindestens fünf Konzentrationen.

ID	human				murin			
	mPGES-1 Hemmung	SEM	$IC_{50}$	95 % Konfidenz Intervall	RAW mPGES-1 Hemmung	SEM	NIH mPGES-1 Hemmung	SEM
	[%]	[%]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[%]	[%]	[%]	[%]
<b>FR4</b>	<b>39,9</b>	8,6	<b>13,8</b>	3,0 - 63,5	29,8	8,3	10,6	0,8
<b>FR4-Dev1</b>	<b>51,4</b>	3,7						
<b>FR4-Dev2</b>	<b>58,7</b>	2,4						
FR4-Dev3	26,4	15,1						
<b>FR4-Dev4</b>	<b>57,0</b>	2,8						
<b>FR4-Dev5</b>	<b>79,8</b>	2,2	<b>1,7</b>	1,0 - 3,0	74,7	7,4	71,2	3,5
<b>FR4-Dev6</b>	<b>67,9</b>	3,4	<b>10,2</b>	7,7 - 13,4	n, b,	-	48,5	2,6
<b>FR4-Dev7</b>	<b>73,0</b>	1,0						
<b>FR4-Dev8</b>	<b>78,5</b>	0,8	<b>7,2</b>	4,3 - 12,0	n, b,	-	67,9	1,0
<b>FR4-Dev9</b>	<b>90,0</b>	3,0	<b>1,0</b>	0,9 - 1,2	71,4	8,3	65,1	0,7
FR4-Dev10	35,8	6,3						
FR4-Dev11	34,1	17,0						
FR4-Dev12	17,4	5,8						
FR4-Dev13	$\leq 0$	9,7						
FR4-Dev14	$\leq 0$	10,3						
FR4-Dev15	$\leq 0$	8,8						
FR4-Dev16	$\leq 0$	7,9						
FR4-Dev17	$\leq 0$	4,6						
FR4-Dev18	$\leq 0$	5,1						
FR4-Dev19	19,1	4,3						
FR4-Dev20	6,2	12,2						
FR4-Dev21	$\leq 0$	12,3						
FR4-Dev22	11,9	1,5						
FR4-Dev23	2,9	6,6						
FR4-Dev24	6,0	3,7						
FR4-Dev25	14,2	9,8						
FR4-Dev26	$\leq 0$	8,0						
FR4-Dev27	1,0	7,8						
<b>FR4-Dev28</b>	<b>76,0</b>	0,6	<b>0,8</b>	0,3 - 1,8	44,4	7,0	51,9	4,8
<b>FR4-Dev29</b>	<b>48,4</b>	5,4						
<b>FR4-Dev30</b>	<b>79,2</b>	2,5						
FR4-Dev31	n, b,	-						
FR4-Dev32	n, b,	-						
MD52 @0,05 $\mu$ M	50,8	3,2						
YS121					49,8	5,6	56,0	4,5

n. b. = nicht bestimmt; SEM = Standardfehler; YS121, MD52 = Kontrollsubstanzen;  $n \geq 3$

In der FR20-Strukturklasse konnten 14 Derivate die mPGES-1 mit  $\geq 30\%$  hemmen, acht Derivate zeigten, verglichen mit der Leitstruktur FR20, eine equipotente oder stärkere Hemmung (siehe Tabelle 7). Der  $IC_{50}$  dieser Derivate lag zwischen 0,2 und 0,4  $\mu\text{M}$ .

Die Kontrollsubstanz MD52 hemmte die humane mPGES-1 wie erwartet bei 0,05  $\mu\text{M}$  zu 50 %. MD52 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Schubert-Zsilavec zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 7:** Aktivitätsbestimmung der Quinazolinon-Klasse auf isoliertem humanem und murinem (aus RAW- und NIH-Zellen) mPGES-1-Enzym

ID	human				murin			
	mPGES-1 Hemmung	SEM	$IC_{50}$	95 % Konfidenz Intervall	RAW mPGES-1 Hemmung	SEM	NIH mPGES-1 Hemmung	SEM
	[%]	[%]	$[\mu\text{M}]$	$[\mu\text{M}]$	[%]	[%]	[%]	[%]
<b>FR20</b>	<b>66,7</b>	4,8	<b>0,13</b>	0,08 - 0,18	8,4	4,1	10,7	8,3
FR20-Dev1	32,7	6,6						
FR20-Dev2	15,3	6,0						
FR20-Dev3	30,0	4,6						
FR20-Dev4	14,8	5,8						
FR20-Dev5	18,8	10,1						
<b>FR20-Dev6</b>	<b>68,8</b>	3,1	<b>0,18</b>	0,10 - 0,32	12,4	3,9	17,1	2,5
FR20-Dev7	15,6	10,7						
FR20-Dev8	14,7	2,6						
<b>FR20-Dev9</b>	<b>71,5</b>	3,6	<b>0,21</b>	0,13 - 0,33	15,3	4,9	4,6	5,4
FR20-Dev10	61,3	8,4						
<b>FR20-Dev11</b>	<b>74,2</b>	0,9	<b>0,22</b>	0,13 - 0,38	11,8	4,0	20,3	2,1
<b>FR20-Dev12</b>	<b>86,3</b>	1,7	<b>0,36</b>	0,17 - 0,77	9,5	4,1	$\leq 0$	5,2
FR20-Dev13	41,9	0,8						
<b>FR20-Dev14</b>	<b>83,6</b>	0,8	<b>0,18</b>	0,11 - 0,29	15,2	8,7	6,6	6,9
<b>FR20-Dev21</b>	<b>75,6</b>	1,3	<b>0,37</b>	0,26 - 0,53	$\leq 0$	1,5	10,0	5,7
FR20-Dev23	61,3	2,3						
FR20-Dev24	63,1	3,9	<b>0,26</b>	0,16 - 0,42	6,0	2,6	0,9	1,7
<b>FR20-Dev25</b>	<b>67,2</b>	5,2	n, b,	-	3,8	5,9	17,8	3,2
FR20-Dev26	15,9	7,2						
FR20-Dev27	$\leq 0$	16,1						
FR20-Dev28	14,1	13,2						
FR20-Dev29	37,1	10,7						
FR20-Dev30	$\leq 0$	22,8						
FR20-Dev31	$\leq 0$	7,0						

n. b. = nicht bestimmt; SEM = Standardfehler,  $n \geq 3$

Neben der Hemmung des humanen Enzyms wurde die Hemmung der murinen mPGES-1 für die Leitstruktur und vier Derivate berechnet, da die Aminosäuresequenzen und dreidimensionale Strukturen in den Spezies

Mensch, Maus und Ratte nicht identisch sind. Dazu wurde das Enzym aus den zwei Nagetierzelllinien RAW 264.7 (Mausmakrophagen-ähnliche Zelllinie) und NIH 3T3 (embryonale Mausfibroblasten Zelllinie) isoliert. Beide Enzyme wurden mit derselben Konzentration an Wirkstoff inkubiert und die Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese quantifiziert. Die getesteten Derivate der Benzolsulfonamid-Klasse waren in der Lage neben dem humanen Enzym auch die murine Variante zu hemmen. Dabei machte es keinen großen Unterschied, aus welcher Zelllinie das Enzym isoliert wurde. Es wird hier aber angemerkt, dass Isolationen aus der NIH 3T3-Zelllinie deutlich mehr PGH<sub>2</sub>->PGE<sub>2</sub> umsetzten als eine vergleichbare Menge mikrosomaler Fraktion der RAW-Zelllinie. Alle Substanzen hemmten das murine Enzym etwa 10 - 20 % schwächer als das humane Enzym.

Im Vergleich dazu waren alle getesteten Substanzen der Quinazolinon-Klasse nicht in der Lage das murine Enzym zu hemmen.

Zur Kontrolle wurde YS121<sup>79</sup> eingesetzt. Wie erwartet konnte eine 50 %-ige Hemmung des murinen Enzyms bei 5 µM Wirkstoffkonzentration festgestellt werden.

### **3.5 Selektivitätsbestimmung gegenüber COX-1/2**

Um eine mögliche Kreuzreaktivität gegenüber den beiden Cyclooxygenasen-1 und -2 zu überprüfen wurden verschiedene Derivate beider Substanzklassen mit diesen beiden Enzymen inkubiert. Als Kontrollsubstanzen wurden der selektive COX-1-Hemmer SC-560 und der selektive COX-2-Hemmer Celecoxib verwendet. Auf Basis des *IC*<sub>50</sub> gegenüber der mPGES-1 wurden die Substanzen der FR4-Klasse bei 10 µM und die der FR20-Klasse bei 1 µM Wirkstoffkonzentration getestet. Als Testsystem wurden aufgereinigte COX-1 aus dem Schaf oder rekombinante humane COX-2 verwendet. Keine der getesteten Substanzen aus den beiden Klassen hemmte die COX-1 oder COX-2 zu mehr als 20 %, in der Regel lag die Hemmung deutlich darunter oder es konnte gar keine Hemmung beobachtet werden (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Hemmung der Cyclooxygenasen-1/2 *in vitro* durch die beiden Wirkstoffklassen FR4 und FR20. Alle FR4-Substanzen und SC-560 wurden bei 10  $\mu\text{M}$ , alle Substanzen der FR20-Klasse und Celecoxib bei 1  $\mu\text{M}$  getestet.

ID	COX-1 Hemmung	SEM	COX-2 Hemmung	SEM
	[%]	[%]	[%]	[%]
FR4	$\leq 0$	7,20	$\leq 0$	15,85
FR4-Dev5	12,43	19,67	$\leq 0$	1,66
FR4-Dev6	10,34	8,03	18,45	1,24
FR4-Dev8	$\leq 0$	12,02	12,92	17,33
FR4-Dev9	0,31	9,14	3,01	15,60
FR4-Dev19	1,40	6,00	$\leq 0$	18,82
FR20	$\leq 0$	20,94	6,74	25,69
FR20-Dev6	2,57	20,08	$\leq 0$	9,85
FR20-Dev9	20,08	12,37	2,54	8,67
FR20-Dev11	8,41	15,83	5,76	15,04
FR20-Dev12	$\leq 0$	6,68	$\leq 0$	13,71
FR20-Dev14	16,08	14,45	$\leq 0$	12,00
FR20-Dev21	$\leq 0$	2,93	-0,93	32,74
FR20-Dev24	$\leq 0$	28,67	$\leq 0$	14,96
FR20-Dev25	$\leq 0$	25,03	$\leq 0$	14,80
SC-560	94,06	4,22		
Celecoxib			52,91	7,67

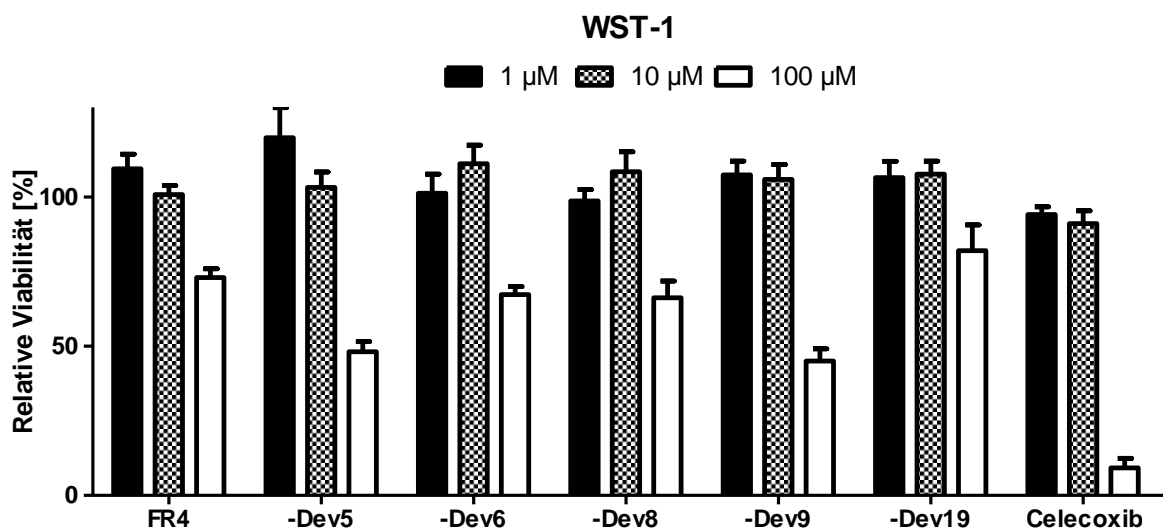
SEM = Standardfehler;  $n \geq 4$

### 3.6 Zellviabilität und Hemmung der mPGES-1 auf zellulärer Ebene

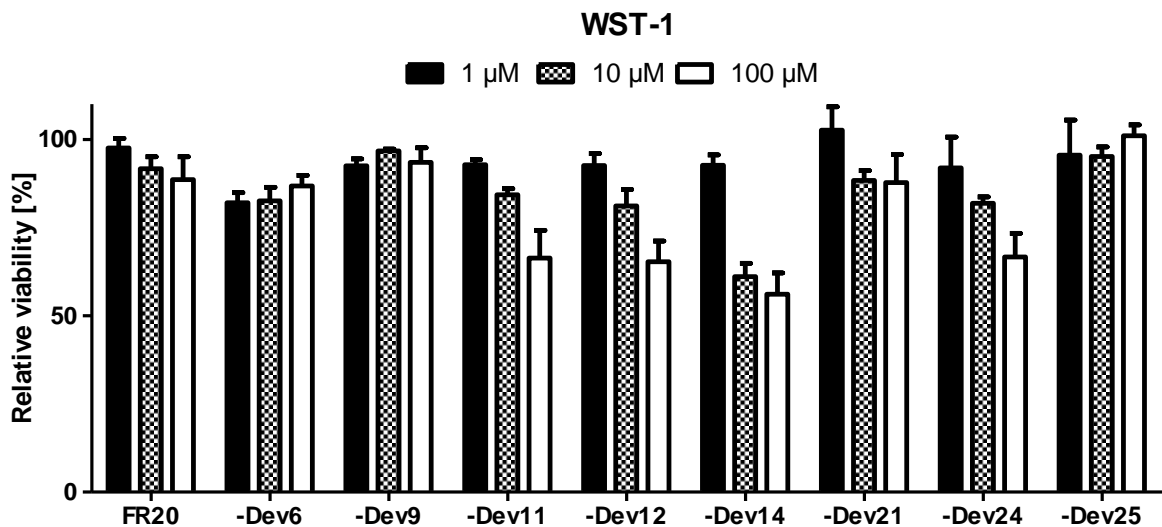
Die Hemmung eines isolierten oder rekombinanten Zielmoleküls liefert in der Regel keine Rückschlüsse über die Wirksamkeit und pharmakologischen Eigenschaften wie z. B. Zellpermeabilität, Stabilität, Bindung an Strukturelemente etc. in einem höheren Testsystem wie Zellen, Blut, Gewebe oder ganzen Organismen. Um die Wirksamkeit auf zellulärer Ebene zu untersuchen wurde zuerst eine Beeinflussung der Zellviabilität untersucht, da die Testsubstanzen auf Grund ihrer Struktur und physikochemischen Eigenschaften zytotoxisch wirken könnten. In diesem Fall könnte eine mögliche Hemmung der zellulären  $\text{PGE}_2$ -Synthese mit einem zytotoxischen Effekt verwechselt werden. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde ein WST-1-Assay durchgeführt, in dem humane HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert wurden. Zur Quantifizierung wurde das wasserlösliche Tetrazoliumsalz WST-1 nach 24 h Inkubationsdauer zu den Zellen gegeben. Zellen mit einer

intakten Atmungskette (als Indikator für Zellviabilität) setzen das Substrat zu Formazan um, was mit einem Spektralphotometer gemessen werden kann. Um eine möglichst reale Situation abzubilden wurden in diesem Test erstmals mehrere Stressstimuli gleichzeitig eingesetzt. Zum einen wurden die Wirkstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, um herauszufinden, bis zu welcher Konzentration die Wirkstoffe in diesem Zellsystem eingesetzt werden können, ohne die Zellviabilität einzuschränken. Zum anderen wurde parallel eine Entzündung simuliert, indem zwei Entzündungsmediatoren (IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$ ) in das Medium gegeben wurden. Letztere induzieren eine ganze Kaskade an proinflammatorischen Zellreaktionen<sup>161-163</sup>. Dieser Ansatz ermöglicht die Betrachtung einer möglichen zellschädigenden Wirkung der Testsubstanzen unter Bedingungen, die einem realen Szenario deutlich näher kommen als reine Toxizitätsstudien an "ungestressten" Zellen.

Alle Substanzen der FR-Serie zeigten keine Reduktion der Zellviabilität bei 1 und 10  $\mu$ M, bei 100  $\mu$ M wurde eine Reduktion zwischen 18 % (FR4-Dev19) und 55 % (FR4-Dev9) gemessen (Abbildung 4). Der selektive COX-2-Hemmer Celecoxib wurde als Vergleichssubstanz aufgeführt und zeigte ein vergleichbares Muster, wobei bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M so gut wie keine Viabilität (9 %) mehr festgestellt werden konnte.



**Abbildung 4:** Zellviabilitäts-Assay mit Substanzen der FR4-Serie auf stimulierten humanen HeLa-Zellen. Angegeben ist die Zellviabilität in Prozent in Relation zur DMSO-Kontrolle mit SEM nach 24 h Inkubationsdauer (n  $\geq$  6).

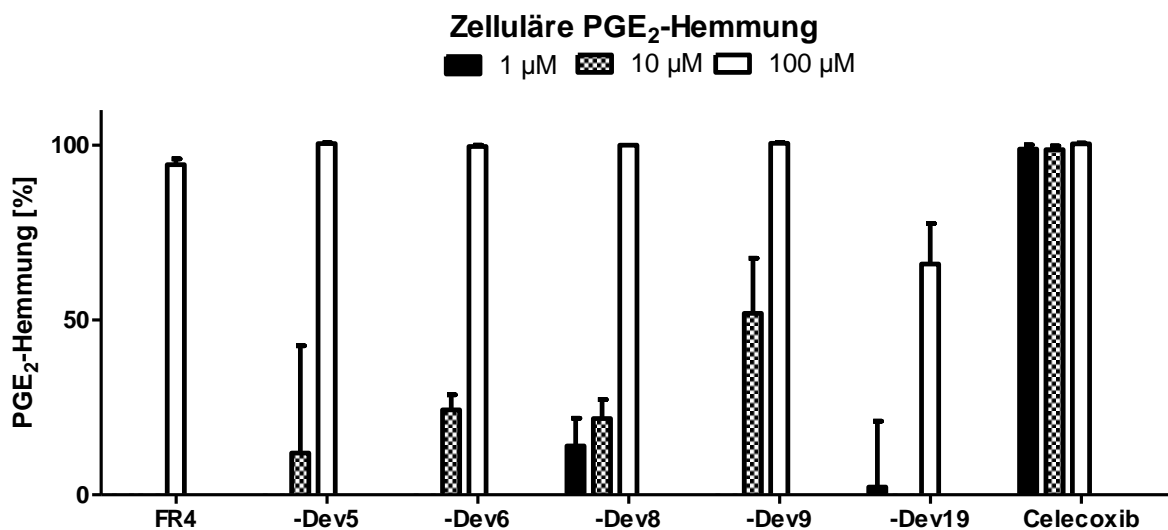


**Abbildung 5:** Zellviabilitäts-Assay mit Substanzen der FR20-Serie auf stimulierten humanen HeLa-Zellen. Angegeben ist die Zellviabilität in Prozent in Relation zur DMSO-Kontrolle mit SEM nach 24 h Inkubationsdauer ( $n \geq 3$ ).

Die Substanzen der FR20-Serie hatten bei 1  $\mu$ M keinen Einfluss auf die Zellviabilität, bei 10  $\mu$ M konnte eine Reduktion um maximal 39 % (Derivat 14) und bei 100  $\mu$ M um maximal 44 % (Derivat 14) festgestellt werden.

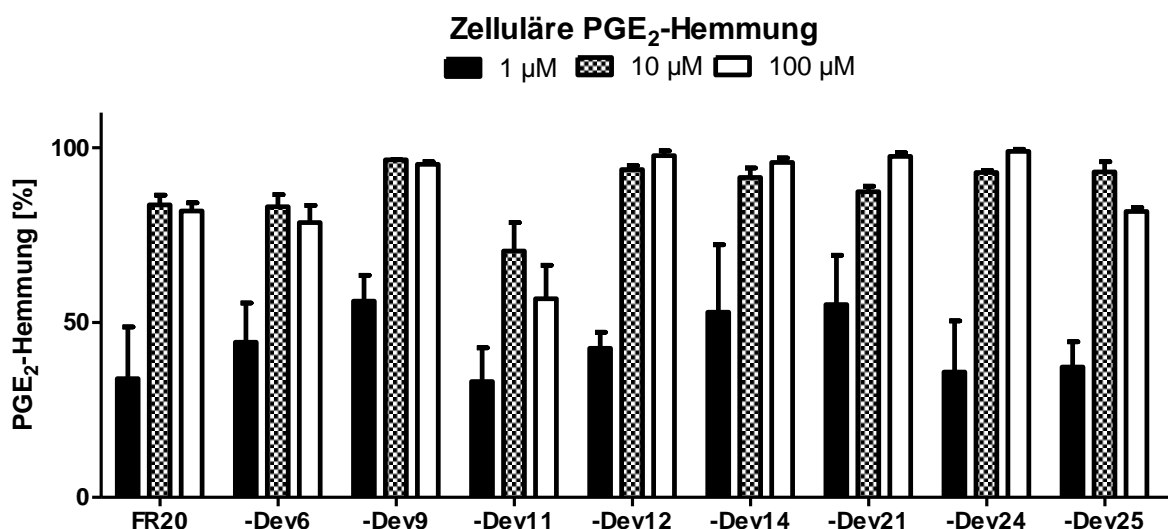
Um die Hemmung der zellulären PGE<sub>2</sub>-Synthese zu untersuchen wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe und parallel mit einem proinflammatorischen Stimulus (TNF $\alpha$  und IL1- $\beta$ ) inkubiert. Die Induktion eines inflammatorischen Szenarios ist nötig um die (entzündungsabhängige) Expression der Cyclooxygenase-2 und mPGES-1 zu erhöhen<sup>37</sup>. Die PGE<sub>2</sub>-Konzentration wurde dann mittels LC-MS/MS im Medium quantifiziert.

Keiner der getesteten Wirkstoffe der FR4-Klasse war in der Lage die zelluläre PGE<sub>2</sub>-Synthese bei 1  $\mu$ M zu hemmen. Bei einer zehnfach höheren Konzentration (10  $\mu$ M) reduzierten die Derivate 5, 6, 8 und 9 das PGE<sub>2</sub> im Medium um bis zu 48 % (FR4-Dev9). Bei 100  $\mu$ M Wirkstoff zeigten alle Substanzen eine deutliche Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese (Abbildung 6). Es wird angemerkt, dass dieser Effekt eventuell teilweise auf die cytotoxische Wirkung der Substanzen bei dieser Konzentration zurückgeführt werden kann.



**Abbildung 6:** Hemmung der zellulären PGE<sub>2</sub>-Synthese durch Wirkstoffe der FR4-Serie. PGE<sub>2</sub>-Level im Zellmedium wurden mittels LC-MS/MS gemessen. Angegeben ist das PGE<sub>2</sub>-Level in Prozent in Relation zur DMSO-Kontrolle mit SEM nach 24 h Inkubationsdauer (n ≥ 5).

Das PGE<sub>2</sub>-Level konnte durch alle Substanzen der FR20-Serie konzentrationsabhängig gehemmt werden (Abbildung 7). Bereits bei 1 µM Wirkstoff war eine etwa 40 %-ige Reduktion messbar, bei 10 µM wurde eine maximale Hemmung erreicht, die durch eine zehnfach höhere Konzentration (100 µM) nicht weiter verstärkt werden konnte.



**Abbildung 7:** Hemmung der zellulären PGE<sub>2</sub>-Synthese durch Wirkstoffe der FR20-Serie. Angegeben ist das PGE<sub>2</sub>-Level in Prozent in Relation zur DMSO-Kontrolle mit SEM nach 24 h Inkubationsdauer (n ≥ 4; FR20-Dev25: n = 2 ).



### **3.7 Einflüsse von mPGES-1-Inhibitoren auf die Arachidonsäurekaskade in humanem Vollblut**

Die Erstellung eines pharmakologischen Profils für ausgewählte Substanzen der FR4- und FR20-Wirkstoffklasse stand bei Versuchen mit humanem Vollblut im Vordergrund. Ein zentraler Indikator war die Bewertung der Wirksamkeit in einem komplexen System unter verschiedenen (physiologischen) Einflüssen. Daneben sollten in diesen Versuchen Hinweise zur Selektivität gegenüber anderen Enzymen der Arachidonsäurekaskade gesammelt werden, um mögliche Nebenwirkungen bzw. Synergien erkennen zu können.

Dazu wurden drei verschiedene Szenarien gewählt:

- (i) COX-1 vermittelte Prostanoid-Synthese (hauptsächlich TXA<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub>),
- (ii) COX-2 vermittelte Prostanoid-Synthese (vor allem PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub>) und
- (iii) Leukotriene/HETE-Synthese.

Insbesondere während der Hämostase werden über den COX-1/Thromboxan A Synthase 1-Pfad große Mengen des Prostanoids TXA<sub>2</sub> gebildet. Daher wurde humanes Vollblut ohne Antikoagulation mit den Wirkstoffen bei 37 °C inkubiert, um die Thrombozyten-Aggregation zu stimulieren. Anstelle des instabilen TXA<sub>2</sub> wurde der stabile Metabolit TXB<sub>2</sub> mittels LC-MS/MS gemessen. Daneben wurde eine leichte Steigerung der PGD<sub>2</sub>-Synthese festgestellt. Zur Veranschaulichung wurden in allen Abbildungen zu den Vollblutversuchen die verbleibende Restaktivität in Prozent der Vehikel-Kontrolle (korrigiert um das Hintergrundrauschen) für die höchste getestete Konzentration angegeben und farblich markiert. Eine Restaktivität von ≤ 67 % wurde rot markiert und entspricht einer Hemmung der Produktion dieser Fettsäure, Restaktivitäten zwischen 67,1 % und 132,9 % wurden gelb markiert (kein eindeutiger Effekt) und Werte ≥ 133 % wurden grün markiert und entsprechen einer Induktion.

Wie erwartet reduzierte der COX-1-selektive Kontrollwirkstoff SC-560 sowohl das TXB<sub>2</sub>- als auch das PGD<sub>2</sub>-Level. Keine Substanz der FR4-Klasse beeinflusste das TXB<sub>2</sub>-Level (Tabelle 9), die Derivate 5 und 9 reduzierten das PGD<sub>2</sub>-Level deutlich. Keine Substanz der FR20-Klasse beeinflusste das TXB<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub>-Level (Tabelle 10).

**Tabelle 9:** Einflüsse von Benzolsulfonamid-Substanzen auf die COX-1-vermittelte TXB<sub>2</sub>- und PGD<sub>2</sub>-Synthese.

Vollblut COX-1 Assay Substanz / Konzentration	TXB <sub>2</sub>		PGD <sub>2</sub>	
	Restaktivität [%]	SEM [%] n	Restaktivität [%]	SEM [%] n
SC-560 5 µM	↓ 0.2	0.1 11	↓ 6.9	7.1 11
FR4 100 µM	⇒ 90.0	2.6 6	⇒ 89.2	10.8 3
FR4-Dev5 100 µM	⇒ 85.2	7.0 6	↓ 48.5	1.7 3
FR4-Dev6 100 µM	⇒ 83.6	11.7 6	⇒ 109.9	10.3 3
FR4-Dev8 100 µM	⇒ 110.3	13.3 6	⇒ 108.8	17.8 3
FR4-Dev9 100 µM	⇒ 92.4	11.4 6	↓ 61.5	22.2 3
FR4-Dev19 100 µM	⇒ 97.8	11.2 6	⇒ 73.4	17.4 3

**Tabelle 10:** Einflüsse von Quinazolinon-Substanzen auf die COX-1-vermittelte TXB<sub>2</sub>- und PGD<sub>2</sub>-Synthese.

Vollblut COX-1 Assay Substanz / Konzentration	TXB <sub>2</sub>		PGD <sub>2</sub>	
	Restaktivität [%]	SEM [%] n	Restaktivität [%]	SEM [%] n
FR20 10 µM	⇒ 90.0	7.5 5	⇒ 98.5	8.8 5
FR20-Dev6 10 µM	⇒ 97.3	5.9 6	⇒ 96.1	10.8 5
FR20-Dev9 10 µM	⇒ 89.0	6.1 6	⇒ 91.7	22.2 6
FR20-Dev11 10 µM	⇒ 86.4	3.8 5	⇒ 84.9	14.3 5
FR20-Dev12 10 µM	⇒ 90.4	4.1 6	⇒ 86.5	9.5 6
FR20-Dev14 10 µM	⇒ 86.1	0.9 6	⇒ 89.0	10.1 6
FR20-Dev21 10 µM	⇒ 84.4	3.6 6	⇒ 89.4	15.8 6
FR20-Dev24 10 µM	⇒ 81.9	3.7 6	⇒ 128.3	37.6 6

Zentraler Parameter der Vollblutversuche war das PGE<sub>2</sub>-Level, da dieses durch mPGES-1-Hemmer reduziert werden sollte. Die basale Expression der beteiligten Enzyme COX-2 und mPGES-1 ist in humanem Blut sehr niedrig. Während einer pathophysiologischen Situation (z. B. bei einer Entzündung) wandern Immunzellen aus dem Blut in das betroffene Gewebe. Dazu sind proinflammatorische Mediatoren wie das von der COX/mPGES-1 gebildete PGE<sub>2</sub> nötig.

Ein solches pathophysiologisches Szenario wurde durch die Zugabe von LPS zum Blut erzeugt. LPS sind Bestandteile der Zellmembran gramnegativer Bakterien und wirken als Antigen, wodurch das Immunsystem eine Infektion erkennt. Als Folge kann unter anderem ein starker Anstieg des PGE<sub>2</sub>-Levels beobachtet werden. Zusätzlich wurde ein erhöhtes PGF<sub>2α</sub>-Level gemessen, weshalb Einflüsse auf diese Fettsäure ebenfalls untersucht wurden.

Der COX-2-selektive Hemmer Celecoxib reduzierte effektiv sowohl das PGE<sub>2</sub>, wie auch das PGF<sub>2α</sub>-Level. Vier der getesteten neun Benzolsulfonamide waren in der Lage das PGE<sub>2</sub>-Level um mindestens 33 % zu reduzieren, wenn auch eine Tendenz bei drei weiteren Substanzen erkennbar ist (Tabelle 11). Die auf

isoliertem mPGES-1-Enzym und auf humanen Zellen hochpotente Substanz FR4-Dev9 reduzierte das PGE<sub>2</sub>-Level nur um 11 %. Die stärkste Hemmung zeigte FR4-Dev6 (39 % Restaktivität). Alle getesteten FR4-Derivate hatten keinen Einfluss auf das PGF<sub>2α</sub>-Level.

**Tabelle 11:** Einflüsse von Benzolsulfonamid-Substanzen auf die COX-2-vermittelte PGE<sub>2</sub>- und PGF<sub>2α</sub>-Synthese.

Vollblut COX-2 Assay Substanz / Konzentration	PGE <sub>2</sub>		PGF <sub>2α</sub>	
	Restaktivität [%]	SEM [%] n	Restaktivität [%]	SEM [%] n
Celecoxib 5 µM	↓ 5.3	0.7 30	↓ 3.4	1.7 30
FR4 100 µM	⇒ 74.4	2.2 6	⇒ 106.8	26.1 6
FR4-Dev4 100 µM	⇒ 83.3	8.9 6	⇒ 117.0	6.1 6
FR4-Dev5 100 µM	⇒ 66.8	4.3 6	⇒ 86.8	4.0 6
FR4-Dev6 100 µM	↓ 39.0	8.9 9	⇒ 113.6	13.5 8
FR4-Dev7 100 µM	⇒ 68.0	3.7 6	⇒ 129.0	7.9 6
FR4-Dev8 100 µM	↓ 61.2	5.2 6	⇒ 90.9	7.1 6
FR4-Dev9 100 µM	⇒ 88.7	9.5 6	⇒ 92.5	7.7 6
FR4-Dev19 100 µM	↓ 62.8	2.8 6	⇒ 116.7	43.8 6
FR4-Dev28 100 µM	⇒ 69.7	5.3 6	⇒ 117.0	5.4 6

Die Substanzen der FR20-Serie hemmten die PGE<sub>2</sub>-Synthese um bis zu 66 % (FR20-Dev14), mit Ausnahme von Derivat 6, welches sowohl das PGE<sub>2</sub>-, wie auch das PGF<sub>2α</sub>-Level stark erhöhte (Tabelle 12). Eine mögliche Kreuzreaktivität mit der Prostaglandin F-Synthase konnte in diesem Szenario nicht beobachtet werden, da das COX-2-vermittelte PGF<sub>2α</sub>-Level nicht verändert wurde.

**Tabelle 12:** Einflüsse von Quinazolinon-Substanzen auf die COX-2-vermittelte PGE<sub>2</sub>- und PGF<sub>2α</sub>-Synthese.

Vollblut COX-2 Assay Substanz / Konzentration	PGE <sub>2</sub>		PGF <sub>2α</sub>	
	Restaktivität [%]	SEM [%] n	Restaktivität [%]	SEM [%] n
FR20 100 µM	↓ 51.2	2.0 6	⇒ 94.2	5.9 6
FR20-Dev6 100 µM	↑ 173.8	18.0 6	↑ 234.0	34.5 6
FR20-Dev9 100 µM	↓ 50.0	4.9 6	⇒ 92.5	10.1 6
FR20-Dev11 100 µM	↓ 52.1	7.1 6	⇒ 92.6	7.0 6
FR20-Dev12 100 µM	↓ 37.4	4.5 6	⇒ 81.3	10.3 6
FR20-Dev14 100 µM	↓ 34.2	1.7 6	⇒ 73.4	7.2 6
FR20-Dev21 100 µM	↓ 54.7	1.5 6	⇒ 97.0	8.3 6
FR20-Dev24 100 µM	↓ 53.0	5.8 6	⇒ 93.8	10.6 6

Im dritten Szenario sollten Einflüsse auf eine weitere umfangreiche Kaskade des Arachidonsäurestoffwechsels untersucht werden - den Leukotrienen. Insbesondere LTB<sub>4</sub> wird eine zentrale proinflammatorische Rolle bei Asthma

bronchiale zugeschrieben. Kreuzreaktivitäten mit dieser Kaskade sind auch deshalb nicht unwahrscheinlich, weil eines der beteiligten Enzyme (FLAP) zur gleichen Enzymfamilie (MAPEG) gehört wie die mPGES-1 und strukturelle Ähnlichkeiten aufweist.

In diesem Versuch wurde zum Blut Calcium-Ionophor gegeben, welches die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöht und damit die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) aktiviert. Diese katalysiert die Produktion der Arachidonsäure, welche das Substrat für die Prostanoid-Synthese darstellt, aber auch für die Leukotriene. Neben dem therapeutisch wichtigen Leukotrien B<sub>4</sub> wurden auch die Level von 5(S)-HETE, 12(S)-HETE, 15(S)-HETE, (±)11-HETE und 20-HETE im Blutplasma detektiert. Die letzten beiden Fettsäuren waren nicht bei jedem Versuch in ausreichender Präzision detektierbar.

Eine Hemmung durch die zugegebenen Wirkstoffe konnte daher nur für die FR20-Serie berechnet werden. Als Kontrollsubstanz wurde der 5-Lipoxygenase-Hemmer Zileuton eingesetzt. Durch die Hemmung der 5-LOX sollte die Synthese von 5-HPETE (aus der Arachidonsäure) unterbunden werden. 5-HPETE wird dann zu LTA<sub>4</sub> und 5-HETE umgesetzt, wobei physiologisch hauptsächlich 5(S)-HETE gebildet wird. Das instabile LTA<sub>4</sub> wird direkt in die stabilere Form LTB<sub>4</sub> umgewandelt. Im Versuch wurde das Level an LTB<sub>4</sub> und 5(S)-HETE wie erwartet deutlich reduziert, nicht aber 12(S)-HETE und 15(S)-HETE.

Die beiden Benzolsulfonamid-Derivate 6 und 8 reduzierten sowohl das Level an LTB<sub>4</sub> als auch 5(S)-HETE. Derivat 5 zeigte eine Induktion des LTB<sub>4</sub>-Levels und eine tendenzielle Steigerung der 5(S)-HETE-Synthese. Keine der getesteten Substanzen hatte einen Einfluss auf 12(S)- und 15(S)-HETE.

**Tabelle 13:** Wirkung von Benzolsulfonamid-Substanzen auf die Calcium-Ionophor-induzierte Bildung von Leukotrienen. Zileuton wurde als Kontrollsubstanz verwendet.

Vollblut Leukotrien Assay Substanz / Konzentration	LTB <sub>4</sub>		5(S)-HETE	
	Restaktivität [%]	SEM [%] n	Restaktivität [%]	SEM [%] n
Zileuton 5 µM	↓ 25.7	2.3 21	↓ 27.1	2.6 21
FR4 100 µM	⇨ 110.2	14.7 6	⇨ 120.5	13.1 6
FR4-Dev5 100 µM	↑ 140.5	27.3 6	⇨ 125.0	18.5 6
FR4-Dev6 100 µM	↓ 60.4	3.5 6	↓ 65.6	2.6 6
FR4-Dev8 100 µM	↓ 47.0	4.9 6	↓ 56.2	3.1 6
FR4-Dev9 100 µM	⇨ 90.8	10.2 6	⇨ 98.7	8.2 6
FR4-Dev19 100 µM	⇨ 123.9	20.0 6	⇨ 120.7	14.6 6
FR4-Dev28 100 µM	⇨ 75.7	12.1 6	⇨ 75.9	8.5 6

Vollblut Leukotrien Assay Substanz / Konzentration	12(S)-HETE		15(S)-HETE	
	Restaktivität [%]	SEM [%] n	Restaktivität [%]	SEM [%] n
Zileuton 5 µM	⇨ 101.3	5.9 21	⇨ 104.4	5.7 21
FR4 100 µM	⇨ 91.0	3.1 6	⇨ 100.2	6.6 6
FR4-Dev5 100 µM	⇨ 87.5	4.0 6	⇨ 104.2	4.3 6
FR4-Dev6 100 µM	⇨ 94.5	4.1 6	⇨ 78.8	3.5 6
FR4-Dev8 100 µM	⇨ 78.9	7.6 6	⇨ 76.5	3.0 6
FR4-Dev9 100 µM	⇨ 86.6	15.3 6	⇨ 98.0	13.1 6
FR4-Dev19 100 µM	⇨ 96.6	2.1 6	⇨ 110.5	5.8 6
FR4-Dev28 100 µM	⇨ 88.1	6.7 6	⇨ 98.8	5.4 6

Für die Substanzen der FR20-Serie wurden nur sehr wenige Auswirkungen auf die Leukotrien-Kaskade beobachtet. Derivat FR20-Dev6 induzierte - wie schon die Prostanoiden PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> - auch das Level von LTB<sub>4</sub> und 5(S)-HETE. Es wurden keine Einflüsse der Substanzen auf die Fettsäuren 12(S)-, 15(S)- und (±)-11-HETE beobachtet, allerdings wurde für die Derivate 9, 11 und 24 eine hemmende Wirkung auf 20-HETE festgestellt.

**Tabelle 14:** Wirkung von Quinazolinon-Substanzen auf die Calcium-Ionophor-induzierte Bildung von Leukotrienen.

Vollblut Leukotrien Assay Substanz / Konzentration	LTB <sub>4</sub>		5(S)-HETE	
	Restaktivität [%]	SEM [%] n	Restaktivität [%]	SEM [%] n
FR20 10 µM	⇨ 83.0	4.5 9	⇨ 79.0	2.8 9
FR20-Dev6 10 µM	↑ 150.8	16.0 9	↑ 157.4	20.1 9
FR20-Dev9 10 µM	⇨ 70.9	6.8 9	↓ 67.0	6.2 9
FR20-Dev11 10 µM	⇨ 71.9	7.7 9	⇨ 74.8	7.2 9
FR20-Dev12 10 µM	⇨ 93.7	9.0 9	⇨ 92.0	9.8 9
FR20-Dev14 10 µM	⇨ 91.3	3.5 9	⇨ 88.1	3.5 9
FR20-Dev21 10 µM	⇨ 94.1	5.0 9	⇨ 92.1	5.0 9
FR20-Dev24 10 µM	⇨ 72.7	7.7 9	⇨ 74.4	7.6 9

Vollblut Leukotrien Assay Substanz / Konzentration	12(S)-HETE			15(S)-HETE				
	Restaktivität [%]	SEM [%]	n	Restaktivität [%]	SEM [%]	n		
FR20 10 µM	⇒	80.0	3.5	9	⇒	83.1	5.7	9
FR20-Dev6 10 µM	⇒	93.2	10.3	9	⇒	93.8	8.2	9
FR20-Dev9 10 µM	⇒	85.5	8.2	9	⇒	80.0	9.0	9
FR20-Dev11 10 µM	⇒	109.5	8.8	9	⇒	94.2	10.3	9
FR20-Dev12 10 µM	⇒	92.8	10.8	9	⇒	90.3	12.2	9
FR20-Dev14 10 µM	⇒	82.7	3.7	9	⇒	78.3	9.4	9
FR20-Dev21 10 µM	⇒	123.0	19.3	9	⇒	110.6	10.4	9
FR20-Dev24 10 µM	⇒	88.9	18.5	9	⇒	83.4	9.9	9

Vollblut Leukotrien Assay Substanz / Konzentration	(±)11-HETE			20-HETE				
	Restaktivität [%]	SEM [%]	n	Restaktivität [%]	SEM [%]	n		
FR20 10 µM	⇒	76.8	6.8	6	⇒	72.9	3.6	3
FR20-Dev6 10 µM	⇒	85.2	9.0	6	⇒	124.8	13.7	3
FR20-Dev9 10 µM	⇒	77.0	11.9	6	↓	52.6	5.2	3
FR20-Dev11 10 µM	⇒	84.8	17.4	6	↓	66.1	4.5	3
FR20-Dev12 10 µM	⇒	71.6	12.5	6	⇒	67.4	4.0	3
FR20-Dev14 10 µM	⇒	75.4	12.4	6	⇒	79.6	6.8	3
FR20-Dev21 10 µM	⇒	122.9	10.8	6	⇒	83.1	13.1	3
FR20-Dev24 10 µM	⇒	86.5	18.3	6	↓	46.9	11.4	3

### 3.8 Wirkstoffformulierung (Galenik)

Für die Applikation von Wirkstoffen musste eine geeignete Wirkstoffformulierung entwickelt werden. Diese steht in direktem Zusammenhang mit der Applikationsroute. Für alle Untersuchungen an Mäusen wurden die beiden Verabreichungsformen peroral (p. o.) und intraperitoneal (i. p.) gewählt. Die perorale Gabe entspricht einer oralen Gabe von beispielsweise Tabletten oder Säften beim Menschen, während die intraperitoneale Darreichungsform eine parenterale Gabe (z. B. intravenöse Injektion) widerspiegelt. In der Galenik gibt es verschiedene Zielparameter, wie Löslichkeit, Verträglichkeit, Stabilität, Aufwand, Kosten der Herstellung usw. Für eine *in vivo* Applikation wurde die Substanz FR4-Dev6 ausgewählt. Sie hemmt die humane und murine mPGES-1 konzentrationsabhängig in verschiedenen enzymatischen und zellulären Modellen, zeigt eine niedrige Toxizität und konnte in ausreichender Menge synthetisiert werden. An die Formulierung für die Testsubstanz FR4-Dev6 wurden folgende Anforderungen gestellt (alle bezogen auf die Applikation an Mäusen):

#### 1. Löslichkeit:

Für die perorale und intraperitoneale Gabe bei Mäusen gibt es Empfehlungen für ein geeignetes Volumen von 10 - 20 mL/kg p. o. bzw. 10 - 20 mL/kg i. p.<sup>109-111</sup>. Da zwei Dosen von 10 mg/kg Körpergewicht (KG) und 100 mg/kg KG verabreicht werden sollten und Tiere mit etwa 25 g Gewicht und einem Applikationsvolumen von 200 µL je 25 g KG (8 µL/1g) eingesetzt werden sollten, wurde die minimal erforderliche Löslichkeit in einem einzelnen Lösungsmittel auf 12,5 mg/mL festgelegt.

#### 2. Verträglichkeit:

Die Formulierung sollte möglichst verträglich sein, also per se keine akuten Nebenwirkungen auslösen. Geeignete Lösungsmittel und Dosen für die nicht-klinische Anwendung in verschiedenen Spezies wurden von Shayne et al. und Neervannan<sup>111-112</sup> zusammengefasst.

#### 3. Multiple Applikationsformen:

Wenn möglich sollte die Formulierung sowohl eine perorale als auch eine intravenöse oder intraperitoneale Anwendung erlauben. Eine topische Anwendungsform wurde nicht angestrebt.

#### 3. Viskosität:

Die gewählten Applikationsformen erfordern eine Viskosität, die eine Injektion bzw. Gabe per Schlundsonde ermöglicht. Insbesondere hochviskose Vehikel wie Öle können nur in Kombination mit einem niedrigviskosen Lösungsmittel eingesetzt werden.

#### 4. Sterilisierbarkeit:

Die eingesetzten Lösungsmittel sollten mittels gängiger Sterilisationsmethoden behandelbar sein, also entweder temperaturstabil oder sterilfiltrierbar sein.

Die Löslichkeit von FR4-Dev6 wurde für folgende Lösungsmittel durch Verdünnungsreihen abgeschätzt:

**Tabelle 15:** Löslichkeit von FR4-Dev6 in verschiedenen Arzneiträgerstoffen und Lösungsmitteln mit Angabe der jeweiligen dynamischen Viskosität. Die Viskosität wurde den entsprechenden Datenblättern oder Internetquellen entnommen.

Lösungsmittel	Dynamische Viskosität [mPa·s]	Löslichkeit von FR4-Dev6 [mg/mL]
H <sub>2</sub> O	0,891 (25 °C)	< 1
0,9% NaCl-Lösung	-	< 1
PBS	-	< 1
DMSO	2,14	≥ 250 < 300
Sonnenblumenöl	49 (25 °C)	< 1
Maiskaimöl (corn oil)	52,3 (23,9 °C)	< 1
Miglyol 812 N	30	< 1
Isopropylmyristat (IPM)	5-6 (20 °C)	< 2,5
Capmul MCM EP	-	< 1
Captex 200P	8-9 (25 °C)	< 1
Captex 355 EP/NF	25-33 (25 °C)	< 1
Tween 20	400 (25 °C)	≥ 2,5 < 5
Tween 80	425 (25 °C)	≥ 1 < 2,5
Span 20	-	< 5
Span 80	1000 (25 °C)	< 5
Cremophor EL	650-800 (25 °C)	≥ 10 < 15
PEG-200	53-62 (20 °C)	≥ 5 < 10
PEG-400	97-110 (20 °C)	≥ 1 < 2,5
Propylenglykol	60 (20 °C)	< 1
Ethylbutyrat	0,71 (15 °C)	≥ 1 < 2,5
1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)	1,65 (25 °C)	≥ 150 < 300
Ethanol	1,074 (25 °C)	≥ 5 < 10
Methanol	0,544 (25 °C)	≥ 5 < 10
Ethylacetat	0,45 (20 °C)	≥ 10 < 15

Die Testsubstanz FR4-Dev6 ist "sehr schwer oder praktisch unlöslich" (nach der verbalen Einstufung der Löslichkeit nach Europäischem Arzneibuch) in wässrigen Lösungsmitteln wie H<sub>2</sub>O oder isotonischer Kochsalzlösung (Tabelle 15). Damit entfällt einer der wichtigsten Arzneistoffträger für die Anwendung *in vivo*. Auch für den Alkohol Ethanol konnte nur eine schwere Löslichkeit festgestellt werden. Die galenisch weit verbreiteten Polyethylenglykole zeigten ebenfalls keine stärkeren Lösungsmittelleigenschaften. Verschiedene Öle, sowie



kommerzielle mittelkettige Glyceride (Capmul MCM EP, Captex 355 EP/NF, Miglyol 812 N) und Propylenglykolester (Captex 200P), wurden als lipophile Trägerstoffe untersucht, konnten die Testsubstanz aber nur sehr schwer oder praktisch gar nicht lösen. Verschiedene Emulgatoren wie Tween oder Span können die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit oder die Grenzflächenspannung zwischen zwei Phasen herabsetzen und damit eine Dispersion vermitteln. Die getesteten Emulgatoren konnten die Testsubstanz selbst nur wenig lösen (Cremophor EL). Eine Mischung mit einem wässrigen Lösungsmittel fällte die Testsubstanz in der Regel aus, während eine Mischung mit lipophilen Lösungsmitteln eine zu niedrige Gesamtlöslichkeit zeigte oder die Viskosität für eine Injektion zu hoch war.

Die größte Löslichkeit wurde mit aprotisch-unpolaren Lösungsmitteln wie DMSO und NMP beobachtet.

DMSO ist in der nicht-klinischen Anwendung an Mäusen in hohen Dosen bis 5 mL/kg oral (4 Wochen) und sogar 10 mL/kg intraperitoneal (3 Tage) gut verträglich<sup>112</sup>. NMP ist ebenfalls oral ( $LD_{50}$  von 5130 mg/kg) und intraperitoneal ( $LD_{50}$  von 3050 mg/kg) gut verträglich<sup>113</sup>, zeigt bei intravenöser Anwendung allerdings eine deutlich erhöhte Toxizität ( $LD_{50}$  von 54.5 mg/kg)<sup>114</sup>.

Da DMSO in hohen Dosen zahlreiche Nebenwirkungen zeigt<sup>115</sup>, wurde eine Formulierung entwickelt, in der die DMSO-Konzentration möglichst niedrig ist. Verschiedene Mischungen mit mittelkettigen Triglyceriden aus fraktioniertem Kokosnussöl (Miglyol 812 N) und DMSO wurden hergestellt. Dabei wurde festgestellt, dass DMSO-Volumen bis 5 % eine 1-phasige Mischung ergaben, die sich erst nach längerer Zeit (> 24 h) wieder in zwei Phasen trennte. Durch vortexen kann jederzeit wieder eine homogene Mischung erstellt werden. Miglyol ist in verschiedenen Arzneibüchern gelistet (Ph. Eur. 4.6, USP / NF 22, BP 1999, JP; Angaben laut Produktinformationen) und zeigt eine sehr niedrige Toxizität in verschiedenen Tierspezies und am Mensch, selbst bei hohen Dosen, sowie über unterschiedliche Administrationsformen hinweg<sup>116-117</sup>.

Die finale Formulierung enthielt somit die Testsubstanz FR4-Dev6, welche in 5 % v/v (des Gesamtvolumens) DMSO gelöst wurde und anschließend mit

95 % v/v (des Gesamtvolumens) Miglyol 812 verdünnt wurde. Die gewählte Formulierung wurde bereits von Tapias et al. verwendet<sup>118</sup>.

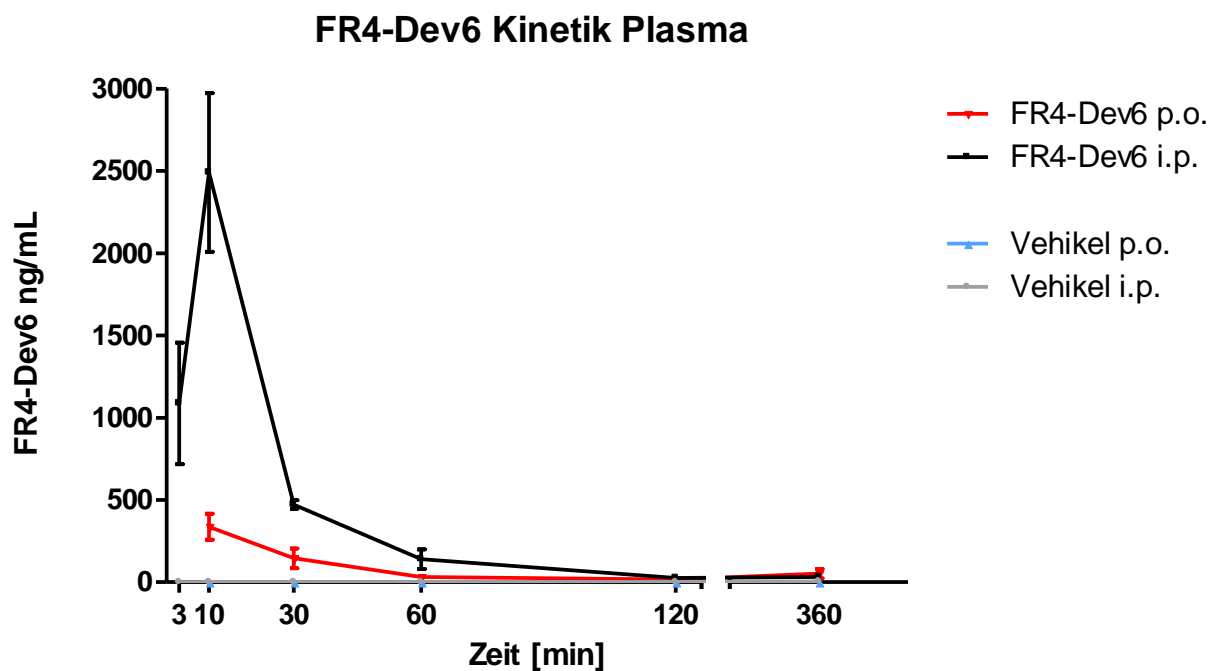
### **3.9 Pharmakokinetik von FR4-Dev6 in Mäusen**

Die Untersuchung pharmakokinetischer Aspekte ermöglicht es komplexe Auswirkungen des Körpers auf eine Testsubstanz zu ermitteln. Dazu zählen die Liberation (Freisetzung des Wirkstoffs), Absorption (Aufnahme), Distribution (Verteilung im Organismus), Metabolismus (Verstoffwechslung) und Exkretion (Ausscheidung), welche unter der englischen Abkürzung *LADME* zusammengefasst werden. Die Pharmakokinetik entscheidet maßgeblich darüber, ob, wann, wie und wo ein Wirkstoff im Körper zur Verfügung steht, was wiederum seine Pharmakodynamik determiniert.

In dieser Untersuchungsreihe sollten in Mäusen Zeit-Konzentrationsprofile der Testsubstanz FR4-Dev6 für eine Dosis von 10 mg/kg KG ermittelt werden. Eine gängige Methode ist die Messung der Substanzkonzentration im Plasmaanteil des Blutes zu definierten oder randomisierten Zeitpunkten. Um die Größe der Streuung in Abhängigkeit von der Zeit beurteilen zu können wurden definierte Zeitpunkt gewählt (3 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min und 360 min). Als Analysemethode zur Konzentrationsbestimmung wurde LC-MS/MS eingesetzt. Hierzu wurde eine eigene Messmethode etabliert (siehe Kapitel 3.2.3). Um Aussagen über die Absorption treffen zu können wurde neben einer intraperitonealen Applikation auch eine perorale Substanzgabe mittels Schlundsonde eingesetzt. Die verwendete Formulierung (siehe Kapitel 3.8) ermöglichte beide Applikationsformen. Je Applikationsform wurde außerdem eine Testgruppe mit einem äquivalenten Volumen des Vehikels (Formulierung ohne Wirkstoff) vermessen.

Die Aufnahme der Testsubstanz FR4-Dev6 aus dem Peritoneum ins Blut geschieht sehr schnell - bereits 3 Minuten nach Substanzgabe können etwa 1000 ng/mL im Blutplasma detektiert werden (Abbildung 8). Die höchste Konzentration wurde nach 10 min gemessen (2491 ng/mL), welche bereits nach 30 min auf etwa 500 ng /mL abfiel und nach zwei Stunden das Grundniveau

erreichte. Auch nach peroraler Gabe wurde eine rasche Aufnahme ins Blutplasma beobachtet. Die maximale Plasmakonzentration wurde ebenfalls nach 10 min beobachtet, erreichte aber ein deutlich niedrigeres Level, verglichen mit der intraperitonealen Applikation (337 ng/mL). Eine Rückkehr zum basalen Level erfolgt auch hier nach ein bis zwei Stunden. In beiden Kontrollgruppen wurde, wie erwartet, keine Testsubstanz im Plasma gemessen.



**Abbildung 8:** Zeit-Konzentrationsverläufe der Testsubstanz FR4-Dev6 im Blutplasma von Mäusen nach peroraler (p.o.) bzw. intraperitonealer (i.p.) Gabe. Je Zeitpunkt wurden in den FR4-Dev6 -Gruppen sechs Tiere, in den beiden Vehikel-Gruppen jeweils 3 Tiere eingesetzt. Angaben in ng Wirkstoff / mL Plasma mit SEM.

Neben der Absorption ins Blut sollte die Distribution von FR4-Dev6 in einzelne Organe überprüft werden, um mögliche Akkumulationsorte und damit potentielle Nebenwirkungen abschätzen zu können. Dazu wurden folgende Organe entnommen: Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Gehirn. Nach der Homogenisierung des Gewebes mittels Nassvermahlung wurde die Substanzkonzentration mittels LC-MS/MS gemessen.

Folgende Beobachtungen wurden bezogen auf das jeweilige Organ gemacht:

Magen (Abbildung 9):

Nach intraperitonealer Gabe konnte ein rascher Anstieg mit einem gleichzeitigem Höhepunkt der Wirkstoffkonzentration nach 3 min festgestellt werden. Dieses Level fällt jedoch rasch wieder ab und bleibt dann bis zu 6 h im Magen messbar. Nach peroraler Gabe steigt das Level ab der 30. Minute wieder und gipfelt nach 2 h bei 4000 pg/mg, um danach wieder abzufallen.

Dünndarm (Abbildung 10):

Nach intraperitonealer Gabe wurde nach 3 min eine sehr hohe Wirkstoffkonzentration von fast 12000 pg/mg gemessen, die dann rasch abfällt, aber auch nach 6 h noch messbar bleibt (> 200 pg/mg). Nach peroraler Gabe wurde ebenfalls ein kurzfristiger Anstieg auf über 1500 pg/mg festgestellt. Auch hier wurde nach mehreren Stunden noch der Wirkstoff detektiert.

Dickdarm (Abbildung 11):

Vergleichbar mit den Verläufen für Magen und Dünndarm wurde eine hohe Wirkstoffkonzentration nach intraperitonealer Gabe auch im Dickdarm bereits nach 3 - 10 min gemessen, welche nach 30 min deutlich reduziert ist und ab etwa 1 h auf einem relativ konstanten Niveau bleibt. Das höchste Level nach peroraler Gabe wurde nach einer Stunde gemessen, bleibt aber deutlich unter dem maximalen Level der intraperitonealen Applikation.

Leber (Abbildung 12):

Nach intraperitonealer Applikation wurde eine maximale Wirkstoffkonzentration bereits nach 3 Minuten in der Leber gemessen. Die Messwerte schwankten bei den kürzeren Zeitwerten (3 und 10 min) deutlich mehr als bei den längeren Werten (ab 30 min). Nach oraler Gabe wurde eine deutlich flachere Wirkstoffkurve ermittelt.

#### Lunge (Abbildung 13):

Nach peroraler Applikation wurde nach 10 min in der Lunge eine sehr hohe Wirkstoffkonzentration von über 3000 pg/mg Gewebe gemessen. Die Messwerte schwankten allerdings sehr stark. Nach intraperitonealer Gabe wurde eine deutlich flachere Wirkstoffkurve mit wesentlich geringerer Messwertstreuung ermittelt. Bereits nach einer Stunde wurde ein Abfall der Konzentration auf basales Niveau beobachtet.

#### Herz (Abbildung 14):

Im Herz wurde unabhängig von der Applikationsroute ein nahezu gleicher Zeit-Konzentrationsverlauf beobachtet. Die maximale Konzentration wurde nach 10 min mit etwa 1000 pg/mg im Herzwewebe ermittelt, die innerhalb von 2 h auf das Ausgangslevel zurückfällt.

#### Milz (Abbildung 15):

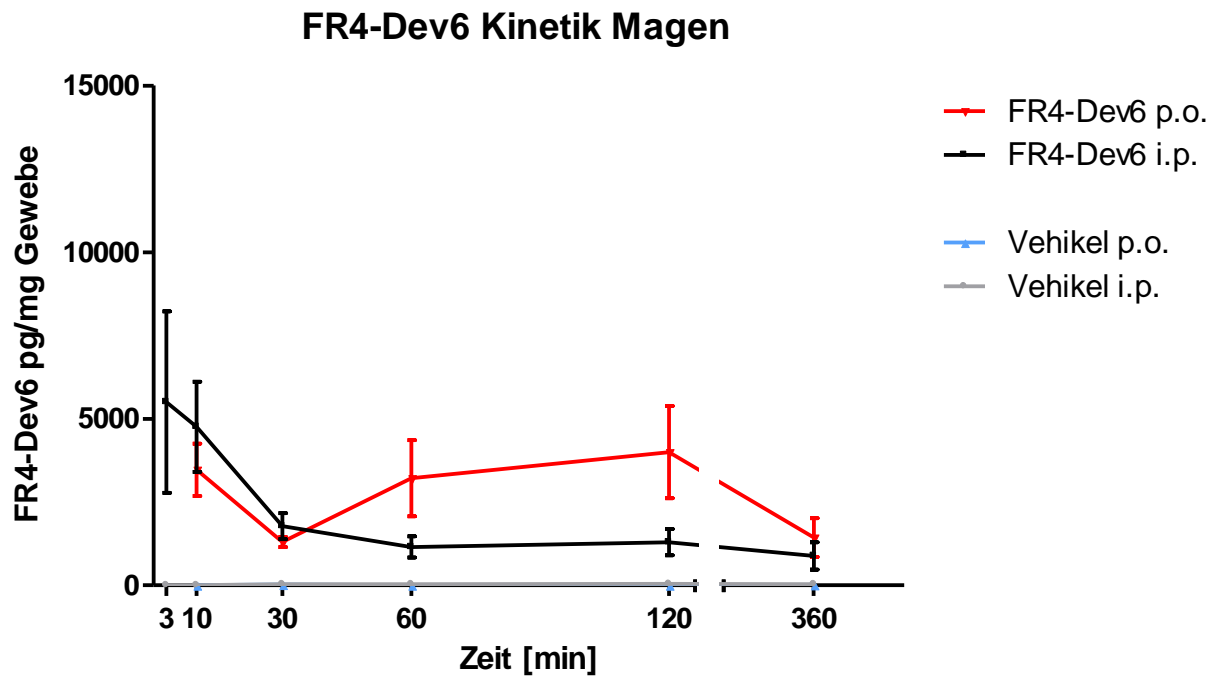
In der Milz wurden deutlich unterschiedliche Konzentrationen für die beiden Applikationsrouten ermittelt. Während nach intraperitonealen Gabe bereits nach 3 min über 6000 pg/mg Wirkstoff im Gewebe gemessen wurden, waren nach peroraler Gabe unter 200 pg/mg Wirkstoff messbar. Nach etwa einer Stunde sank die Wirkstoffkonzentration auf das basale Level.

#### Niere (Abbildung 16):

Ein rascher Anstieg der Wirkstoffkonzentration wurde auch in der Niere gemessen. Etwa 6000 pg/mg Wirkstoff in der Niere wurden 10 min nach intraperitonealer Gabe gemessen. Nach oraler Gabe wurde etwa 1/4 dieser Konzentration gemessen. Nach ein bis zwei Stunden wurde ein basales Level von etwa 250 - 500 pg/mg erreicht, welches bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt nach sechs Stunden konstant blieb - unabhängig von der Applikationsroute.

### Gehirn (Abbildung 17):

Im Vergleich zu allen anderen in diesem Versuch gemessenen Gewebekonzentrationen war die im Gehirn die Niedrigste (unter 150 pg/mg). Die maximale Konzentration wurde nach 10 min gemessen und fiel innerhalb von sechs Stunden auf das Ausgangslevel zurück. Es wurden vergleichbare Level für beide Applikationsrouten beobachtet.



**Abbildung 9:** Zeit-Konzentrationsverläufe der Testsubstanz FR4-Dev6 im Magen von Mäusen nach peroraler (p. o.) bzw. intraperitonealer (i. p.) Gabe. Je Zeitpunkt wurden in den FR4-Dev6 - Gruppen sechs Tiere, in den beiden Vehikel-Gruppen jeweils 3 Tiere eingesetzt. Angaben in pg Wirkstoff / mg Gewebe.

### FR4-Dev6 Kinetik Dünndarm

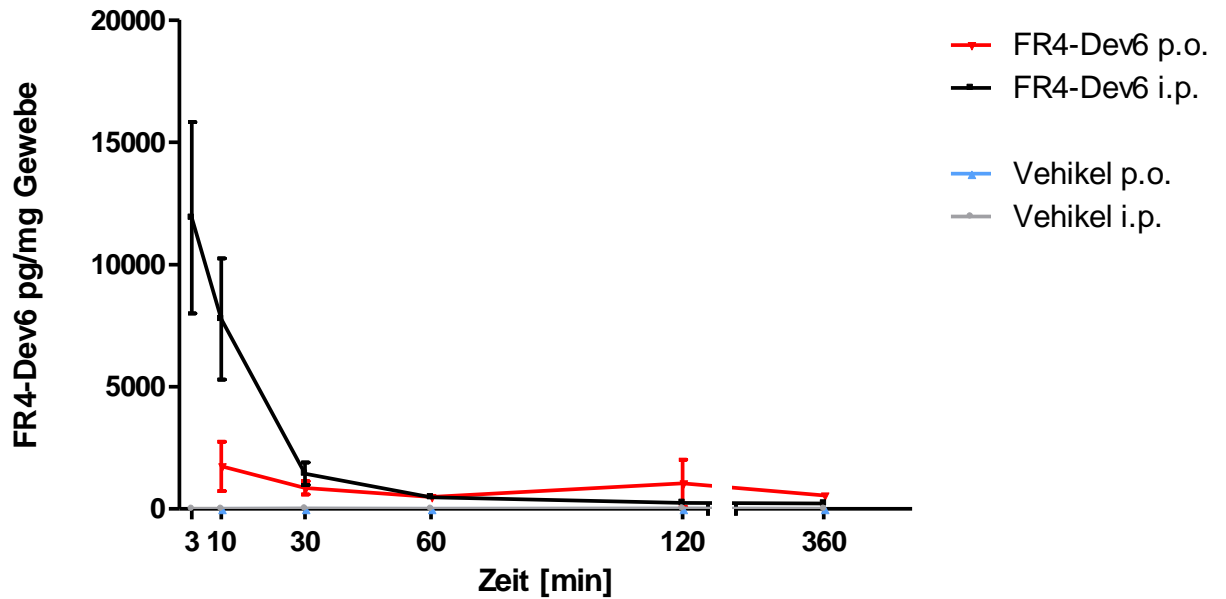


Abbildung 10: Zeit-Konzentrationsverläufe der Testsubstanz FR4-Dev6 im Dünndarm von Mäusen nach peroraler (p. o.) bzw. intraperitonealer (i. p.) Gabe.

### FR4-Dev6 Kinetik Dickdarm

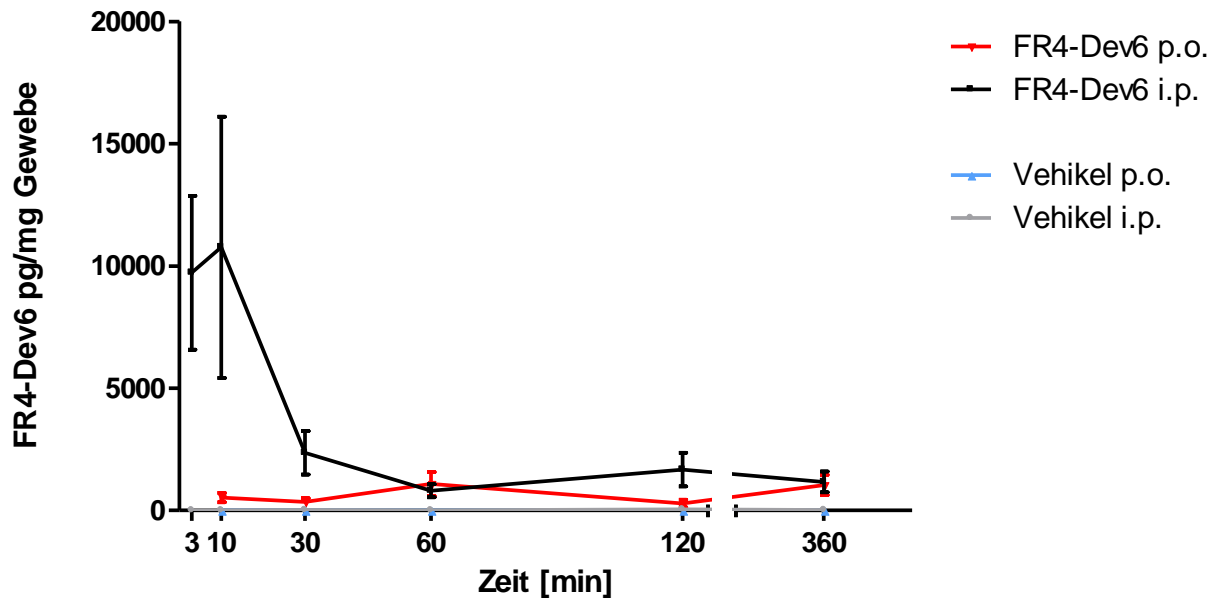
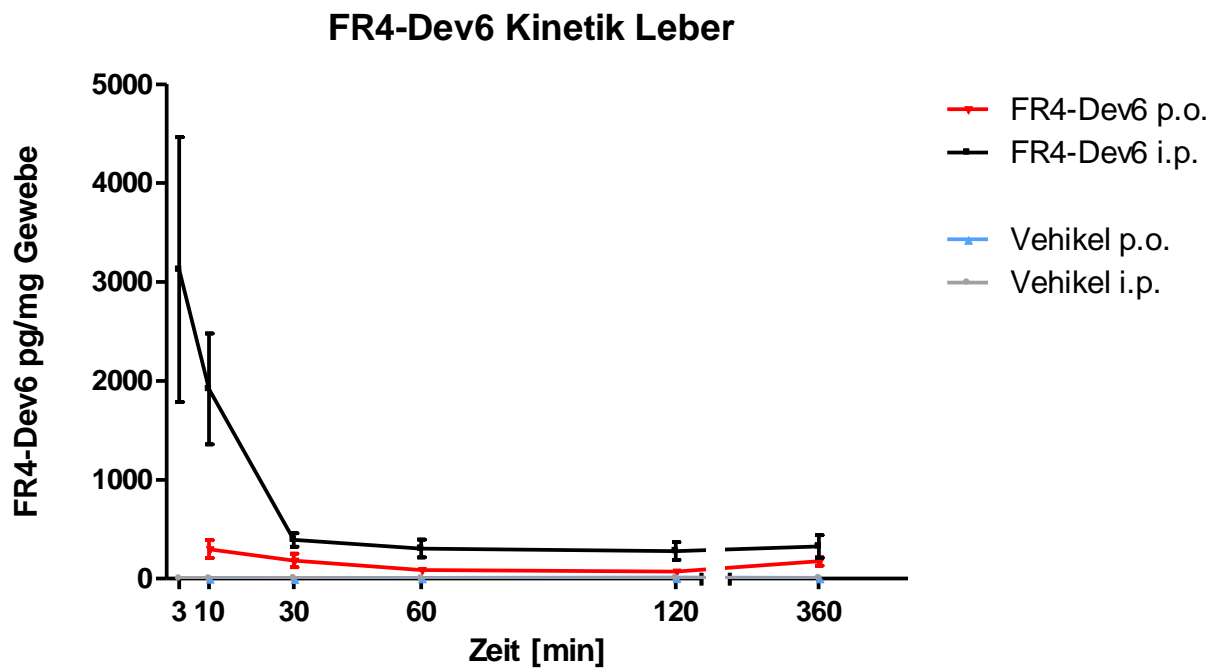
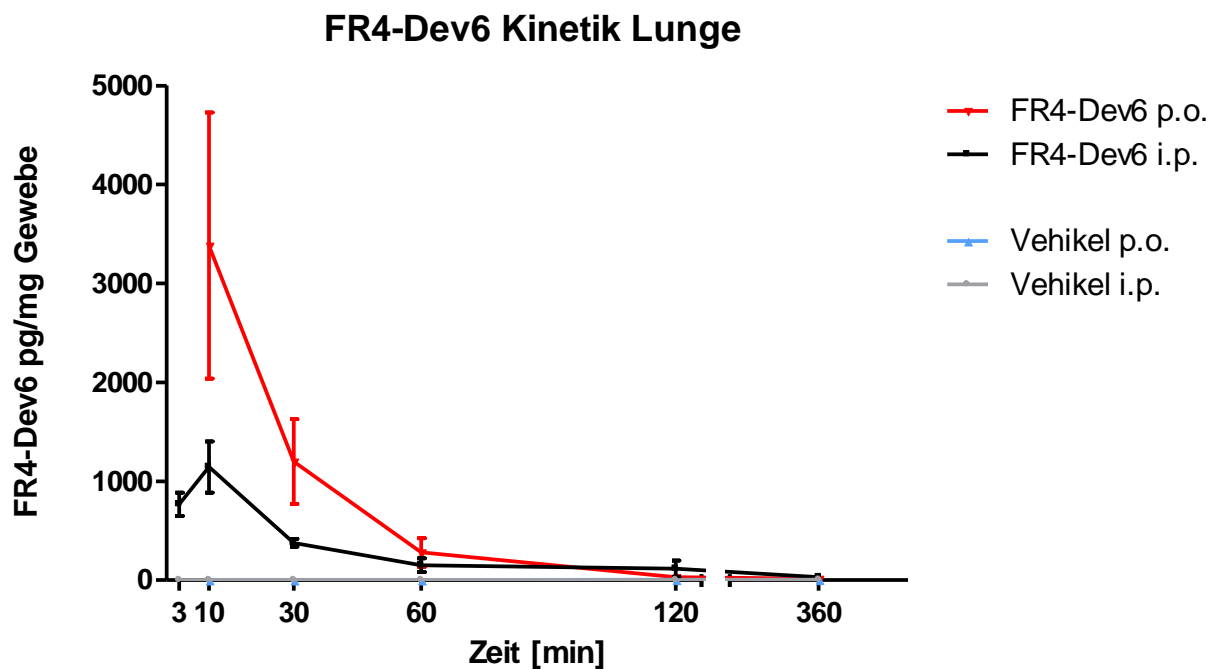


Abbildung 11: Zeit-Konzentrationsverläufe der Testsubstanz FR4-Dev6 im Dickdarm von Mäusen nach peroraler (p. o.) bzw. intraperitonealer (i. p.) Gabe.

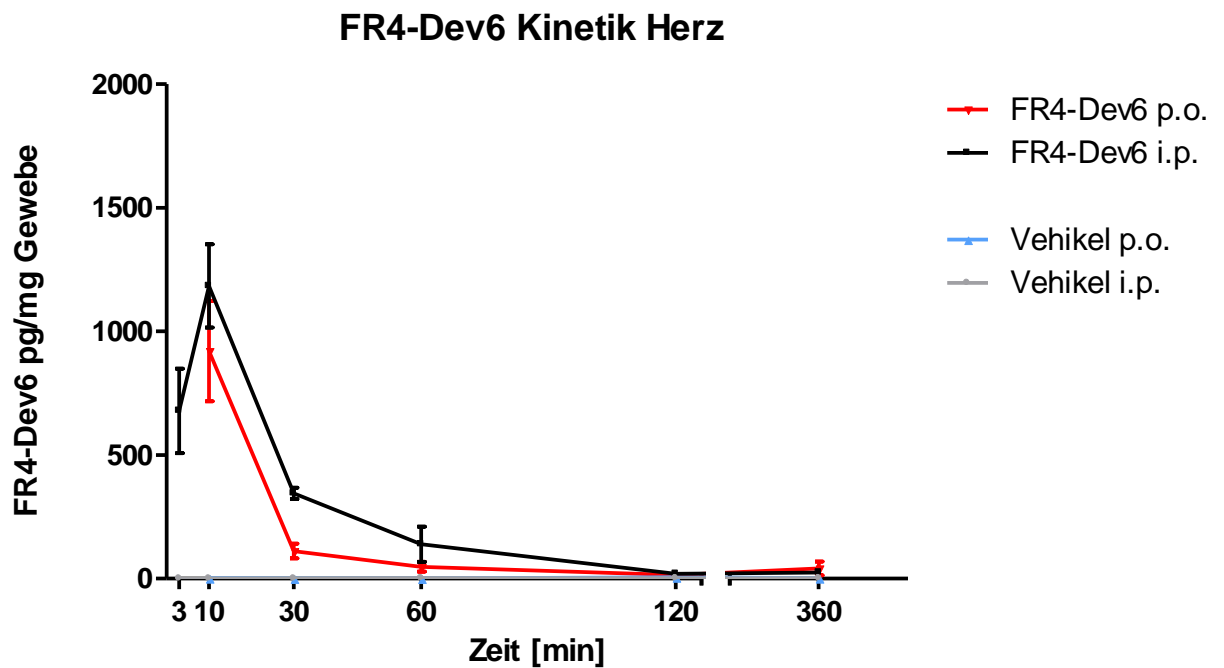


**Abbildung 12:** Zeit-Konzentrationsverläufe der Testsubstanz FR4-Dev6 in der Leber von Mäusen nach peroraler (p. o.) bzw. intraperitonealer (i. p.) Gabe.

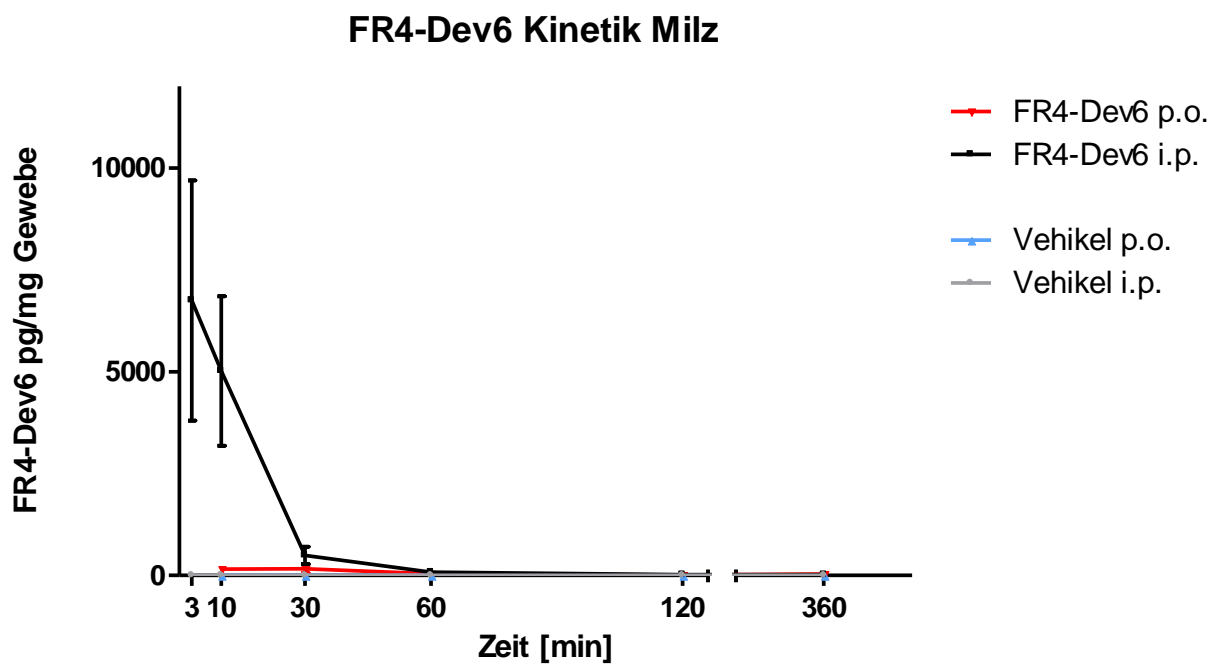


**Abbildung 13:** Zeit-Konzentrationsverläufe der Testsubstanz FR4-Dev6 in der Lunge von Mäusen nach peroraler (p. o.) bzw. intraperitonealer (i. p.) Gabe.

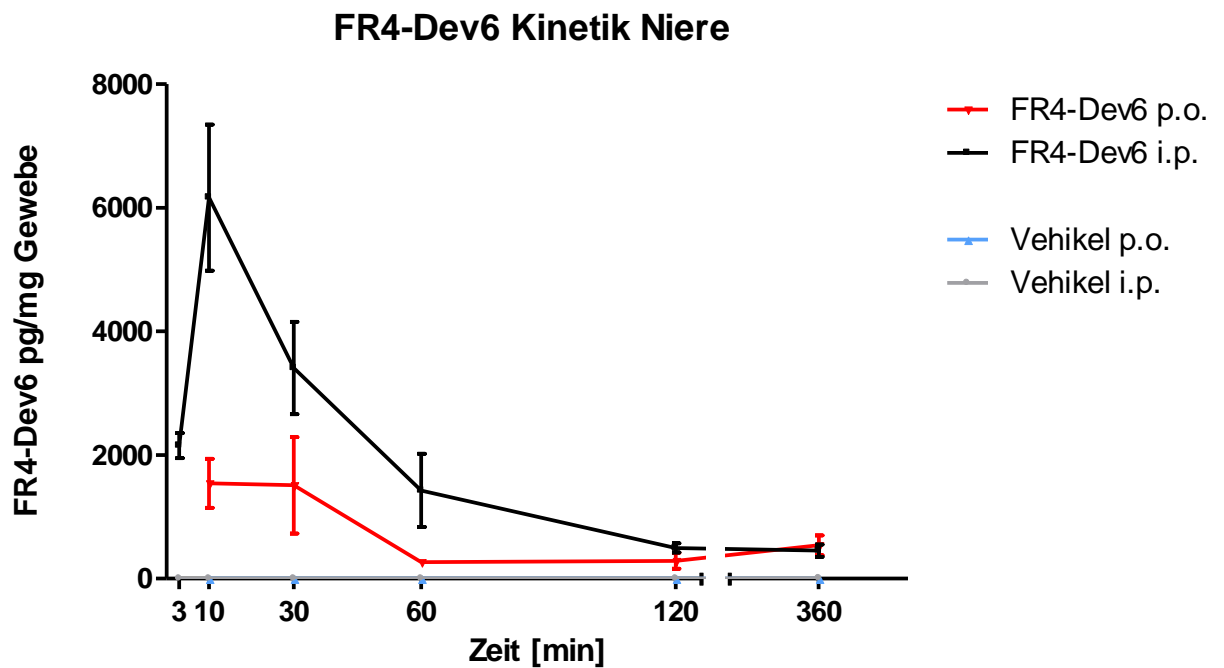




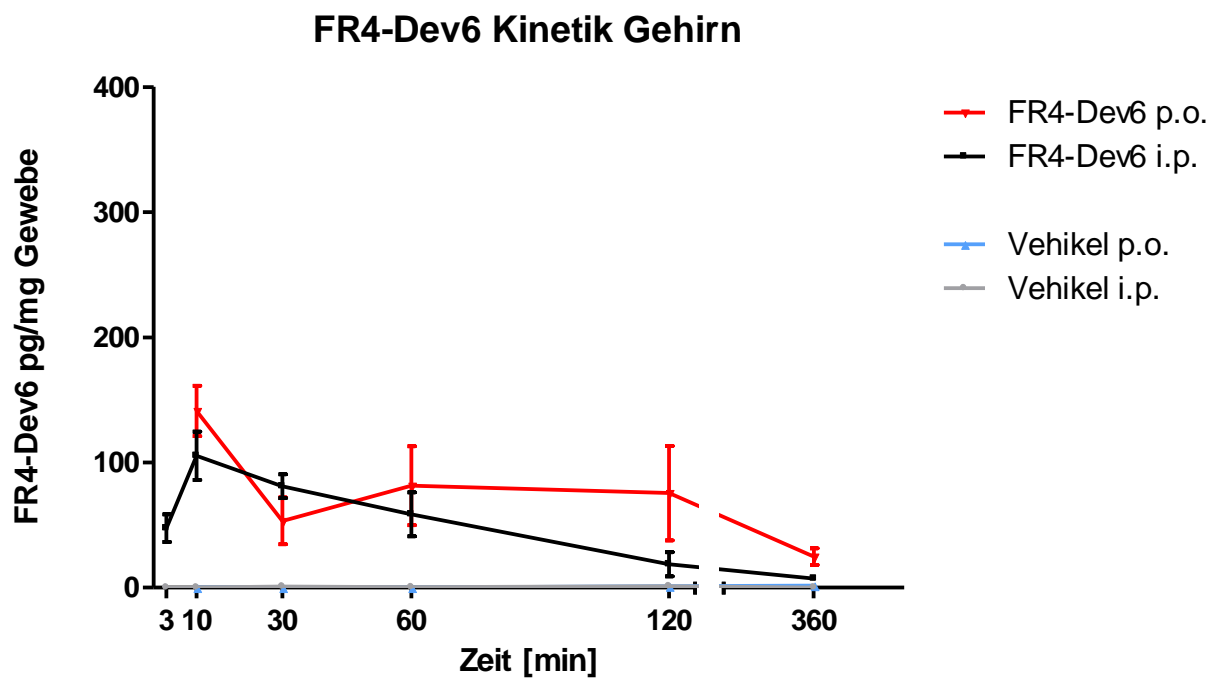
**Abbildung 14:** Zeit-Konzentrationsverläufe der Testsubstanz FR4-Dev6 im Herz von Mäusen nach peroraler (p. o.) bzw. intraperitonealer (i. p.) Gabe.



**Abbildung 15:** Zeit-Konzentrationsverläufe der Testsubstanz FR4-Dev6 in der Milz von Mäusen nach peroraler (p. o.) bzw. intraperitonealer (i. p.) Gabe.



**Abbildung 16:** Zeit-Konzentrationsverläufe der Testsubstanz FR4-Dev6 in der Niere von Mäusen nach peroraler (p. o.) bzw. intraperitonealer (i. p.) Gabe.



**Abbildung 17:** Zeit-Konzentrationsverläufe der Testsubstanz FR4-Dev6 im Gehirn von Mäusen nach peroraler (p. o.) bzw. intraperitonealer (i. p.) Gabe.

### 3.10 *In Vivo* Entzündungsmodell

Die pharmakokinetischen Datenerhebungen liefern noch keine Aussage über die Wirksamkeit einer Testsubstanz. Diese kann über geeignete Modelle, die eine pathophysiologische Situation abbilden, abgeschätzt werden. Dabei können Parameter ermittelt werden, die durch den Wirkstoff direkt beeinflusst werden, oder indirekte Parameter, die aus der direkten Interaktion resultieren. Weiterhin werden oft physiologische Parameter überprüft, um etwaige Nebenwirkungen frühzeitig erkennen zu können. Da die Testsubstanz FR4-Dev6 ein Antagonist der mPGES-1 ist und zusätzlich reduzierte LTB<sub>4</sub>-Level im Vollblut gemessen wurden, bietet es sich an ein *in vivo*-Modell zu wählen, bei dem proinflammatorische Mediatoren wie PGE<sub>2</sub> eine wichtige Rolle spielen.

Da per se bei gesunden Tieren keine erheblichen Entzündungen vorliegen sollten, muss eine solche durch einen externen Stimulus ausgelöst werden. Dies kann durch eine Infektion durch aktive Erreger (Bakterien, Viren, Pilze etc.) oder passiv durch abgetötete Erreger oder deren Bestandteile, chemische Agenzien, aber auch beispielsweise durch hochenergetische Strahlung (UV) ausgelöst werden. Je nach Stimulus kann die daraus resultierende Entzündung eine lokale und/oder systemische Immunantwort auslösen. Da mPGES-1-Inhibitoren potentiell bei chronischen (lokalen) Entzündungskrankheiten eingesetzt werden könnten, wurde das Zymosan-Pfotenmodell gewählt. Zymosan enthält Protein-Kohlenhydrat-Komplexe aus Hefezellen und induziert eine sterile Entzündung. Nach einigen Stunden Inkubationsdauer kann eine starke lokale Schwellung an der Injektionsstelle mit deutlich erhöhtem PGE<sub>2</sub>-Level im entzündeten Bereich festgestellt werden. Der Einfluss eines mPGES-1-Inhibitors sollte direkt in der Reduktion des PGE<sub>2</sub>-Levels und idealerweise indirekt durch eine Verringerung der Schwellung, bedingt durch eine verringerte Einwanderung von Immunzellen in das entzündete Gewebe und reduzierte Nozizeption, messbar sein.

Die Testsubstanz FR4-Dev6 wurde in diesem Versuch intraperitoneal appliziert, um eine möglichst hohe Wirkstoffkonzentration zu erreichen. Zwei Dosen von 10 mg/kg KG und 100 mg/kg KG wurden jeweils unterschiedlichen Gruppen verabreicht. Als Kontrollsubstanz wurde der COX-2-Hemmer Celecoxib

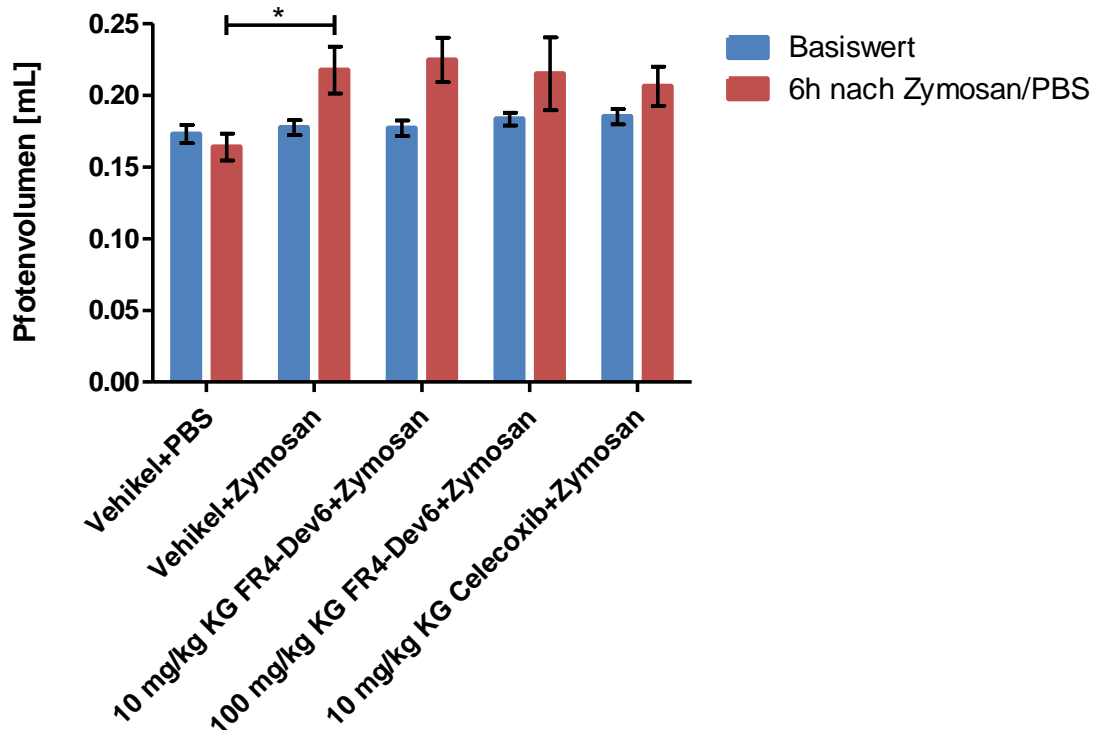
verwendet. Die Zymosaninjektion erfolgte in eine der Hinterpfoten von Mäusen direkt nach der Wirkstoffgabe. Vor Verabreichung wurde das basale Pfootenvolumen gemessen. Sechs Stunden nach der Zymosaninjektion wurde das Pfootenvolumen erneut gemessen. Außerdem wurden im Pfootengewebe und Blutplasma  $\text{PGE}_2$  und  $\text{LTB}_4$ -Level sowie die Substanzkonzentration mittels LC-MS/MS gemessen.

Das Pfootenvolumen war vor der Behandlung in allen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Auch nach einer sechsständigen Behandlung mit PBS wurde kein signifikant vergrößertes Pfootenvolumen im Vergleich zum Basiswert festgestellt.

Nach einer sechsständigen Behandlung mit Zymosan (im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe) wurde dahingegen ein signifikant erhöhtes Pfootenvolumen festgestellt (Abbildung 18), welches von 0,164 mL auf 0,217 mL anstieg.

Dieses erhöhte Pfootenvolumen konnte nicht signifikant reduziert werden, wenn den Tieren kurz vor der Zymosaninjektion die Testsubstanz FR4-Dev6 verabreicht wurde. Getestet wurden zwei unterschiedliche Dosen von 10 mg/kg KG und 100 mg/kg KG. Auch die Kontrollsubstanz Celecoxib reduzierte bei einer Dosis von 10 mg/kg KG das Pfootenvolumen nicht signifikant.

### Absolutes Pfortenvolumen vor und 6h nach Zymosaninjektion

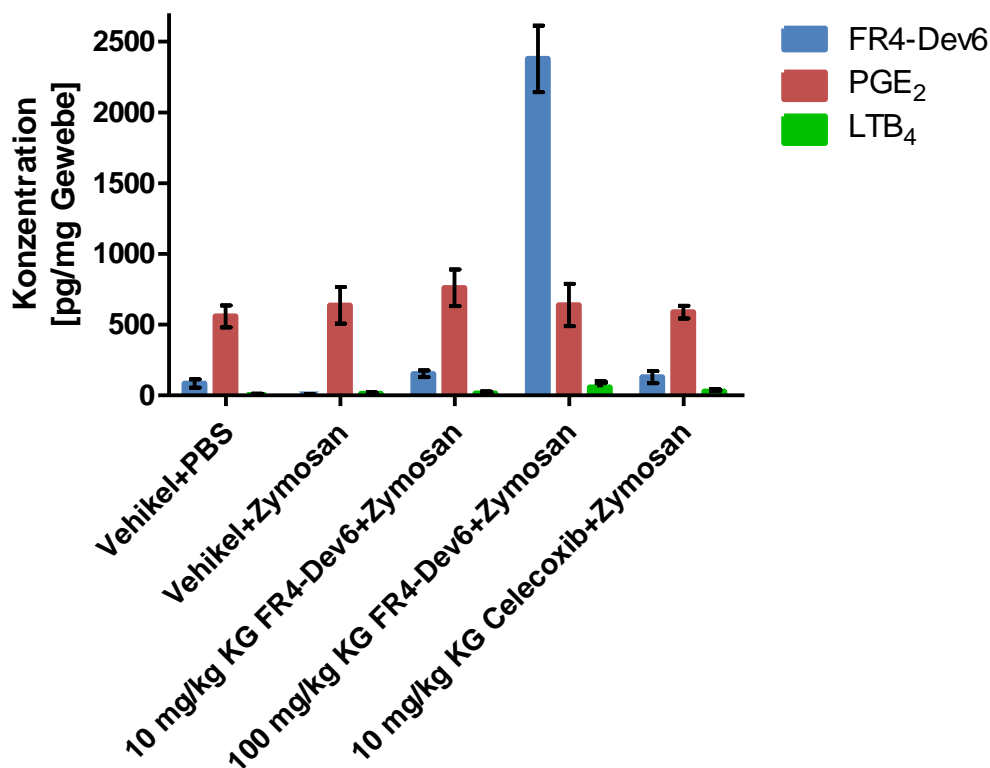


**Abbildung 18:** Im Zymosan-Pfortenmodell wurde das Pfortenvolumen vor und sechs Stunden nach Zymosaninjektion (PBS als Kontrolle) und vorangegangener intraperitonealer Applikation von FR4-Dev6 oder Celecoxib (Vehikel als Kontrolle) mittels Plethysmometer gemessen. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n \geq 6$ ; \*: signifikante Differenz mit  $P < 0,05$ .

Das Pfortengewebe der Tiere wurde sechs Stunden nach der Behandlung entnommen und die Eicosanoide sowie die Testsubstanz FR4-Dev6 extrahiert und mittels LC-MS/MS quantifiziert. Dabei wurde festgestellt, dass das  $PGE_2$ -Level durch die Zymosanbehandlung wider Erwarten nicht signifikant erhöht war. Eine Behandlung mit FR4-Dev6 oder Celecoxib änderte das  $PGE_2$ -Level ebenfalls nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vehikel+Zymosan). Auch das  $LTB_4$ -Level war nach sechs Stunden Zymosanbehandlung nicht signifikant erhöht.

In der Gruppe, die 10 mg/kg KG FR4-Dev6 erhielt, wurde im Pfortenödem durchschnittlich  $153 \pm 73$  pg/mg Gewebe Wirkstoff detektiert, bei einer 10x höheren Dosis  $2379 \pm 577$  pg/mg Gewebe.

## FR4-Dev6 und Eicosanoide im Ödem 6h nach Zymosaninjektion



**Abbildung 19:** Im Pfortenödemgewebe wurden die Testsubstanz und die Eicosanoide PGE<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> mittels LC-MS/MS quantifiziert. Angegeben ist der Mittelwert ± SEM für n ≥ 6.

### 3.11 Statistische Berechnungen

Zur Berechnung statistischer Signifikanzen wurde die Software GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) oder Graphpad Instat (Version 3.10, GraphPad Software, Inc.) verwendet. Der Signifikanzwert p wurde stets auf 5 % ( $p < 0,05$ ) festgelegt.

In Vivo Statistik - Pfortenvolumen (Abbildung 18):

Vergleich der Basiswerte gegen die Kontrollgruppe (Vehikel+PBS) mit nichtparametrischem ANOVA (Kruskall-Wallis-Test) und anschließendem Mehrfach-Vergleichstest (Dunn-Test), da die Daten der PBS-Kontrollgruppe nicht normalverteilt waren (berechnet mittels Kolmogorov-Smirnov-Methode).

Vergleich des Basiswertes der PBS-Gruppe gegen den 6-Stundenwert mit gepaartem T-Test, da die Werte einer Gruppe zu zwei Zeitpunkten verglichen wurden und eine Abhängigkeit durch die Behandlung besteht.

Vergleich der Zymosan-behandelten Gruppe gegen die Kontrollgruppe (Vehikel+PBS) nach sechs Stunden Inkubationsdauer mittels ungepaartem T-Test, da die Werte ungepaart sind und zwei Gruppen miteinander verglichen wurden. Die Varianzen beider Gruppen waren nicht signifikant unterschiedlich (berechnet mittels F-Test). Die Daten beider Gruppen waren normalverteilt (berechnet mittels Kolmogorov-Smirnov-Methode).

Vergleich der Behandlungen mit den Testsubstanzen FR4-Dev6 und Celecoxib gegenüber der Zymosan-behandelten Kontrollgruppe nach sechs Stunden Inkubationsdauer mit parametrischer einfaktorieller ANOVA und anschließendem Mehrfach-Vergleichstest (Dunnett-Test), da die Daten aller hier getesteten Gruppen normalverteilt waren und die Varianzen nicht signifikant unterschiedlich waren.

In Vivo Statistik - Messung der Testsubstanz und Eicosanoide im Pfotenödem (Abbildung 19):

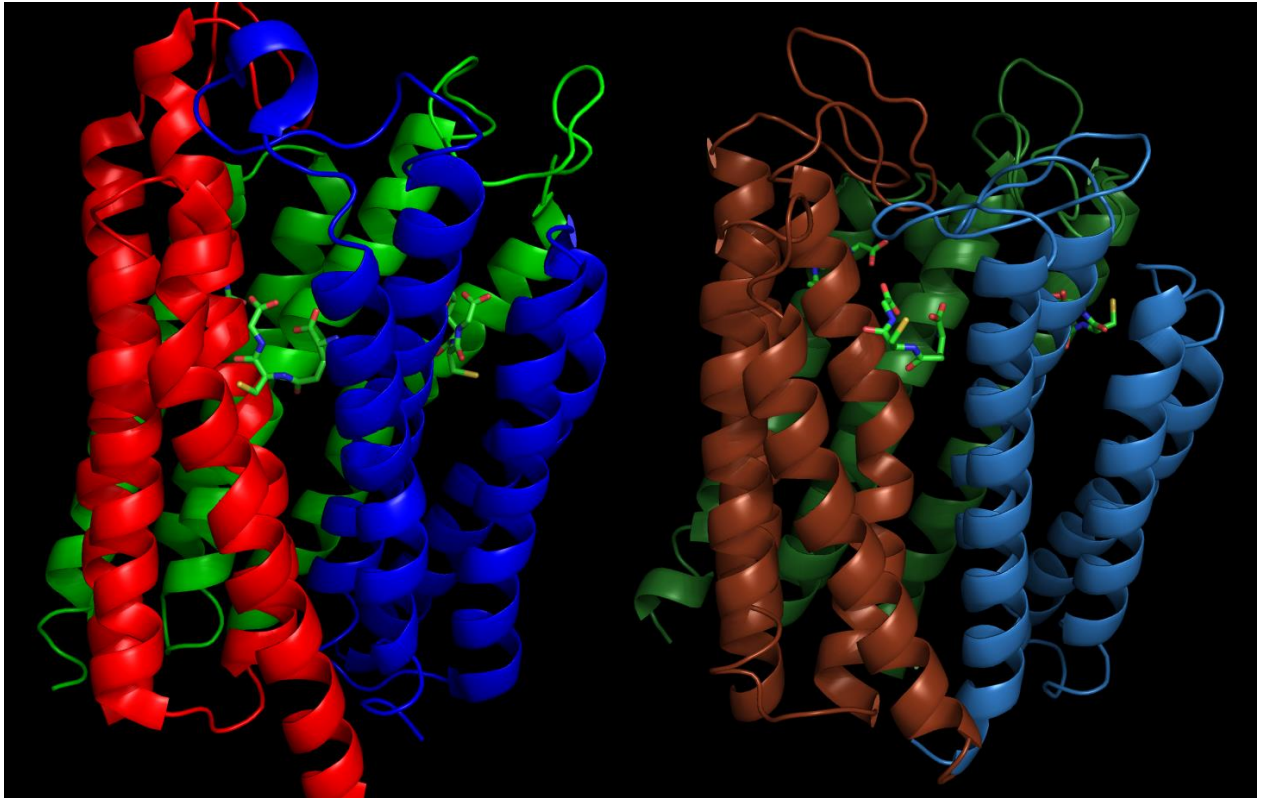
Vergleich des PGE<sub>2</sub>- bzw. LTB<sub>4</sub>-Levels der Zymosan-behandelten Gruppe gegen die Kontrollgruppe (Vehikel+PBS) nach sechs Stunden Inkubationsdauer mittels ungepaartem T-Test, da die Werte ungepaart sind und zwei Gruppen miteinander verglichen wurden. Die Varianzen der Gruppen waren nicht signifikant unterschiedlich (berechnet mittels F-Test). Die Daten der Gruppen waren normalverteilt (berechnet mittels Kolmogorov-Smirnov-Methode).

Vergleich der PGE<sub>2</sub>-Level nach Behandlungen mit den Testsubstanzen FR4-Dev6 und Celecoxib gegenüber der Zymosan-behandelten Kontrollgruppe nach sechs Stunden Inkubationsdauer mit nichtparametrischem ANOVA (Kruskall-Wallis-Test) und anschließendem Mehrfach-Vergleichstest (Dunn-Test), da die Standardabweichung der Gruppen signifikant unterschiedlich waren (getestet mittels Bartlett's Test) und die Daten der 10 mg/kg KG FR4-Dev6-Gruppe nicht normalverteilt waren (berechnet mittels Kolmogorov-Smirnov-Methode).

### 3.12 Homologie-Modell der offenen Konformation der mPGES-1

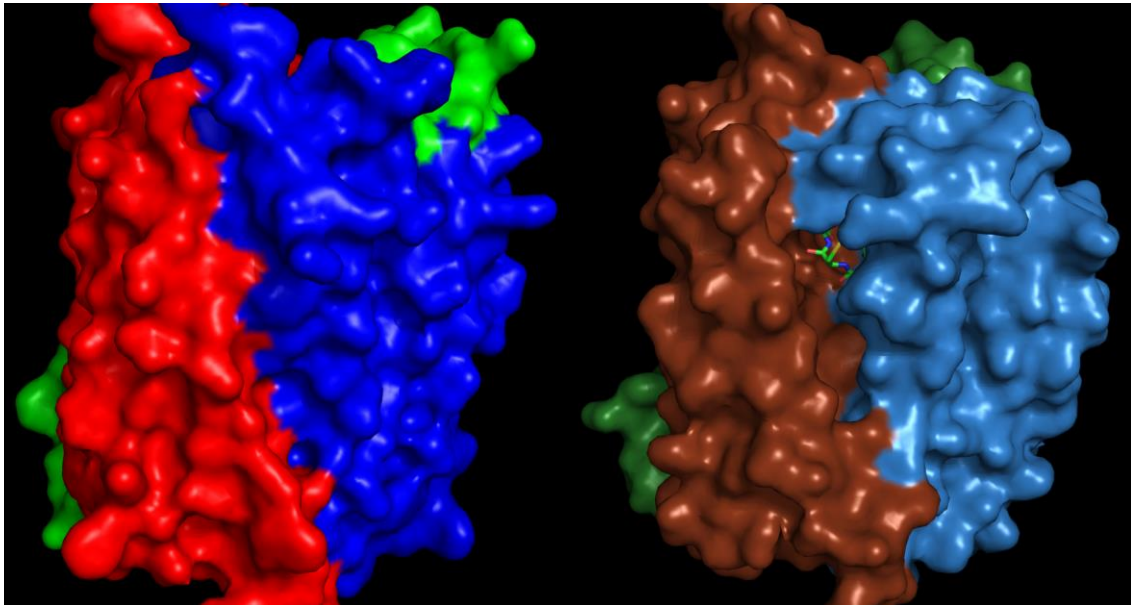
Die einzige bislang publizierte crystallographisch bestimmte 3D-Struktur der mPGES-1 (PDB-ID: 3DWW<sup>68</sup>) wurde in einer geschlossenen Konformation kristallisiert. Die Struktur enthält zwar den Kofaktor Glutathion, nicht aber das Substrat (PGH<sub>2</sub>) oder Produkt (PGE<sub>2</sub>) oder einen Wirkstoff, der die Aktivität beeinflusst, und lässt nur bedingt Rückschlüsse auf die Struktur einer offenen Konformation zu. Deshalb wurde ein Homologie-Modell der offenen Konformation *in silico* berechnet (siehe Abbildung 20). Das Modell basiert auf zwei Kristallstrukturen des homologen Enzyms Leukotrien C4-Synthase (LTC4S, PDB-IDs: 2PNO<sup>97</sup> und 2UUH<sup>99</sup>). LTC4 gehört, wie die mPGES-1, zur MAPEG-Enzymfamilie (*Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*). Da beide publizierten Strukturen eine offene Konformation des Enzyms darstellen und eine hohe Sequenzähnlichkeit mit der mPGES-1 aufweisen, eignen sie sich als Grundlage für ein Homologie-Modelling. Jede der drei Untereinheiten der mPGES-1 (in rot, blau und grün bzw. im Modell in braun, hellblau und dunkelgrün) besteht aus vier  $\alpha$ -Helizes. Zwischen der letzten Helix einer Untereinheit und der ersten Helix der benachbarten Untereinheit befindet sich jeweils ein Molekül Glutathion, welches als Kofaktor für die enzymatische Reaktion benötigt wird. Die einzelnen Helizes werden durch flexible Loopregionen miteinander verbunden.





**Abbildung 20:** Ein Homologie-Modell der offenen Konformation der mPGES-1 (rechte Grafik) wurde auf Basis der publizierten geschlossenen Konformation (linke Grafik) und des homologen Enzyms Leukotrien C4-Synthase erstellt. Dargestellt ist die Sekundärstruktur mit den drei enthaltenen Glutathion-Kofaktoren.

In der Oberflächendarstellung der offenen Konformation ist im Gegensatz zur geschlossenen Konformation eine Bindetasche, welche den Kofaktor enthält, erkennbar (siehe Abbildung 21). Diese Bindetasche ermöglicht die Bindung des Substrates  $\text{PGH}_2$ , kann aber auch von Aktivitätsmodulatoren verwendet werden. Die Form und Geometrie der Bindetasche hängt stark von der Ausrichtung der Aminosäurereste der umgebenden Helizes bzw. der Loop-Region ab. Bei der Inspektion der einzelnen Rotamere der Aminosäurereste wurden zahlreiche energetisch günstige Konformationen gefunden. Insbesondere die Loop-Region, die die Bindetasche an einer Seite begrenzt und vermutlich als Gelenk zwischen zwei Helizes für die Öffnung der Bindetasche verantwortlich ist, stellt eine hochvariable Region dar. In diesem Bereich ist neben den Aminosäureresten auch das Rückgrad flexibel.



**Abbildung 21:** Oberflächendarstellung der geschlossenen Konformation der mPGES-1 (links) und des Homologie-Modells der offenen Konformation (rechts) in einer Oberflächendarstellung. Jede der jeweils drei Unterheiten wurde in einer eigenen Farbe dargestellt.

### 3.13 Homologie-Modell der Nagetier-mPGES-1 (Maus und Ratte)

Die genomische Sequenz der mPGES-1 und auch die Aminosäuresequenz variiert zwischen verschiedenen Spezies<sup>119</sup>. Damit verbunden ist zum einen ein Unterschied in der enzymatischen Aktivität<sup>119</sup>, zum anderen wurde eine Reduktion oder gänzlicher Verlust der inhibitorischen Aktivität bei einigen Inhibitoren festgestellt, wenn von einem humanen Testsystem auf ein Rodentia-Testsystem (Maus oder Ratte) gewechselt wurde<sup>119</sup>.

Um Einflüsse auf die dreidimensionale Struktur der mPGES-1 und insbesondere auf das aktive Zentrum und die umgebende Bindetasche zu untersuchen, wurden zwei orthologe Homologie-Modelle der offenen Konformation der mPGES-1 der Spezies Maus (*mus musculus*) und Ratte (*rattus norvegicus*) erstellt. Dazu wurde das Homologie-Modell der humanen mPGES-1 in der offenen Konformation als strukturelle Grundlage verwendet und entsprechende nicht-konservierte Aminosäurereste ersetzt (*site directed mutagenesis*). Die sequentielle Zuordnung der jeweiligen Aminosäuren erfolgte durch ein multiples Alignment der drei Spezies (Abbildung 22).

```

Homo sapiens      MPAHSLVMS-SPALPAFLLCSTLLVIKMYVVAITGQVRLRKKAFANPEDALRHGGPQYC 59
Mus musculus      MPSPGLVMESGQVLPAPFLLCSTLLVIKMYAVAVITGQMLRKKAFANPEDALKRGGLQYY 60
Rattus norvegicus MTSLSGLVMENSQVLPAPFLLCSTLLVIKMYAVAVITGQVRLRKKAFANPEDALKRGGLQYC 60
*.: .***. . .*****.***:***:*****.:** **

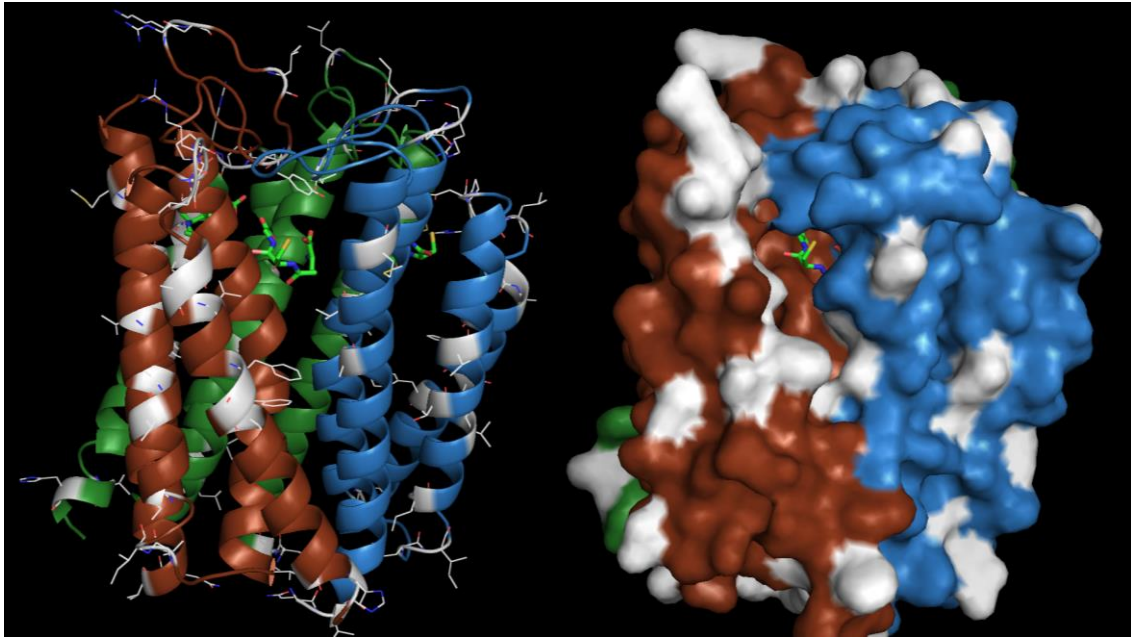
Homo sapiens      RSDPDVERCLRAHRNDMETIYPFLFLGFVYSFLGPNPFVAMHFLVFLVGRVAHTVAYLG 119
Mus musculus      RSDPDVERCLRAHRNDMETIYPFLFLGFVYSFLGPNPLIAWIHFLVVL TGRVVHTVAYLG 120
Rattus norvegicus RSDPDVERCLRAHRNDMETIYPFLFLGFVYSFLGPNPLIAWIHFLVVL TGRVVHTVAYLG 120
*****:***:***.*.***.*****

Homo sapiens      KLRAPIRSVTYTLAQLPCASMALQILWEAARHL 152
Mus musculus      KLNPRIRSGAYVLAQFSCFSMALQILWEVAHHL 153
Rattus norvegicus KMNPRIRSGAYVLAQFACFSMALQILWEVAHHL 153
*:. . .** :*.***:.* *****.*:**

```

**Abbildung 22:** Multiples Alignment der Spezies Mensch, Maus und Ratte. Dargestellt ist der Einbuchstaben-Aminosäurecode. Die Zahl im Anschluss gibt die Aminosäurenummer in der Sequenz an. Kennzeichnung der Ähnlichkeit: (\*) identische Aminosäure, (.) stark konservierte Aminosäure, (:) schwach konservierte Aminosäure oder nicht konservierte Aminosäuren (Leerzeichen)

Die dreidimensionale Darstellung der mPGES-1 aus Maus (Abbildung 23) und Ratte (nicht dargestellt, da fast identisch zu der der Maus) macht deutlich, wo im Enzym strukturelle Unterschiede zum humanen Enzym vermutet werden. Diese beschränken sich nicht auf eine einzelne Domäne oder Bereich. Vielmehr verteilen sich die Unterschiede über das gesamte Enzym, treten aber gehäuft am N-Terminus und in Transmembranhelix 4 auf, was auch von Pawelzik et al. festgestellt wurde<sup>119</sup>. Die ersten zehn Aminosäuren des N-Terminus wurden nicht mit in das Modell einbezogen, da hierfür keine strukturellen Informationen in der humanen dreidimensionalen Struktur vorhanden waren.

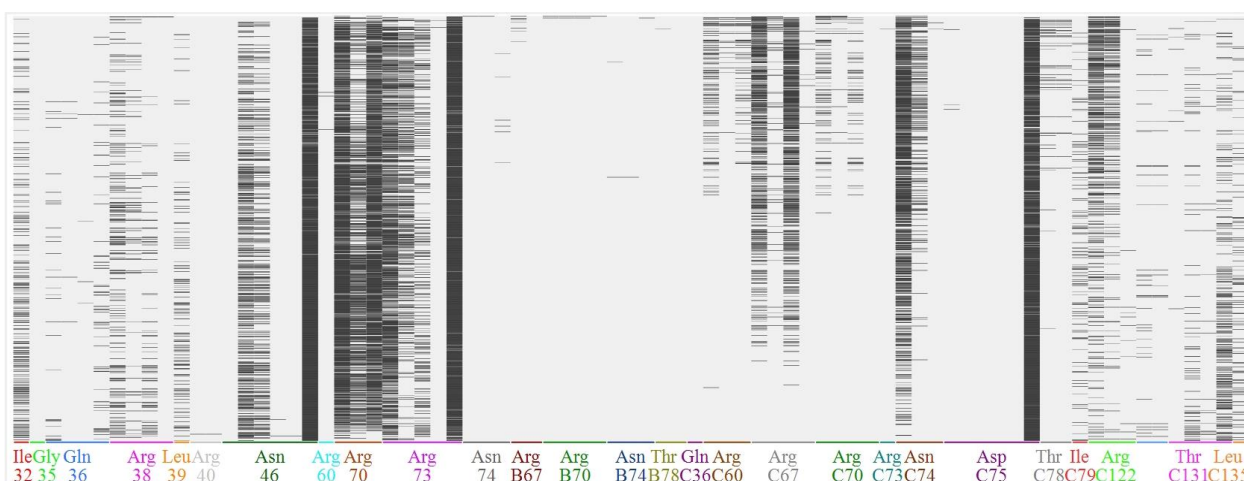


**Abbildung 23:** Homologie-Modell der offenen Konformation der mPGES-1 für die Spezies Maus. Weiß markiert wurden alle Aminosäuren, die zum humanen Enzym nicht identisch sind. Außerdem wurden für diese Aminosäuren neben der Sekundärstruktur auch die Aminosäuren-Seitenketten dargestellt. Links: Sekundärstrukturdarstellung, rechts Oberflächendarstellung.

### 3.14 Protein-Ligand-Interaction-Fingerprints (PLIF)

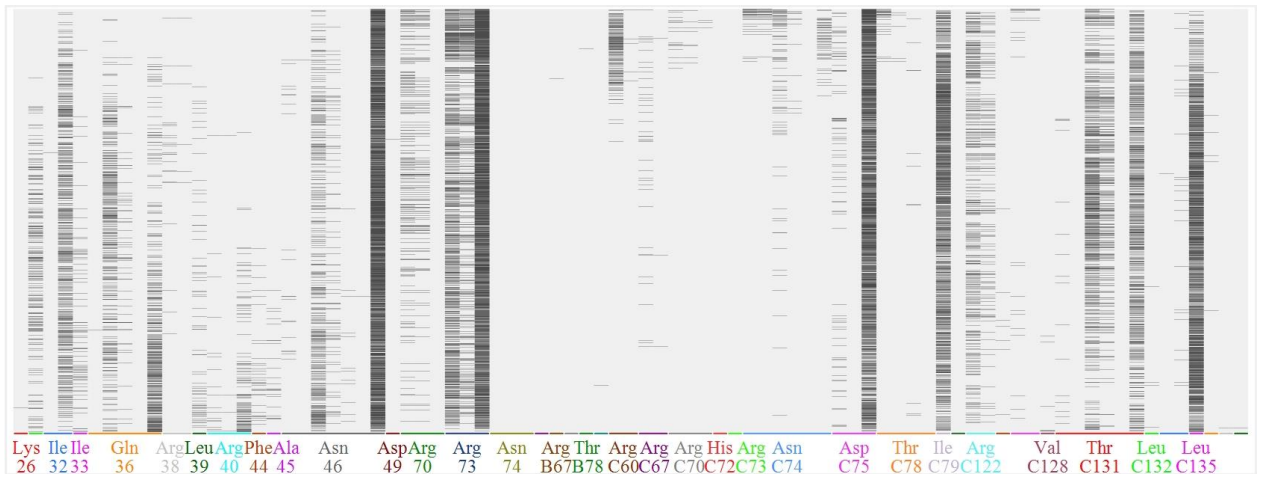
Protein-Ligand-Interaktions-Fingerabdrücke wurden für aktive Derivate der beiden Wirkstoffklassen berechnet, nachdem für diese eine Konformerdatenbank erzeugt wurde und diese in das Homologie-Modell der offenen Konformation der mPGES-1 gedockt wurden. Einige Interaktionen zwischen Ligand und Protein wurden für eine Vielzahl der Konformere beobachtet. Abbildung 24 und Abbildung 25 zeigen das PLIF-Muster für die Sulfonamid- bzw. Quinazolinon-Strukturklasse. Für jedes Konformer wird dabei festgestellt, ob eine Interaktion mit dem umliegenden Protein möglich ist. Ähnlich einem Barcode wird anschließend jede Interaktion von jedem Konformer mit der entsprechenden Aminosäure durch einen schwarzen Strich markiert. Häufige Interaktionen bilden ein dunkleres und engeres Muster als seltene Interaktionen, bei denen nur einzelne Konformere betroffen sind. Einige Interaktionen wurden für eine Vielzahl der gedockten Liganden festgestellt. Die häufigsten Aminosäure-Interaktionspartner waren in der

Sulfonamid-Substanzklasse Asn46, Arg70, Arg73, Asn 74 und Asp75. Die häufigste Interaktion wurde für 1279 von 1330 (96,2 %) Konformeren mit Arg73 festgestellt, dicht gefolgt von Asn46 und Asp75. Bei näherer Betrachtung der Interaktionsarten wurden hauptsächlich lipophile Oberflächenkontakte zwischen den Liganden und der mPGES-1 festgestellt, aber auch einige Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäuren mit Wasserstoffdonorengruppen und entsprechenden Akzeptoren auf Ligandenseite. Alle beteiligten Aminosäuren befinden sich in der Bindetasche, welche ansonsten den Kofaktor Glutathion bzw. das Substrat PGH<sub>2</sub> stabilisieren. Einige der beteiligten Aminosäuren sind in der murinen mPGES-1 verändert. Insbesondere Val29, Ile32, Thr131 and Leu135 sind im Spalt zwischen der letzten Helix einer Untereinheit und der ersten Helix der benachbarten Untereinheit der mPGES-1 lokalisiert.



**Abbildung 24:** Protein-Ligand-Interaktions-Fingerabdrücke (PLIF) zwischen den inhibitorisch aktiven Substanzen der FR4-Substanzklasse und der mPGES-1. An der Interaktion beteiligte Aminosäuren sind auf der X-Achse aufgelistet, die Konformere der Liganden auf der Y-Achse. Ein schwarzer Strich repräsentiert eine Interaktion zwischen dem Konformer und der entsprechenden Aminosäure.

Die Hauptinteraktionspartner der Quinazolinon-Strukturklasse waren Asn46, Arg73, Asp75, Ile79 und Leu135 (Abbildung 25). Die häufigste Interaktion wurde für 5903 von 7473 (79,0 %) Konformeren mit Asn46 - dicht gefolgt von Arg73 - festgestellt.



**Abbildung 25:** Protein-Ligand-Interaktions-Fingerabdrücke (PLIF) zwischen den inhibitorisch aktiven Substanzen der FR20-Substanzklasse und der mPGES-1. An der Interaktion beteiligte Aminosäuren sind auf der X-Achse aufgelistet, die Konformere der Liganden auf der Y-Achse. Ein schwarzer Strich repräsentiert eine Interaktion zwischen dem Konformer und der entsprechenden Aminosäure.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 mPGES-1 als Zielmolekül in der Wirkstoffentwicklung

Im Fokus dieser Arbeit steht ein Protein der weithin bekannten Arachidonsäurekaskade - die mikrosomale Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase 1 (mPGES-1). Bereits bekannt sind die katalytische Funktion des Enzyms, welche Prostaglandin H<sub>2</sub> zu Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) umsetzt. Zahlreiche Wirkungen konnten in den letzten Jahren den Prostaglandinen und insbesondere PGE<sub>2</sub> zugeschrieben werden. Sehr viele Erkenntnisse konnten im Zusammenhang mit der Therapie mit nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) und Coxiben erzielt werden, da deren Zielstrukturen - die Cyclooxygenasen 1 und 2 - für die Bereitstellung des Substrates PGH<sub>2</sub> verantwortlich ist. Leider lässt sich die Wirkung und insbesondere die Nebenwirkungen dieser Wirkstoffklassen nicht ausschließlich auf die Reduktion des PGE<sub>2</sub>-Levels zurückführen oder - anders formuliert - kann in diesem System ein Effekt nicht eindeutig auf ein einzelnes Prostanoid zurückgeführt werden. Dies liegt vor allem daran, dass die Fettsäure PGH<sub>2</sub> das Substrat für insgesamt fünf distinkte Enzyme darstellt, die in verschiedenen Geweben ein differenziertes Expressionsmuster aufweisen<sup>71</sup>. Das daraus resultierende Prostanoid-Muster enthält neben einer zeitlichen also auch eine räumliche Komponente. Dazu kommen autokatalytische Strukturumwandlungen (insbesondere von PGH<sub>2</sub>), die auf chemische Instabilitäten zurückzuführen sind und so genannte Verschiebungseffekte (aus dem engl. *shunting*). Dabei wird überschüssiges Substrat, welches auf Grund einer Inhibition/Deletion eines der weiter verstoffwechselnden Proteine akkumuliert, nicht einfach abgebaut, sondern lateral durch andere Proteine verstoffwechselt. Richtig kompliziert wird das System durch zusätzliche gegenregulatorische Effekte. So konnte gezeigt werden, dass PGD<sub>2</sub> am Anfang eines pathophysiologischen Prozesses maßgeblich an der Mediation von Fieber beteiligt ist, später aber auch an der Resolution<sup>120</sup>. Ähnliches konnte für PGE<sub>2</sub> im Zusammenhang mit Entzündungen gezeigt werden. Ein anfänglich hoher

Level vermittelt zahlreiche pro-inflammatorische Effekte, während PGE<sub>2</sub> in einer späteren Phase gegenregulatorisch wirkt und an der Auflösung beteiligt ist<sup>44, 121</sup>. Eine einfache Einteilung in "gutes" Prostanoid und "schlechtes" Prostanoid ist somit nicht möglich, auch deshalb nicht, weil physiologische und pathophysiologische Effekte gleichzeitig auftreten können. So wird physiologisch ein hoher Level an PGE<sub>2</sub> in der Niere gemessen, welches dort für die Regulation des Wasserhaushalts und Natriumretention verantwortlich ist<sup>122</sup>. Ein hohes Level der gleichen Fettsäure in einem Gelenk kann aber ein deutliches Zeichen für eine lokale - eventuell sogar chronische Entzündung - wie rheumatoide Arthritis sein<sup>123-124</sup>. Um (Neben-)Wirkungen in der Therapie, modulieren zu können ist es wichtig eine Vielfalt an Wirkstoffen zu etablieren. So können beispielsweise allergische Reaktionen auf bestimmte chemische Strukturklassen (z. B. Sulfonamidunverträglichkeit) oder Pharmakoresistenzen und -sensibilitäten umgangen werden. Um zielmolekülabhängige Nebenwirkungen verändern zu können wird es zudem immer wichtiger Wirkstoffe mit alternativen Zielmolekülen zu entwickeln. So können z. B. multimorbide Patienten oder gefährliche Erreger wie z. B. *Toxoplasma gondii* (Erreger der Toxoplasmose) oder das humane Immundefizienz-Virus mit einer Kombinationstherapie behandelt werden.

Inhibitoren der mPGES-1 könnten in diesem Zusammenhang zu einer Modulation der Nebenwirkungen bei der Therapie von inflammatorischen Krankheiten, Fieber, Schmerz und möglicherweise einigen Tumoren führen. Unterstützt wird dieser Ansatz durch Forschungsergebnisse, welche den direkten Einfluss der mPGES-1-vermittelten PGE<sub>2</sub>-Synthese untersuchen. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Knockout-Modelle zeigen eine günstige Prognose für diese Zielstruktur in der Behandlung der oben genannten Erkrankungen<sup>39-40, 125</sup>. Während zum jetzigen Zeitpunkt kein einziger direkter selektiver mPGES-1-Inhibitor als Wirkstoff in der Therapie zugelassen ist, wurden in den letzten Jahren zahlreiche experimentelle Substanzen veröffentlicht<sup>75</sup>. Für viele Wirkstoffe wurden neben der Bestimmung des inhibitorischen Potentials nur wenige weitere Untersuchungen veröffentlicht.



Die in dieser Arbeit vorgestellten neuartigen Wirkstoffe mit einer breiten biologischen, biochemischen und pharmakologischen Charakterisierung könnten einen Teil der Lücke zwischen experimentellen Screeningmethoden und angewandter Entwicklung schließen.

## 4.2 Screeningmethodik

Die Wirkstoffsuche (engl. *Screening*) hat primär zwei Ziele. Zum einen soll ein definierter chemischer Raum auf eine praktikable Anzahl an Molekülen reduziert werden, zum anderen soll diese Auswahl möglichst viele Moleküle mit günstigen Eigenschaften (biologisch, chemisch, pharmakologisch etc.) enthalten. Heutige Substanzdatenbanken enthalten nicht selten Millionen unterschiedlicher Moleküle (engl. *small molecules*). Wird ein Großteil dieser Moleküle in kurzer Zeit in biochemischen Versuchen getestet, spricht man von Hochdurchsatzscreening. Diese Methodik erfordert neben einer real existierenden Substanzdatenbank enormen technischen Aufwand, erzeugt hohe Kosten und liefert zumeist limitierte Ergebnisse, da stark abstrahierte Versuchsumgebungen eingesetzt werden müssen. Im Gegensatz dazu stehen die wissensbasierten Screeningmethoden. Hierbei wird auf vorhandene Informationen, wie Literatur und Patente, endogene und synthetische Liganden und natürlich Strukturinformationen wie NMR- und Röntgenkristallstrukturen zurückgegriffen<sup>126</sup>.

## 4.3 Auswahl der Wirkstoffklassen

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Substanzklassen untersucht, welche auf zwei Leitstrukturen aufbauen, die zuvor über ein virtuelles (computergestütztes) Screening als direkte Inhibitoren der mPGES-1 identifiziert wurden<sup>92</sup>. Die erste Substanzklasse (FR4) basiert auf einem Benzolsulfonamid-Grundgerüst und wurde über eine pharmakophorbasierte Suche gefunden. Als Grundlage für das Pharmakophormodell<sup>127-128</sup> dienten potente mPGES-1-Inhibitoren mit einem Indol-Grundgerüst, welche von dem bekannten Inhibitor MK-886 abgeleitet sind<sup>74</sup>. Die zweite Substanzklasse

(FR20) basiert auf einem Quinazolinon-Grundgerüst. Die aktive Substanz wurde mit zwei aufeinander aufbauenden computergestützten Screeningverfahren - den so genannten Self Organizing Maps<sup>93</sup> und der SQUIRREL-Methode<sup>94</sup> - gefunden. Als Eingabe dienten hochpotente Inhibitoren mit einem Phenanthren-Grundgerüst<sup>73</sup>.

Die Benzolsulfonamid-Strukturklasse wurde auf Grund ihrer breiten pharmakologischen Anwendung und günstigen chemischen Eigenschaften gewählt. Zahlreiche Wirkstoffe mit diesem Grundgerüst werden als Antibiotika, Antidiabetika (Sulfonylharnstoffe), Diuretika (Thiaziddiuretika), Antikonvulsiva und Protease-Inhibitoren eingesetzt. Der Cyclooxygenase-2-Inhibitor Celecoxib enthält ebenfalls diese Struktur. Da sowohl ein aromatisches Ringsystem sowie Wasserstoffgruppenakzeptoren und -donoren vorhanden sind, bietet sich eine breite Palette an Substitutionsmöglichkeiten und Synthesewegen an.

Das Quinazolinon-Grundgerüst ist ebenfalls in zahlreichen Wirkstoffen enthalten<sup>129</sup>. Sie werden unter anderem als Antihypertensiva (z. B. Prazosin), in der Krebstherapie als Zytostatika (z. B. Gefitinib), als Alpha-Sympatholytikum bei der Behandlung einer gutartigen Prostatavergrößerung (Alfuzosin) oder als Muskelrelaxanz (Afloqualon, in Japan und Südkorea) eingesetzt. Beide Strukturgerüste sind außerdem in vielen experimentellen Wirkstoffen enthalten. Um diese beiden Grundgerüste wurde jeweils eine Substanzbank aufgebaut. Diese hatte zum einen das Ziel potentere Derivate (in Bezug auf mPGES-1-Hemmung) zu identifizieren, zum anderen Struktur-Aktivitätsbeziehungen (engl. *Structure-Activity-Relationship*, SAR) analysieren zu können und zuletzt möglicherweise eine Substanz bereitzustellen, die für *in vivo*-Analysen geeignet ist.

#### **4.4 Struktur-Aktivitäts-Beziehungsanalyse der Benzolsulfonamid-Strukturklasse**

Die FR4-Strukturklasse wurde an drei Resten modifiziert, wobei Rest R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> an dieselbe Amidgruppe binden und damit durch Rotation prinzipiell vertauschbar sind. Diese Reste sind bei der Leitstruktur jeweils durch

aromatische Gruppen besetzt, die sich nur minimal unterscheiden (eine der Methylbenzylgruppen ist noch mit einer *para*-Methoxygruppe substituiert). Daher wurde zuerst eine der beiden aromatischen Reste (R1) verändert, während die zweite Gruppe (R2) nicht verändert wurde. Damit sollte ermittelt werden, ob die Benzylgruppe prinzipiell durch eine Variation ersetzt werden kann, die zu einer erhöhten Aktivität bzw. zu günstigeren physikochemischen Eigenschaften führt. Dazu wurden verschiedene 5-Ring-Heterozyklen wie Thiophen (FR4-Dev22), Furan (FR4-Dev25) oder 4-methyl-1,3-Thiazol (FR4-Dev23) eingeführt. Dadurch wurde eine Reduktion des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (LogP) von 4,8 (FR4) zu 4,5 (FR4-Dev22) bzw. 4,0 (FR4-Dev25) erreicht. Im Sinne von Lipinski's „Rules of Five“<sup>132</sup> zeigen Moleküle mit einem LogP unter 5 eine deutlich erhöhte orale Bioverfügbarkeit. Da während der Wirkstoffentwicklung die Lipophilie häufig noch zunimmt, wird sogar ein LogP-Wert von 3 (Rule of Three) für Leitstrukturen empfohlen<sup>133-134</sup>. Wenlock et. al konnten zeigen, dass in jeder Entwicklungsphase jeweils die lipophilsten Substanzen nicht mehr weiter verfolgt wurden<sup>135</sup>. Grund dafür ist die geringe Löslichkeit (in wässrigen Formulierungen) stark lipophiler Substanzen, sowie schlechte Absorption und schnelle Metabolisierung.

Da keine der drei 5-Ringvarianten (FR4-Dev22, -Dev23, -Dev25) eine vergleichbare oder erhöhte Aktivität zeigte, wurden zwei 6-Ring-Substitutionen eingeführt. Dazu wurde in *meta*- und *para*-Stellung eine Cyanogruppe an den Benzylrest gebunden (FR4-Dev24, FR4-Dev26). Beide Varianten führten zu einem kompletten Verlust der Aktivität.

In Derivat FR4-Dev6 wurde der Benzylrest durch einen Cyclohexylrest ersetzt, der die Lipophilie des Gesamtmoleküls erhöht (LogP: 5,56). Damit sollte überprüft werden, ob ein höherer LogP-Wert zu einer höheren Affinität führt. Außerdem konnte mit dieser Variante ermittelt werden, ob ein nicht-aromatisches Ringsystem Vorteile gegenüber aromatischen Varianten liefert. FR4-Dev6 hemmte die mPGES-1 deutlich stärker als die Leitstruktur FR4. Die erhöhte Lipophilie erleichtert eine Lokalisation der Substanz in lipophilen Strukturen wie Membranen. Da die mPGES-1 in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums, sowie den Kern umgebende Membranen,

lokalisiert ist<sup>61, 71, 136-137</sup>, kann davon ausgegangen werden, dass tendenziell lipophilere Substanzen leichter Zugang zum aktiven Zentrum finden.

Neben Variationen des R1-Restes wurden Modifikationen an Rest R2 eingeführt. Dazu wurde zuerst die Methoxy-Gruppe entfernt (FR4-Dev1), was im Vergleich zur Leitstruktur keinen Einfluss auf die Aktivität hatte. Eine weitere Verkleinerung des 4-Methoxybenzylrestes zu einem Ethyl (FR4-Dev18), einem Butyl (FR4-Dev19) oder Phenyl (FR4-Dev3) resultierte in weniger aktiven Substanzen. Eine Verlängerung des *Spacers* von einem Methylen (FR4) zu einem Ethylen (FR4-Dev4) oder Propylen (FR4-Dev7) verstärkte den inhibitorischen Effekt. Dieser Effekt konnte noch gesteigert werden, indem deutlich größere Reste wie 4-(phenylamino)benzyl (FR4-Dev8) bzw. zwei Phenoxy-Derivative (FR4-Dev5 und FR4-Dev9) eingeführt wurden. Derivat 9 hemmte damit die humane mPGES-1 bereits bei 5 µM zu 90 %.

Weiterhin wurden Modifikationen an Rest R3 eingeführt. Wurde die Carboxylsäure von Position 4 (FR4-Dev1) auf Position 3 (FR4-Dev10) verschoben, wurde lediglich ein geringer Aktivitätsverlust beobachtet. Gleiches gilt für den Ersatz der Säuregruppe durch eine Nitrilgruppe (FR4-Dev11). Ein Austausch mit verschiedenen halogenierten Varianten (FR4-Dev13, -Dev14, -Dev15, -Dev20, -Dev21) führt fast ausnahmslos zum totalen Aktivitätsverlust. Somit erscheint die Säuregruppe in Position 4 am geeignetsten zu sein.

Mit diesem Wissen über die drei Reste wurden zahlreiche Modifikationen gleichzeitig eingeführt. Eine Verkürzung des Benzylrestes zu einem Phenyl (R1-Rest) zusammen mit einer Verkürzung des R2-Restes zu Ethyl (FR4-Dev16) oder Butyl (FR4-Dev17) resultiert in einem vollständigen Aktivitätsverlust. Ausgehend vom potenten Derivat FR-Dev9 wurde evaluiert, ob die Carboxylsäuregruppe durch eine Nitrilgruppe ersetzt werden kann (FR4-Dev27). Dies führte allerdings zu einem drastischen Verlust an Aktivität. Ausgehend von der ebenfalls sehr potenten Struktur FR4-Dev6 (Cyclohexylmethyl an Rest R1) wurden große aromatische, lipophile Substituenten an Rest R2, wie eine Biphenylgruppe (FR4-Dev28) oder eine Phenoxygruppe (FR4-Dev30), erprobt. Beide Derivate hemmten die humane mPGES-1 noch einmal stärker (etwa 80 % bei 5 µM Substanzkonzentration).

Wurde allerdings ein *para*-Chlorbenzyl an Rest R2 eingesetzt (FR4-Dev29), wurde keine Aktivitätssteigerung festgestellt. Diese Beobachtung gleicht der Evaluierung des ebenfalls *para*-Chlor-substituierten Derivats FR20-Dev8 der Quinazolinonserie.

Ein Ringschluss der Reste R1 und R2 durch ein 4-Phenylpiperazin (FR4-Dev2) hemmte die mPGES-1 etwas stärker als die Leitstruktur FR4. Als letztes wurde der Effekt eines Austauschs des zentralen Sulfonamids durch ein tertiäres Amin ermittelt (FR4-Dev12). Hierbei wurde ein fast vollständiger Aktivitätsverlust beobachtet, was die Notwendigkeit des Sulfonamid-Grundgerüsts hervorhebt.

Für diese Substanzklasse kann aus dieser SAR-Studie abgeleitet werden, dass die Reste R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> in hohem Maße variabel sind. Insbesondere große lipophile Gruppen steigern die Aktivität deutlich, während kleinere oder weniger lipophile Gruppen zu weniger oder inaktiven Substanzen führen. Die Säuregruppe an Rest R<sub>3</sub> scheint essentiell für die Bindung zu sein. Lediglich eine Substitution mit Nitril wird toleriert, während halogenierte Substituenten zum vollständigen Aktivitätsverlust führen.

Um das inhibitorische Potential besser abschätzen zu können wurden von der Leitstruktur und den fünf vielversprechendsten Derivaten der IC<sub>50</sub> berechnet, indem über einen breiten Konzentrationsbereich Aktivitätswerte (im Sinne von Hemmung der mPGES-1) gemessen wurden und mittels einer sigmodalen Dosis-Wirkungsfunktion die Konzentration bestimmt wurde, bei der die Substanzen eine halbmaximale Wirkung erzielten.

Dieser kann dazu verwendet werden die Konzentration abzuschätzen, bei der eine Substanz ein Zielmolekül halbmaximal hemmt. Zum einen können verschiedene Substanzen damit gut miteinander verglichen werden, zum anderen gibt der zugrunde liegende Datensatz (Hemmung bei verschiedenen Konzentrationen) Aufschluss darüber, wie steil das inhibitorische Potential ist oder anders ausgedrückt: über welchen Konzentrationsbereich hinweg eine Substanz aktiv ist. Weiterhin kann somit ermittelt werden, ob eine Substanz ein Zielmolekül überhaupt maximal hemmen kann oder beispielsweise auf Grund

eines kompetitiven Effekts gar keine annähernd vollständige Hemmung möglich ist.

Der IC<sub>50</sub>-Wert einiger Derivate ist im Vergleich zur Leitstruktur um mehr als eine 10er-Potenz niedriger (FR4 > 10 µM, FR4-Dev28 < 1 µM). Somit konnte eine deutliche Steigerung der Aktivität in Bezug auf die Hemmung der humanen mPGES-1 erreicht werden.

#### **4.5 Struktur-Aktivitäts-Beziehungsanalyse der Quinazolinon-Strukturklasse**

Die FR20-Strukturklasse enthält neben der Leitstruktur Derivate, die an allen drei Resten modifiziert sind. An Rest R<sub>1</sub> wurde die Position des Chlors variiert, Chlor durch Fluor, Methyl oder *tert*-Butyl ersetzt, zwei halogene Substitutionen eingeführt (Fluor/Chlor und Chlor/Chlor) und die gesamte Benzolgruppe durch Thiophen, Pyridin oder Cyclopropan ersetzt. Modifikationen an diesem Rest führten zu einer deutlich reduzierten Hemmung der mPGES-1-Aktivität im Vergleich zur Leitstruktur FR20. Lediglich aromatische Gruppen mit *ortho*-Chlorsubstituenten (FR20, FR20-Dev6) wurden hier toleriert, was eine hydrophobe Interaktion des Chloratoms nahelegt, da sowohl die unsubstituierte Benzylvariante (FR20-Dev2), als auch die *ortho*-Fluor-Substitution (FR20-Dev3) zu einer reduzierten Aktivität führt (15 % bzw. 30 % bei 1 µM Substanzkonzentration). Eine Verschiebung des *ortho*-Chloratoms in *para*-Stellung führt ebenfalls zu einer reduzierten Aktivität (FR20-Dev8). Ein Austausch der aromatischen Gruppen durch aliphatische Ketten (FR20-Dev4, FR20-Dev5) reduzierte die Aktivität ebenso wie der bioisostere Ersatz durch Thiophen (FR20-Dev7).

An Rest R<sub>2</sub> wurde ebenfalls die Position des Chlor-Atoms variiert (*meta*- zu *para*-Stellung) und Chlor durch eine Methoxygruppe ersetzt. Außerdem wurde eine Verringerung der Gesamtgröße des Moleküls durch Verkürzung des Biphenyls zu einem Phenyl ausgetestet. Eine gleichzeitige Verkürzung des R<sub>2</sub>-Restes, kombiniert mit einer Di-Substitution des R<sub>1</sub>-Restes (2-Chlor-6-Fluor -> FR20-Dev21 bzw. 2-Chlor-6-Chlor -> FR20-Dev23) zeigte eine vergleichbare

Hemmung der mPGES-1. Daraus abgeleitet werden kann eine Toleranz für Substituenten in Position 2 und 6 (*ortho/ortho*), im Gegensatz zur oben erwähnten *para*-Stellung. Côte et al. konnten mit ihren Phenanthrenimidazol-Derivaten ganz ähnliche Ergebnisse erzielen<sup>73</sup>. Auch hier wurde der Benzyl-Rest in *ortho/ortho*-Stellung substituiert. Die größte Aktivität zeigte ebenfalls ein Flour-/Chlor-substituiertes Derivat.

Offensichtlich kann Rest R<sub>2</sub> durch kleinere Gruppen ersetzt werden ohne an inhibitorischer Potenz zu verlieren. Die Verkürzung des 1,1'-Biphenyl-4-ylmethyl-Restes zu einer Benzylgruppe (FR20-Dev12) führt sogar zu einer geringen Aktivitätssteigerung. Eine Variation der Substitution am aromatischen Ring von Chlor zu Methoxy (FR20-Dev9) wird ebenso toleriert wie die Veränderung der Stellung von *meta* zu *ortho* (FR20-Dev10 und FR20-Dev14).

Die Propylseitenkette an Rest R<sub>3</sub> wurde zu einem Methyl verkürzt, um die Gesamtgröße zu reduzieren. Außerdem wurde getestet, ob ein Austausch der aliphatischen Kette durch weniger flexible Substituenten wie Cyclopropyl oder Methylbenzyl zu einer verstärkten Bindung führt. Variationen an R<sub>3</sub> waren allerdings nur für manche Substituenten möglich. Eine vergleichbare Aktivität wurde für die Verkürzung zum Methyl (FR20-Dev13) sowie dem Austausch mit einem Benzylrest (FR20-Dev25) festgestellt. Eine Substitution mit Cyclopropyl (FR20-Dev27) führte zu einer inaktiven Substanz.

Drei weitere Derivate wurden auf mPGES-1-Hemmung getestet. In Derivat FR20-Dev30 wurde der Amid-Linker zwischen Quinazolinon-Grundgerüst und Rest R<sub>1</sub> an Rest R<sub>2</sub> verschoben, was zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führt. Eine Verschiebung des *ortho*-Chlor-substituierten Benzylrests an Rest R<sub>3</sub> (keine Belegung von R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>) und gleichzeitigem Austausch eines Stickstoffs im Grundgerüst durch ein Sauerstoff führt ebenfalls zu vollständigem Aktivitätsverlust, was nahelegt, dass einfaches Umpositionieren von essentiellen Strukturgruppen rund um ein Grundgerüst in dieser Strukturklasse nicht möglich ist. Somit spielt die Orientierung des Quinazolinon-Grundgerüsts

eine wichtige Rolle, was vermutlich auf die Lage der Wasserstoffgruppen-Akzeptoren und –Donoren im Grundgerüst zurückgeführt werden kann. Ein Austausch des Grundgerüsts (im engl. „*Scaffold-Hopping*“) sollte diesen Umstand bedenken.

Eine weitere Variationsmöglichkeit besteht in der Substitution an Position 7 des Quinazolinon-Grundgerüsts. Hier wurde eine Pyrrolidin-Gruppe eingeführt (FR20-Dev28), die zwar weniger aktiv ist als die Leitstruktur, aber dennoch zu einer 37 %-igen Hemmung der mPGES-1 führte (bei 1  $\mu$ M).

Für diese Substanzklasse kann aus dieser SAR-Studie abgeleitet werden, dass Rest R<sub>1</sub> eine kritische Rolle ausübt. Variationen werden nur in sehr geringem Maße toleriert. Substitutionen an Rest R<sub>2</sub> und Rest R<sub>3</sub> sind in einem deutlich breiteren Spektrum möglich und bieten zahlreiche Möglichkeiten für Optimierungen der LADME-Eigenschaften. Im Zuge der Untersuchungen konnte außerdem mit Position 7 eine weitere vielversprechende Substitutionsstelle am Quinazolinon-Grundgerüst ausgemacht werden.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden auch für diese Substanzklasse IC<sub>50</sub>-Werte der vielversprechendsten Derivate ermittelt. Der IC<sub>50</sub>-Wert aller Derivate liegt im Vergleich zur Leitstruktur in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich zwischen 0,1  $\mu$ M (FR20) und 0,4  $\mu$ M (FR20-Dev12 und -Dev21). Somit konnte keine Steigerung der Aktivität in Bezug auf die Hemmung der humanen mPGES-1 erreicht werden. Eine mögliche Ursache ist der konservative Ansatz nur geringe Modifikationen der Leitstruktur zu erproben. Der Vorteil dieser schmalen SAR besteht darin eine ganze Reihe aktiver hochpotenter Substanzen zu generieren und somit die Zahl der inaktiven Substanzen zu minimieren. Weiterhin kann mit dieser Strategie besonders effizient ermittelt werden, welche Substituenten für die Aktivität einer Substanzklasse verantwortlich sind und wo strukturell gesehen Potential für LADME-Optimierungen vorliegt (z. B. Ansatzstellen für Prodrug-Entwicklungen).



## 4.6 Speziesübergreifende Aktivitätsbestimmungen und mPGES-1 Assay

Generell ist die Portierung von Testsystemen von einer Spezies auf eine andere nicht immer trivial. Unterschiedliche Expressionsmuster, strukturell unterschiedliche Enzyme und Rezeptoren, ein veränderter Stoffwechsel, eine andere Anatomie und viele Faktoren mehr können sehr unterschiedliche Ergebnisse liefern, selbst wenn der Versuch an sich in beiden Spezies komplett identisch durchgeführt wurde. Insbesondere wird ein Substanzscreening aus Kosten- und ethischen Gründen in zellstrukturellen (z. B. enzymatischen) oder zellulären Versuchen durchgeführt. Diese Testsysteme adressieren für gewöhnlich das humane Zielmolekül (Ausnahmen sind natürlich die Entwicklung von Tiermedizin und antibakterieller, antiviraler, fungizider und ähnlicher Mittel). Im weiteren Verlauf der Entwicklung wird dann häufig auf *in vivo*-Testsysteme gewechselt, um komplexe Fragestellungen, wie Absorption, Verteilung, Metabolisierung, Exkretion und Toxizität untersuchen zu können.

Im Falle der mPGES-1-Wirkstoffentwicklung waren bereits im Vorhinein strukturelle Unterschiede des Enzyms zwischen der Spezies Mensch und Maus aber auch den meisten anderen Spezies bekannt. Alignments der Aminosäuresequenzen konnten zahlreiche nicht-identische Aminosäuren identifizieren. Mit der Aufdeckung der Kristallstruktur der mPGES-1 durch Jegerschöld et al.<sup>68</sup> konnten erstmals strukturelle Aspekte in Betracht gezogen werden. Pawelzik et al. konnten dadurch Aminosäuren am aktiven Zentrum identifizieren, die in den beiden Spezies Maus und Mensch unterschiedlich sind<sup>119</sup>. Dieser strukturelle Unterschied wird als Ursache angeführt, weshalb einige aktive Inhibitoren der humanen mPGES-1, die murine Variante nicht hemmen<sup>130, 138</sup>.

In dieser Arbeit wurde nun erstmals auf Grund dieser Interspeziesdifferenz ein systematisches Testverfahren angewandt, das sowohl das humane Enzym als auch die die murine Variante berücksichtigt. Dazu wurden zuerst alle Substanzen auf isoliertem humanem Enzym getestet, um diejenigen Substanzen auszusortieren, welche für eine Anwendung in weiteren humanen Testsystemen ungeeignet sind. In der nächsten Stufe wurden die aktivsten

Substanzen auf isoliertem Enzym zweier Nagetierzelllinien getestet. Der eingesetzte proinflammatorische Stimulus und die eingesetzte Proteinmenge wurden dazu auf die jeweilige Zelllinie abgestimmt. Verschiedene Arbeitsgruppen haben inzwischen spezialisierte mPGES-1-Assays veröffentlicht. Das mPGES-1-Enzym kann alternativ rekombinant in Bakterien oder Virus-transformierten Insektenzellen hergestellt werden<sup>139-140</sup>, was eine aufwändigere Aufreinigungsprozedur nach sich zieht, aber auch deutlich reineres Enzym liefert und insbesondere für High-Troughput-Screenings notwendig ist, wo möglichst geringe Assayvolumina und hohe Spezifität unabdingbar sind<sup>141</sup>. Häufig wird außerdem die Inkubationsdauer reduziert und der Versuch in 384 oder 1536 Lochplatten durchgeführt, um den Durchsatz stark zu erhöhen. Dazu kommen dann automatisierte Laborsysteme ins Spiel<sup>142</sup>. Insbesondere die Detektion des Produktes unterscheidet sich stark und ist ebenfalls stark an die technischen Voraussetzungen gebunden. Gut parallelisierbar sind EIA-basierte Methoden<sup>143-144</sup>, die von zahlreichen kommerziellen Anbietern als Detektionskit für unterschiedliche Matrices angeboten werden und ein Spektrophotometer zum Auslesen benötigen. Noch schneller sind Methoden, die keine Antikörperbindung benötigen und damit längere Inkubationszeiten vermeiden. Idealerweise wird das Substrat PGH<sub>2</sub> noch *in situ* generiert, was eine externe Zugabe des thermoinstabilen Substrats vermeidet.

Eine fluoreszenzbasierte Detektionsmethode wurde von David Percival vorgestellt<sup>145</sup>, bei der PGE<sub>2</sub> durch das Enzym 15-Prostaglandin Dehydrogenase (PGDH) zu 15-keto-PGE<sub>2</sub> umgesetzt wird. Die Reoxidation des dabei verbrauchten NADH zu NAD<sup>+</sup> mittels Diaphorase reduziert dabei Resazurin irreversibel zum rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin. Leveridge et al. konnten mit dieser Methode über 60.000 Substanzen pro Tag auf mPGES-1-Hemmung testen<sup>141</sup>, während mit EIA-Methoden etwa 10.000 Substanzen pro Tag getestet werden konnten<sup>142</sup>.

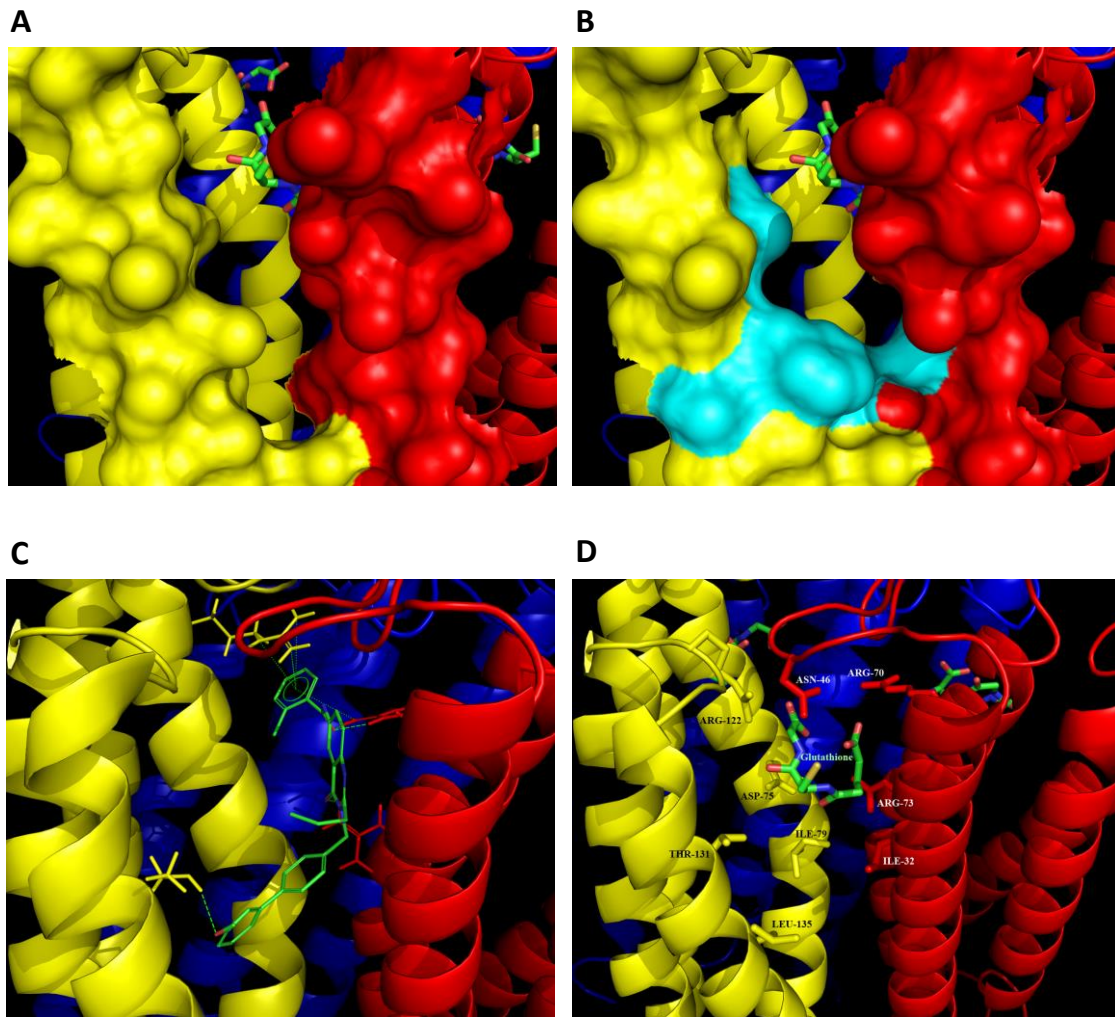
Eine weitere Detektionsvariante besteht im direkten Nachweis von PGE<sub>2</sub> mittels Massenspektrometrie. Im Vergleich zu spektrophotometrischen Methoden ist die Verwendung von Massenspektrometern deutlich langsamer und eignet sich

bislang nur begrenzt für Hochdurchsatzscreenings großer Substanzbibliotheken. Da die Analyten in der Regel aus den komplexen Assaymatrizes extrahiert und anschließend mittels HPLC aufgetrennt werden entsteht ein zusätzlicher Zeit- und Kostenaufwand. Die Methode bietet allerdings auch einige herausragende Vorteile: Heutige Massenspektrometer sind gegenüber spektrophotometrischen Methoden deutlich sensitiver, was die Detektion sehr niedriger Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> und anderen Fettsäuren in geringsten Probenvolumina ermöglicht, welche beispielsweise bei der Untersuchung von Spinalganglien, Synovialflüssigkeit, Liquor cerebrospinalis (CSF) oder Mikrodialysaten von Nagetieren üblich sind<sup>1, 146</sup>. Weitere Vorteile dieser markierungsfreien Detektionsmethode bestehen in der Eliminierung von spektrophotometrischen Interferenzen und zielmolekülspezifischen Aktivitätsbestimmung. Einer der größten Vorteile besteht außerdem in der Möglichkeit parallel mehrere Analyten in einer Probe quantifizieren zu können. Für ein initiales Screening ist diese Option unter Umständen noch vernachlässigbar, für eine spätere Substanzentwicklung und Charakterisierung aber von enormem Vorteil. So können (je nach Methode) beispielsweise nach *in vivo* Administration sowohl Substrat als auch Produkt und entsprechende Metabolite analysiert werden. Mit geeigneten Extraktionsmethoden können zudem unterschiedlichste Matrizes, wie z. B. Assay-Puffer, Zellkulturüberstände, Plasma, Gewebe, Urin etc. analysiert werden.

#### **4.6.1 Die mPGES-1 in Nagetieren – strukturelle Aspekte für das Wirkstoffdesign**

Die meisten *in vivo*-Versuche werden zurzeit mit den Nagetieren Maus und Ratte durchgeführt. Da sich die mPGES-1-Enzyme dieser beiden Spezies von der humanen Variante unterscheiden wurden die aktivsten Derivate beider Substanzklassen auf isoliertem Enzym getestet, um zu überprüfen, ob überhaupt eine speziesübergreifende Aktivität gewährleistet ist. Dabei zeigte sich, dass nur die Derivate der FR4-Klasse das Nagetierenzym hemmen konnten.

Das von mir erstellte Homologie-Modell von Maus und Ratte (siehe Kapitel 3.13) konnte die von Pawelzik. et al. aufgestellte These der strukturell unterschiedlichen Bindetasche für  $\text{PGH}_2$  und den Kofaktor GSH indes bestätigen. Insbesondere die Mutationen der Aminosäuren Leucin 135 und Alanin 138 im humanen Enzym zu Phenylalanin im Nagetier sowie Threonin 131 zu Valin an der Schnittstelle jeweils zweier Untereinheiten bewirkt eine veränderte Geometrie der Bindetasche in diesem Bereich. Eine Illustration der humanen und murinen Bindetasche in diesem Bereich ist in Abbildung 23 A+B gezeigt. Die Größe eines Inhibitors, der speziesübergreifend die mPGES-1 hemmen soll ist somit eingeschränkt. Insbesondere langgestreckte, rigide Moleküle passen unter Umständen nicht vollständig in die Bindetasche, was zu einer reduzierten Bindungsaffinität führen kann. Um diese These zu überprüfen wurde die Quinazolinon-Strukturklasse in die offene Konformation der humanen mPGES-1 gedockt (exemplarische Darstellung von FR20-Dev9 siehe Abbildung 23 C). Die dazu notwendige Generierung eines Homologie-Modells einer offenen Konformation war notwendig, da die veröffentlichte Kristallstruktur der humanen mPGES-1 die geschlossene Konformation darstellt, in der das aktive Zentrum nicht zugänglich ist (siehe Kapitel 3.12). Das Homologie-Modell wurde erstmals aus drei veröffentlichten homologen Kristallstrukturen erstellt. Neben der Kristallstruktur der geschlossenen Konformation wurden zwei Strukturen mit offenen Konformationen eingesetzt. Eine diente der Erstellung des Grundgerüsts und die andere zur Verbesserung der Auflösung.



**Abbildung 26:** Ausschnitte der Homologie-Modelle der offenen Konformationen von humaner (A) und muriner (B) mPGES-1. Gelbe und rote Bereiche entsprechen zwei distinkten Helizes jeweils einer Untereinheit der mPGES-1. Der türkise Bereich verkleinert in der murinen mPGES-1 die Bindetasche. (C) zeigt ein Docking von FR20-Dev9 in die humane mPGES-1. (D) Die wichtigsten Interaktionspartner zwischen mPGES-1 und den FR20-Liganden sind zusammen mit dem Kofaktor Glutathion dargestellt.

Da die Quinazolin-Strukturklasse systematisch daran scheitert, die Nagetier-mPGES-1 zu hemmen, wurden zur Aufklärung der Ursache Protein-Liganden-Interaktions-Fingerabdrücke (PLIF) mit dem humanen Enzym berechnet. Diese Technik ermittelt, welche Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand auftreten. Da der native Bindungsmodus der einzelnen Substanzen nicht bekannt ist (dazu müssten für jede Substanz NMR- oder Röntgenkristallstrukturen angefertigt werden), wurden zahlreiche Konformere generiert und nach einem Docking die PLIF-Methode angewendet.

Häufig auftretende Interaktionen ergeben somit in der Tat eine Art Fingerabdruck für diese Strukturklasse. Einige zentrale Ergebnisse konnten aus diesen Berechnungen abgeleitet werden:

1. Trotz struktureller Diversitäten in einer Wirkstoffklasse treten einige Interaktionen gehäuft auf.
2. Diese Interaktionen betreffen zumeist Bereiche des Liganden, die ohne Aktivitätsverlust nur begrenzt modifizierbar sind.
3. Es treten hauptsächlich lipophile Interaktionen auf, was eine Erklärung für die höhere Aktivität bei lipophileren Substanzen ist.
4. Die häufigsten Interaktionen bestehen für diese Strukturklasse mit Seitenketten in direkter Umgebung zum Kofaktor Glutathion und blockieren damit sowohl die Bindung des Substrats als auch die enzymatische Funktion.
5. Interaktionen mit den Aminosäuren Arginin 122, Threonin 131 und Leucin 135 sind nur mit der humanen mPGES-1 möglich, da diese Aminosäuren in Nagetieren mutiert sind.
6. Die Mutation Leucin 135 zu Phenylalanin verkleinert die Bindetasche an dieser Stelle und verhindert somit die Bindung von Substanzen in diesem Bereich, was als einer der Hauptgründe für den Aktivitätsverlust der Quinazolinon-Strukturklasse angeführt wird.

Die Entwicklung von speziesübergreifenden Wirkstoffen sollte diese Unterschiede mit bedenken. Eine bioinformatische Analyse der Bindungsmodi kann dabei helfen Leitstrukturen auszuwählen, die ein günstiges Interaktionsprofil aufweisen.

#### **4.7 Evaluierung von Zelltoxizität und zellulärer Aktivität von mPGES-1-Inhibitoren**

Eines der wichtigsten heutigen Ziele des Wirkstoffdesigns ist die Entwicklung verträglicher Medikamente. Aber was bedeutet „verträglich“? Die gängige Meinung dazu besagt: Leichte Erkrankungen mit geringer Symptomatik

verlangen nach Behandlungen unter denen der Patient möglichst wenige zusätzliche Belastungen erleiden muss. Niemand möchte beispielsweise bei der Einnahme von Medikamenten gegen leichte Kopfschmerzen Herz-Rhythmus-Störungen oder Haarausfall in Kauf nehmen. Bei der Therapie von schwerwiegenden Krankheiten mit ausgeprägter Symptomatik tolerieren wir zurzeit (noch) eher das Risiko von Nebenwirkungen. Bestes Beispiel sind hier Zytostatika, die zur Behandlung von Krebsleiden eingesetzt werden und teils heftige Nebenwirkungen auslösen können. Die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe zielt indes häufig nicht mehr ausschließlich auf die reine Ursachenbekämpfung oder Behandlung von Symptomen ab, sondern ebenso auf die Umgehung oder Modifizierung von Nebenwirkungen. Nebenwirkungen entstehen immer dann, wenn eine Therapie eine Körperfunktion ungewünscht beeinträchtigt. Eine unserer wichtigsten Funktionen des Körpers ist die Fähigkeit der Zellteilung. Sie ermöglicht die Erneuerung verschiedenster Zellen und Gewebe.

Da selbst der aktivste Wirkstoff schnell unbrauchbar wird, wenn er eine zellschädigende Wirkung aufweist (ausgenommen Zytostatika), ist einer der zentralen Tests auf „Verträglichkeit“ die Bewertung der Viabilität, Zytotoxizität oder Proliferation<sup>147-149</sup>. Verschiedene Teststrategien ermitteln dabei i) die Fähigkeit von Zellen Substrate durch enzymatische Aktivität zu metabolisieren; ii) die Intaktheit der Zellmembran; iii) den Nachweis apoptotischer bzw. nekrotischer Mechanismen iv) die Zellproliferationsfähigkeit<sup>150-151</sup>. An dieser Stelle sei angemerkt, dass neben klassischen *in vitro*-Testmethoden immer stärker alternative Methoden wie *in silico*-Toxizitätsvorhersagen und Profilbestimmungen (Toxikogenomik, Proteomik und Metabonomik) in den Vordergrund rücken<sup>152-158</sup>. *In-Silico*-Methoden nutzen dabei die immer größer werdende Informationsbasis, um Vorhersagen für strukturell ähnliche Moleküle zu treffen und sparen dabei den Einsatz teurer Laborprüfungen. Profilmethoden nutzen den Umstand der Miniaturisierung und Parallelisierung. So können mit spezialisierten Assays ganze Netzwerke (Genom, Transkriptom, Proteom) oder verschiedene Zelllinien simultan analysiert werden<sup>159</sup>.

In dieser Arbeit wurde der bekannte WST-1-Test ausgewählt, der in Kategorie i) fällt. Bei diesen Toxizitätsuntersuchungen wurde festgestellt, dass die Zellviabilität bis zu 10 µM Substanzkonzentration im Medium weder durch die Benzensulfonamid- noch durch die Quinazolinonsubstanzen eingeschränkt wurde. Diese Beobachtung trifft auf alle getesteten Derivate zu (Ausnahme FR20-Dev14) und ist somit ein allgemeines Merkmal dieser Grundgerüste. Bei höherer Konzentration (100 µM) wurde die Zellviabilität unterschiedlich stark eingeschränkt. Während die Quinazolinone kaum zellschädigende Wirkungen zeigten (Ausnahmen Derivate 11, 12 und 14) wurde eine Reduktion der Viabilität durch die Benzensulfonamide auf bis zu 50 % für die meisten der Derivate festgestellt. Auch hier sind die Effekte also größtenteils von der Wahl des Grundgerüsts abhängig. Die stärkste Einschränkung der Viabilität wurde für die Kontrollsubstanz Celecoxib bei dieser Konzentration beobachtet. Celecoxib enthält ebenfalls ein Sulfonamid-Motiv. Bereits seit 1946 ist bekannt, dass dieses Motiv zu zahlreichen Nebenwirkungen führen kann<sup>164-165</sup>. Insbesondere wurden Hypersensibilitäten gegenüber Sulfonamidantibiotika beobachtet<sup>166</sup>. Diese fällt in die Typ-1-Kategorie einer allergischen, antigenvermittelten IgE-Reaktion. Daneben wurden auch zahlreiche Hautreaktionen beobachtet<sup>167-168</sup>. Insbesondere die Arylamin-Gruppe an der N4-Position sowie heterozyklische Gruppen an der N1-Position könnten für diese Reaktion verantwortlich sein. Patienten mit einer solchen Arylamin-Sulfonamidunverträglichkeit zeigten keine Kreuzreaktionen mit Sulfonamiden ohne Arylamingruppe (wie z. B. Celecoxib)<sup>169-171</sup>. Die Sulfonamidgruppe scheint dabei selbst nicht für diese Nebenwirkungen verantwortlich zu sein. Statt dessen ist der Metabolismus der Sulfonamidstrukturen bei Patienten mit einer Unverträglichkeit möglicherweise eingeschränkt, weshalb toxische Metabolite nicht so schnell abgebaut werden können<sup>172</sup>. Die getesteten Benzensulfonamidderivate enthalten zwar keine Arylamin-Gruppe an der N4-Position, wohl aber aromatische Substituenten. Neben direkten toxischen Effekten könnte auch eine Hemmung der Zellproliferation (wie bei Celecoxib<sup>173</sup>) eine mögliche Erklärung für die Einschränkung der Zellviabilität sein.



Neben zellschädigenden Effekten wurde die Wirksamkeit der Substanzen auf zellulärer Ebene untersucht. Die Verteilung einer Substanz in Versuchen mit isolierten oder rekombinanten Enzymen erfolgt in der Regel nach einem 1-Kompartimentmodell, da nur ein Reaktionsraum zur Verfügung steht. Ein komplexeres Modell entsteht durch den Einsatz von lebenden Zellen - einem Mehrkompartimentmodell, bei dem die Zelle einen Raum und das umgebende Medium einen anderen Raum darstellt. Innerhalb der Zelle gibt es wiederum distinkte Kompartimente, wie Zellkern und Zytosol, Endoplasmatisches Retikulum, Lysosomen, Mitochondrien etc. Die Verteilung einer Substanz hängt zum einen von den physikochemischen Eigenschaften wie Lipophilität, Ladung, Größe etc. ab, aber auch von Transportproteinen der Zelle und von der Zusammensetzung und Art der Kompartimente. Die physikochemischen Eigenschaften und die damit verbundene Verteilung können in der Regel bereits bei der Wirkstoffsuche gut durch *in silico*-Methoden abgeschätzt werden<sup>174-176</sup>. Während hydrophile Wirkstoffe dazu neigen in wässrigen Kompartimenten zu akkumulieren, diffundieren lipophile Substanzen leichter in und über Zellmembranen und akkumulieren damit eher intrazellulär bzw. in lipophilen (Zell-)strukturen, wie Membranen oder fettreichem Gewebe. Größe und Ladung entscheiden häufig über einen aktiven oder passiven Transport über eine Membran. Die Zusammensetzung des hydrophilen Kompartiments (wässrige Puffer, Zellkultumedium, Blutplasma, etc.) kann ebenso einen maßgeblichen Einfluss auf die Verteilung haben. Insbesondere globuläre (Plasma-) Proteine wie Albumine können eine Vielzahl an Wirkstoffen binden und damit die effektive freie Wirkstoff-Konzentration stark absenken<sup>177</sup>. Zustand und Art einer Zelle bzw. von Zellverbänden und Geweben kann die Verteilung ebenfalls beeinflussen. Einflüsse wie erhöhte Temperatur, Sauerstoffgehalt, Gifte, Infektionen, Entzündungen und vieles mehr verändern die Expression und Zusammensetzung zahlreicher zellulärer und extrazellulärer Elemente. So wird beispielsweise bei einer lokalen Entzündung eine Ansäuerung des betroffenen Gewebes beobachtet<sup>178-179</sup>. Azide Substanzen wie z. B. Acetylsalizylsäure können daher gut an solchen Stellen akkumulieren.

Um die Auswirkungen von mPGES-1-Inhibitoren zu untersuchen wurden Versuche mit humanen Zellen durchgeführt. HeLa-Zellen werden in der Regel in einem komplexen Nährmedium gezüchtet, dem etwa 10 % Kälberserum hinzugefügt wird, wodurch eine nährstoff- und proteinreiche extrazelluläre Matrix simuliert wird. Weitere Vorteile sind eine hohe und konstante Proliferationsrate, quasi unbegrenzte Zellteilungen (Zervixkarzinomzellen), keine Ausdifferenzierung und Stresstoleranz. So war es möglich dem Medium zusätzlich IL1- $\beta$  und TNF $\alpha$  als proinflammatorische Mediatoren zuzusetzen, was nötig war, um die entzündungsabhängige Expression der mPGES-1 zu induzieren. Dies führt zu einer starken Bildung von Prostaglandin E<sub>2</sub> und Ausschüttung in den Extrazellulärraum. Die hochsensitive LC-MS/MS-Technologie wurde anschließend eingesetzt, um die PGE<sub>2</sub>-Konzentration quantitativ zu bestimmen.

Dabei wurde festgestellt, dass die getesteten Benzensulfonamid-Inhibitoren erst ab 10  $\mu$ M Konzentration im Assay eine leichte Hemmung, und ab 100  $\mu$ M eine totale Hemmung der mPGES-1 bewirken. Da bei 100  $\mu$ M Substanzkonzentration allerdings auch eine Einschränkung der Zellproliferation beobachtet wurde, muss davon ausgegangen werden, dass der hemmende Effekt zumindest zu einem gewissen Anteil auf cytotoxische Effekte zurückzuführen ist.

Die Quinazolin-Strukturklasse hemmte in diesem Versuch die PGE<sub>2</sub>-Synthese bereits bei 1  $\mu$ M Substanzkonzentration. Bei 10  $\mu$ M wurde bereits eine maximale Hemmung nahe 100 % beobachtet. Die Kontrollsubstanz Celecoxib hemmte in diesem Versuch die PGE<sub>2</sub>-Synthese bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M zu 100 %.

Der hohe Anteil an Serumproteinen im Zellkulturmedium könnte einer der Hauptursachen für die vergleichsweise niedrige Aktivität dieser Substanzklasse auf zellulärer Ebene sein, was zu einer Verringerung der freien (und damit wirksamen) Konzentration führt. Indolcarboxylsäure-basierte Inhibitoren, wie das bekannte MK-886 und entsprechende Derivate zeigen ebenfalls eine deutliche Verschiebung der inhibitorischen Potenz zwischen enzymbasierten und zellulären Versuchen<sup>74</sup>. Auch die Klasse der Phenanthren-Imidazol-

basierten Inhibitoren<sup>73, 180</sup>, sowie die daraus abgeleiteten Harnstoff-basierten Inhibitoren zeigen eine deutliche Verschiebung<sup>181</sup>.

Um diese Theorie zu bestätigen wurden Aktivitätsversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an Serumproteinen evaluiert. Dabei wurde allerdings beobachtet, dass sich dieser Parameter im verwendeten Zellassay nicht ohne weiteres verändern lässt, da zum einen die Zellproliferation divergiert und zum anderen das Substrat PGH<sub>2</sub> und/oder der Kofaktor Gluthation ebenfalls mit den Serumproteinen interagieren. Eine unterschiedliche Zellproliferation könnte unter Umständen noch durch eine Normierung auf die Zellzahl ausgeglichen werden (was ein größeres Assayformat bedingt), Substrat- und Kofaktorabhängigkeiten genau zu bestimmen erfordert allerdings einiges an Aufwand.

Alternativ kann statt einem Aktivitätsassay mit unterschiedlichen Plasmaproteinkonzentrationen direkt das Verhältnis zwischen ungebundenem Wirkstoff zu Serum-gebundenem Anteil bestimmt werden. Klassische Methoden lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Solche, die eine Separation von gebundenem und ungebundenem Wirkstoff benötigen und Methoden, die keine Trennung benötigen<sup>177</sup>. Zur ersten Gruppe zählen Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. *surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR-Spektroskopie), Kapillarelektrophorese, NMR, Fluoreszenzspektroskopie, zur zweiten Gruppe Methoden wie Ultrazentrifugation, Ultrafiltration, Mikro dialyse und der gängige "Gold Standard" Equilibrium-Dialyse mit LC-MS/MS-Quantifizierung<sup>182-183</sup>. Diese Methoden bestimmen sehr genau die freie Wirkstoffmenge liefern aber keine Aussagen über die Aktivität von Testsubstanzen in zellbasierten Systemen. Die verringerte Aktivität der mPGES-1-Inhibitoren könnte auch auf eine Instabilität im eingesetzten Medium, Wirkstoffakkumulation in Zellkompartimenten, Zelltransporter-vermittelte Ausschleusung der Wirkstoffe aus der Zelle bzw. umgekehrt niedrige Zellmembran-Permeabilitätsraten in die Zelle usw. als Ursache haben.

Statt all diese Parameter einzeln zu bestimmen wurde ein weiteres zellbasiertes System gewählt (Vollblut), bei dem die Konzentration an Serumproteinen exakt den physiologischen Bedingungen im Mensch entspricht.

## 4.8 Modulation der Arachidonsäurekaskade in komplexen Testsystemen

Die Arachidonsäurekaskade ist eines der komplexesten fettsäurebasierten Systeme im menschlichen Körper mit einer weiten physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung<sup>42,184</sup>. Die Entwicklung pharmakologisch aktiver Substanzen in diesem Umfeld gestaltet sich deshalb ebenso komplex, da jedes Zielmolekül Teil eines großen Netzwerkes ist, welches zahlreiche andere Mediatoren, Kofaktoren, Enzyme und Rezeptoren umfasst. Da viele dieser Fettsäuremediatoren einen hohen Grad an struktureller Ähnlichkeit aufweisen, können Kreuzreaktionen auftreten, denn traditionelle Wirkstoffe (Nicht-Biologika) stellen häufig Substrat- bzw. Kofaktor-Mimetika dar.

Hinzu kommt eine strukturelle Homologie einiger Wirkstoffziele. So gehört die mPGES-1 beispielsweise zur selben Proteinfamilie (MAPEG) wie die Enzyme FLAP, LTC4S und MGST2 - alle sind Teil der Arachidonsäurekaskade, die katalysierten Fettsäuren haben aber sehr unterschiedliche Funktionen<sup>185</sup>.

Ein hoher Grad an Homologie (egal ob auf Liganden- oder Rezeptorseite) stellt besondere Anforderungen an das Wirkstoffdesign, denn neben Wirkungen, die durch eine Beeinflussung des Zielmoleküls entstehen (Target-Effekte), spielen insbesondere "Off-Target"-Effekte eine wichtige Rolle. Sind diese strukturell verwandten Strukturen allerdings bekannt und entsprechende Testsysteme etabliert können bereits in der frühen Phase der Wirkstoffentwicklung erste Nebenwirkungsprofile erstellt werden.

Die Entwicklung von mPGES-1-Inhibitoren sollte insbesondere abklären, ob neben der mPGES-1 auch die in der Kaskade darüber (vertikal) befindlichen Isoenzyme COX-1 und COX-2, sowie die horizontal befindlichen Enzyme Prostaglandin D Synthase (PTGDS, EC 5.3.99.1), Prostaglandin-I Synthase (PTGIS, 5.3.99.4), Thromboxan-A Synthase (TBXAS1, 5.3.99.5), Prostaglandin F<sub>2α</sub> Synthase (FAM213B, EC 1.11.1.20) bzw. deren Produkte, beeinflusst werden. Da das Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierende Protein (FLAP) zur gleichen Proteinfamilie gehört wie die mPGES-1 sollte außerdem überprüft werden, ob hier eine Beeinflussung vorliegt.

Eine Hemmung der COX-1 und/oder COX-2 würde bedeuten, dass nicht eindeutig zwischen Cyclooxygenase- bzw. mPGES-1-vermittelten Effekten unterschieden werden kann, da beide auf derselben Reaktionslinie liegen und zur Generierung des Endpunkts (PGE<sub>2</sub>) beitragen. Damit würde sich auch das Nebenwirkungsprofil sehr wahrscheinlich nur unwesentlich im Vergleich zu selektiven COX-Hemmern ändern, da neben der gewünschten Reduktion des PGE<sub>2</sub>-Levels auch eine Reduktion der anderen Prostanoiden zu erwarten ist.

Da beide Isoformen das gleiche Produkt (PGH<sub>2</sub>) erzeugen, wurde in dieser Arbeit jeweils ein Versuch mit rekombinantem Enzym durchgeführt und die direkte Hemmung bestimmt. Dabei wurde für beide Wirkstoffklassen keine oder eine sehr niedrige Hemmung der beiden Cyclooxygenasen festgestellt. Die leichten Unterschiede deuten darauf hin, dass bereits kleine strukturelle Modifikationen der Wirkstoffe sehr großen Einfluss auf die Hemmung der Cyclooxygenasen haben. In den SAR-Analysen der Benzo[g]indol-3-Carboxylate<sup>186</sup>, sowie der Pirinixinsäure-Derivate<sup>187</sup> von Koeberle et al. wird dies ebenso beobachtet.

Eine der größten Schwierigkeiten bei der Entwicklung von mPGES-1-Inhibitoren ist sicherlich das fein balancierte System der Arachidonsäure-Fettsäuremediatoren. So werden alle Mediatoren letztendlich aus ein und derselben Fettsäure gebildet - der Arachidonsäure. Über mehrere Zwischenschritte, die meist chemisch instabile Zwischenprodukte darstellen (wie z.B. PGH<sub>2</sub>), werden deutlich stabilere Fettsäuren gebildet. Wird nun pharmakologisch ein oder mehrere Enzyme in diesem System gehemmt, kann es zu einem Abwandern von Substrat in andere Zweige des Systems und letztendlich zu einer Veränderung von Mediatorleveln kommen, die gar nicht primär vom Wirkstoff beeinflusst werden. Diese Beobachtung wird als so genannter "Shunting"-Effekt bezeichnet und wurde unter anderem von Brenneis et al.<sup>70</sup>, Kamei et al.<sup>39</sup>, Trebino et al.<sup>188</sup>, Boulet et al.<sup>189</sup>, Cheng et al.<sup>190</sup> und kürzlich von Idborg et al.<sup>191</sup> beschrieben. In allen Studien werden Knockout-Tiere bzw. -Zellen verwendet und ein Lipidprofil verschiedener Gewebe bzw. Zellen analysiert. Die Ergebnisse sind allerdings unterschiedlich. Brenneis et al. stellten fest, dass in peritonealen Makrophagen das Level aller terminalen

Prostanoide (TXB<sub>2</sub> [stabiler Metabolit von TXA<sub>2</sub>], PGF<sub>2α</sub>, 6keto-PGF<sub>1α</sub> [stabiler Metabolit von PGI<sub>2</sub>] und PGD<sub>2</sub>) erhöht ist, wenn die mPGES-1 nicht vorhanden ist. In Rückenmarksgewebe konnte dahingegen nur eine Erhöhung des TXB<sub>2</sub>- und PGF<sub>2α</sub>-Levels gemessen werden, in Rückenmarkszellkulturen eine Erhöhung von PGF<sub>2α</sub>, 6keto-PGF<sub>1α</sub> und PGD<sub>2</sub>), nicht aber von TXB<sub>2</sub>.

Cheng et al. konnten wiederum feststellen, dass vor allem der PGI<sub>2</sub>-Metabolit 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> (PGIM) im Urin von mPGES-1-Knockoutmäusen erhöht ist, nicht aber der TXB<sub>2</sub>-Metabolit 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub> (TXM).

Boulet et al. konnten in Makrophagen ohne mPGES-1 eine nicht-signifikante Erhöhung des TXB<sub>2</sub>-Levels und eine signifikante Erhöhung des PGF<sub>2α</sub>-Levels messen. Die Gruppe analysierte außerdem die Prostanoidlevel verschiedener Gewebe von Mäusen nach LPS-Injektion. Im Magen wurde eine signifikante Erhöhung von TXB<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> gemessen, in der Niere eine Erhöhung von PGD<sub>2</sub> (signifikant) und tendenziell von 6-keto-PGF<sub>1α</sub>. Die Prostanoid-Level im Gehirn, Herz, Lunge und Milz waren dahingegen nicht verändert.

In all diesen Arbeiten wurden Knockoutmodelle eingesetzt, die eine mehr oder weniger starke Reduktion des PGE<sub>2</sub>-Levels zur Folge haben. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass diese Tiere während ihrer kompletten Entwicklung bereits ein mPGES-1-Defizit aufwiesen und daher eine Adaption des Organismus bzw. eine veränderte Entwicklung nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Eine 100%ige Übertragbarkeit auf Anwendungen mit einem Pharmakon, welches nur zeitweise eingesetzt wird, ist daher nicht unbedingt gegeben.

In dieser Arbeit wurde deshalb das Prostanoid-Level und verschiedener Leukotriene und HETEs in humanem Vollblut unter Einfluss von mPGES-1-Inhibitoren untersucht. Letztere spielen bei der Vermittlung entzündlicher Prozesse ebenfalls eine sehr wichtige Rolle<sup>41, 43, 192-193</sup>.

Neben physiologischen Parametern wie pH-Wert, Salzgehalt, Zusammensetzung der Zellen usw. bietet humanes Blut vor allem den Vorteil eine moderate Anzahl an Substanzen in einem komplexen Testsystem untersuchen zu können ohne *in vivo*-Versuche durchführen zu müssen. Nachteilig ist die begrenzte Verfügbarkeit frischen Blutes, kurze

Verarbeitungszeit (insbesondere auf Grund der raschen Koagulation) und die individuelle Zusammensetzung des Blutes je nach Spender. Die Zusammensetzung des Blutes hängt von vielen Faktoren ab: Alter, Geschlecht, Gesundheitsstatus, Ernährung (ein fettreiches Essen vor der Blutabnahme verändert den basalen Fettsäurespiegel dramatisch!) usw. Geschlechtsabhängige Varianzen der Leukotrienbiosynthese wurden bereits von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Oliver Werz beschrieben<sup>194-195</sup>. Hormonelle Varianzen (z. B. bedingt durch eine Schwangerschaft) führen ebenfalls zu einer veränderten Leukotrienbiosynthese<sup>196</sup> und sollten bei Therapien mit entsprechenden Wirkstoffen bedacht werden. In einer klinischen Studie müsste deshalb besonders darauf geachtet werden, eine inhomogene Zusammensetzung der Testgruppen zu gewährleisten. Eine Reduktion auf nur ein Geschlecht wäre in diesem Zusammenhang kontraproduktiv, wenn das Medikament von beiden Geschlechtern angewendet werden soll.

Um entsprechende Effekte auszugleichen wurden in den hier vorgestellten Vollblutexperimenten die Kontrollproben und Wirkstoffproben mit dem selben Blut behandelt und statt absoluten Zahlen relative Werte verwendet.

Eine konzentrationsabhängige Reduktion des PGE<sub>2</sub>-Levels konnte für die Hälfte der Benzensulfonamid-Derivate beobachtet werden und für fast alle Derivate mit Quinazolinon-Grundgerüst, was auf die starke inhibitorische Potenz der Quinazolinon-Derivate zurückzuführen ist. Die Vollblutergebnisse sind mit den zellbasierten Ergebnissen mit wenigen Ausnahmen vergleichbar. So ist die potenteste Struktur, in Bezug auf Hemmung der zellulären PGE<sub>2</sub>-Synthese FR4-Dev9, in humanem Vollblut inaktiv. Die stärkste PGE<sub>2</sub>-Reduktion wurde für das Derivat FR4-Dev6 beobachtet. Die verhältnismäßig geringen Unterschiede der Quinazolinon-Derivate in Bezug auf inhibitorische Potenz decken sich mit den Versuchen auf isolierter mikrosomaler Fraktion und den zellbasierten Versuchen. Interessanterweise induzierte das Derivat FR20-Dev6 die PGE<sub>2</sub>-Synthese deutlich - ein Effekt, der im zellbasierten Testsystem nicht beobachtet wurde. Strukturell unterscheidet sich das Derivat zur aktiven Leitstruktur nur durch eine Modifikation eines *meta*-Chloratoms zu einem *para*-Chloratom,

weshalb bei der Auswahl weiterer Derivate dieser Substanzklasse auf Substanzen mit *para*-Chlorsubstituenten verzichtet wurde.

Beide Substanzklassen reduzierten das Level der Prostanoiden TXB<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> nicht. PGD<sub>2</sub> wurde lediglich von zwei Benzensulfonamidderivaten reduziert, Prostacyclin war im Blut nicht ausreichend detektierbar.

Die beiden proinflammatorischen Mediatoren LTB<sub>4</sub> und 5(S)-HETE wurden von zwei Benzensulfonamid-Derivaten reduziert und einem Derivat induziert, während die Quinazolinonklasse wiederum so gut wie keinen Effekt auf die Level dieser Fettsäuren ausübt (Ausnahme wiederum FR20-Dev6). Die beiden Fettsäuren 12(S)-HETE und 15(S)-HETE, die nicht über das Intermediat 5(S)-HPETE gebildet werden, wurden von keiner der getesteten Substanzen beeinflusst.

Drei zentrale Ergebnisse können aus diesen Studien abgeleitet werden.

1. Die vorgestellten mPGES-1-Inhibitoren sind (mit wenigen Ausnahmen) selektiv in Bezug auf die Prostanoidkaskade. Somit kann auf molekularer Ebene der Vorteil eines mPGES-1-Inhibitors gegenüber COX-1/2-Inhibitoren bestätigt werden.

2. Der zuvor beschriebene "Shunting"-Effekt wurde in humanem Vollblut für diese beiden Substanzklassen nicht beobachtet. Diese Beobachtung kann deshalb aber nicht automatisch auf andere Substanzklassen oder *in vivo*-Systeme übertragen werden. Die zuvor vorgestellten Ergebnisse mit Knockout-Tieren geben den dringenden Hinweis, dass dieser Effekt sowohl stimulus- als auch gewebeabhängig ist. Wirkstoffe mit einem dedizierten günstigen Verteilungsprofil oder einer lokalen Administration könnten somit negative Umverteilungsprozesse der Prostanoiden umgehen bzw. deren Effekte reduzieren.

3. Die Hemmung der proinflammatorischen Mediatoren LTB<sub>4</sub> und 5(S)-HETE ist substanzabhängig und wurde nur bei einigen Derivaten der Benzensulfonamidklasse beobachtet. Eine dualinhibitorische (mPGES-1/5-LO) Funktion könnte in Bezug auf den therapeutischen Nutzen aber auch von Vorteil sein und einen synergistischen Effekt bewirken. Der bekannte Wirkstoff Celecoxib hemmt neben der COX-2 auch das Enzym 5-LO<sup>197</sup>. Mehrere



Arbeitsgruppen haben diese Thematik nun aufgegriffen und entwickeln gezielt Wirkstoffe mit mehr als einem Zielmolekül<sup>79-82, 187, 198-201</sup>.

#### **4.9 *In Vivo*-Pharmakologie von mPGES-1-Inhibitoren**

Molekulare, enzymatische und zellbasierte Testsysteme eignen sich bestens für ein Screening nach neuen Wirkstoffen, eine strukturelle Exploration, Bestimmung von Zielmolekülen und molekularen Mechanismen, der Optimierung physikochemischer Parameter, Bestimmung der Zelltoxizität, Erstellung von erwarteten Wirkungs- und Nebenwirkungsprofilen und vielem mehr. Leider lassen sich mit diesen Testsystemen nur bedingt Aussagen über die Wirksamkeit bei komplexen pathologischen Erkrankungen und insbesondere der physischen und psychischen Wahrnehmung der Symptomaten treffen. Auch können soziologische Folgen einer schweren Erkrankung (wie z. B. Morbus Crohn) bislang nicht in einfachen niedrigkomplexen Testsystemen adressiert werden.

Wahrnehmungen wie Schmerzen sind zudem einer individuellen Bewertung unterlegen und die Endpunktbestimmung einer Behandlung (z. B. Schmerzreduktion von Stufe 8 auf 4 auf einer numerischen Rating-Skala) kann nur in lebenden Organismen durchgeführt werden. Auch die Evaluation der sogenannten LADME-Parameter (Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion) kann größtenteils nur in höheren Organismen mit Organsystemen untersucht werden. Anzumerken ist an dieser Stelle allerdings, dass einige dieser Parameter mittlerweile gut durch *in vitro*-Methoden und zunehmend auch immer besser durch *in silico*-Berechnungen *abgeschätzt* werden können<sup>202-208</sup>.

Verschiedene Gruppen untersuchen zur Zeit unterschiedliche mPGES-1-Inhibitoren in verschiedenen pathologisch relevanten *in vivo*-Tiermodellen. Diese orientieren sich an den bekannten Funktionen von Prostaglandin E<sub>2</sub>. So werden vornehmlich inflammatorische, analgetische und antipyretische Modelle eingesetzt (z. B. Zymosan- und Carrageen-Entzündungsmodelle, Kollagen-induziertes Arthritis-Modell (CIA), *Air-Pouch*-Modell, Essigsäure-

Schmerzmodell, *Hot Plate*-Modell, LPS-induziertes Fiebermodell, etc.). Untersuchungen zur Wirksamkeit in verschiedenen Krebsformen stehen noch aus. Eine zusätzliche Schwierigkeit bei *in vivo*-Versuchen zur mPGES-1 besteht in der unterschiedlichen Aminosäurekomposition zwischen dem humanen Enzym und dem gängiger eingesetzter Tierspezies (Maus, Ratte). Da alle mPGES-1-Wirkstoffe mit dem Ziel "Mensch" entwickelt werden, können diese Tierspezies nicht eingesetzt werden, denn die meisten dieser Substanzen hemmen nicht die murine mPGES-1. PF-9184 zeigt beispielsweise eine hohe Aktivität auf rekombinantem humanem mPGES-1-Enzym (IC<sub>50</sub> von 16.5 nM), verliert aber deutlich an inhibitorischer Potenz auf dem Enzym der Ratte (IC<sub>50</sub> von 1080 nM) und ist *in vivo* in einem Ratten-Entzündungsmodell ("Air Pouch") gänzlich inaktiv<sup>138</sup>. Eine Serie an Phenanthrenimidazol-Inhibitoren um die Leitstruktur MF63 zeigte ebenfalls eine hohe Aktivität sowohl auf dem humanen Enzym als auch dem des Meerschweinchens und in humanen Vollblutversuchen, kann aber wiederum weder die mPGES-1 aus Maus noch Ratte hemmen<sup>130</sup>.

Zur Zeit werden drei unterschiedliche Lösungsstrategien eingesetzt:

1. *In Vivo*-Versuche werden mit Spezies durchgeführt, deren mPGES-1-Protein mit dem humanen Protein deutlich homologer sind als Maus- und Ratten-mPGES-1. Dazu zählt vor allem das Meerschweinchen. Da aber die meisten Schmerz- und Entzündungsmodelle für die Spezies Ratte und Maus entwickelt wurden sind nur wenige Machbarkeitsstudien etabliert.
2. Die murine mPGES-1 wird in speziellen Zuchtstämmen durch ein Knockin-Verfahren mit dem humanen Enzym ersetzt. Der Prozess ist allerdings aufwändig und die resultierenden Tierstämme stehen nicht allen Einrichtungen zur Verfügung.
3. Bei der Entwicklung der Inhibitoren wird auf eine Dualspezieshemmung geachtet. Insbesondere Naturstoffextrakte und deren aktive Komponenten hemmen häufig mehrere Zielmoleküle der Entzündungskaskade und zeigen eine geringere Speziesabhängigkeit.

Côté et al. verwenden ein LPS-induziertes Hyperalgesiemo­dell mit Meerschweinchen<sup>73</sup> und konnten mit der Substanz MF63 eine vollständige Blockade der induzierten Hyperalgesie bei einer Dosis von 100 mg/kg beobachten. Xu et al. konnten eine Knockinmaus mit der humanen mPGES-1 züchten und auch dort den schmerzreduzierenden Effekt von MF63 bestätigen. Ebenfalls schmerzreduzierend wirkte die Substanz in einem chronischen Schmerzmodell (Osteoarthritis, OA). Außerdem konnte in einem Fiebermodell die antipyretische Wirkung bestätigt werden<sup>130</sup>. Koeberle et al. konnten für den Dualspeziesinhibitor YS121 sowie die Wirkstoffe der Benzo[g]indol-3-Carboxylat-Strukturklasse eine *in vivo*-Wirksamkeit in einem Karrageen-induzierten Pleuritismodell auf molekularer und immunologischer Ebene zeigen<sup>79</sup>. 1H-Benzo[g]indole-3-Carboxylat konnte außerdem ein Karrageen-induziertes Pfotenödem reduzieren<sup>186</sup>. Verschiedene Naturstoffe und Naturstoffderivate wurden auf Grund ihrer antiinflammatorischen Wirkung ebenfalls auf mPGES-1 Hemmung *in vitro* und *in vivo* untersucht<sup>209-210</sup>. Extrahierte Derivate der Krameria­wurzeln (*Krameria lappacea*) werden zur Behandlung von Entzündungen des Oropharynx (Mundteil des Rachens) eingesetzt und zeigten in einem Crotonöl-induzierten Mausohrdermatitis-Modell eine entzündungshemmende Wirkung. Die Wirkung ist allerdings nicht allein auf eine mPGES-1-Hemmung zurückzuführen, denn die Bestandteile des Extrakts wirken auf zahlreiche Entzündungsmediatoren bzw. -aktivatoren<sup>211</sup>.

#### **4.9.1 Evaluierung der speziesübergreifenden mPGES-1-Hemmung von Benzensulfonamid- und Quinazolinonderivaten**

Die potentesten Substanzen beider Strukturklassen wurden dahingehend untersucht, ob sie neben der bereits gezeigten Inhibition der humanen mPGES-1 auch das murine Enzym hemmen. Dazu wurden zwei Nagetierzelllinien (RAW 264.7 und NIH 3T3) mit proinflammatorischen Mediatoren stimuliert, um die mPGES-1-Expression zu steigern. Anschließend wurde die mikrosomale Fraktion extrahiert und mit den Wirkstoffen in einem mPGES-1-Assay inkubiert.

Die getesteten Substanzen der Benzensulfonamidklasse hemmten alle auch die murine mPGES-1 mit einer vergleichbaren inhibitorischen Potenz, während für die Quinazolinonklasse eine stark reduzierte Hemmung oder ein vollständiger Aktivitätsverlust beobachtet wurden. Eine Gruppe um Park et al. veröffentlichte kürzlich ihre Screeningergebnisse, in denen ebenfalls eine Benzensulfonamidsubstanz getestet wurde und die strukturell starke Ähnlichkeit mit den hier vorgestellten Substanzen zeigt. Diese Substanz zeigte ebenfalls eine Hemmung der murinen mPGES-1<sup>212</sup>. Somit ist eine speziesübergreifende Hemmung stark von der Wahl der Strukturklasse abhängig, was einen gemeinsamen Bindemodus der Substanzen innerhalb dieser Wirkstoffklasse nahelegt.

Die Derivate der Benzensulfonamidklasse eignen sich somit prinzipiell für Untersuchungen mPGES-1-relevanter Erkrankungen in Nagetieren. Quinazolinon-basierte Wirkstoffe erfordern Tiermodelle mit der humanen mPGES-1 (Knockin-Tierstämme) oder strukturell stark homologen Varianten (chimäre Tierstämme bzw. Meerschweinchen oder Primaten).

#### **4.9.2 Selektion eines Dualspezies-mPGES-1-Inhibitors für pharmakologische *in vivo*-Untersuchungen**

Der große Vorteil von Dualspezies-Inhibitoren liegt in der Anwendung in Tiermodellen. So kann der Wirkstoff für eine Anwendung am Menschen optimiert werden und trotzdem können unerlässliche Fragestellungen am Tiermodell untersucht werden. Die Bezeichnung "Dualspezies-Inhibitor" bezieht sich hierbei auf eine Hemmung des humanen Enzyms und zusätzlich des Nagetier-Enzyms (und hier auch nur Maus und Ratte). Andere etablierte Tiermodellspezies, wie z. B. Hunde sind eine zusätzliche Option. Bei diesem Vorgehen entsteht allerdings der zusätzliche Aufwand, jede noch so kleine strukturelle Veränderung immer in zwei Testansätzen durchführen zu müssen. Ansonsten besteht die Gefahr plötzlich einen Wirkstoff designt zu haben, der nur noch in einer Spezies aktiv ist. Eine weitere Einschränkung besteht darin nur solche Wirkstoffe weiterzuverfolgen, deren Potenz zwischen zwei Spezies

in einer vergleichbaren Größenordnung liegt. Eine zu große Differenz macht die Übertragbarkeit von Ergebnissen vom Tiermodell zum Mensch extrem schwierig. Insbesondere pharmakologische Kernparameter wie Blutplasmaspiegel, effektive Dosis und Toxizität / Nebenwirkungen benötigen eine verlässliche Datengrundlage.

Die Auswahl eines mPGES-1-Inhibitors zur Untersuchung pharmakologischer Fragestellungen richtete sich nach folgenden Kriterien:

1. Effektivität: Die inhibitorische Wirkstärke spielt insbesondere deshalb eine extrem wichtige Rolle, weil in der Regel davon ausgegangen werden kann, dass der Inhibitionskoeffizient mit der Zunahme an Komplexität des Testsystems sinkt.
2. Selektivität: Wirkstoffe, die neben dem gewünschten Zielmolekül eine Vielzahl anderer Zielmoleküle beeinflussen, steigern das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen. Eine Hemmung mehrerer Zielmoleküle mit synergistischen Wirkungsprofilen kann aber auch gerade erwünscht sein.
3. Robustheit: Instabile Substanzen erschweren eine weitere Entwicklung. Thermoinstabile Substanzen können eventuell nicht sterilautoklaviert werden, photolabile Substanzen müssen immer in dunklen Gefäßen aufbewahrt werden, säureinstabile Substanzen verlangen spezielle Formulierungen, um eine Zersetzung im Magen zu verhindern usw.
4. Toxizität: Verschiedene zellschädigende Mechanismen können bereits *in vitro* gut untersucht werden. Vor einer Anwendung am Menschen können zusätzliche Tests notwendig sein, die das Risiko von schweren Nebenwirkungen reduzieren. So kann beispielsweise die Genotoxizität, die Hemolyse, hERG-Cardiotoxizität, Phospholipidose und einiges mehr mit standardisierten Methoden geprüft werden.
5. Synthetisierbarkeit: Der tollste Wirkstoff wird unter Umständen unbrauchbar, wenn es keine praktikable Syntheseroute mit hohen Ausbeuten gibt. Hier stehen häufig ökonomische Aspekte und Ressourcen im Vordergrund.

In dieser Arbeit wurde der Wirkstoff FR4-Dev6 für *in vivo*-Untersuchungen ausgewählt. Er gehört zur Strukturklasse der Benzensulfonamide, welche eine

Dualspezieshemmung gezeigt hat. Damit wurden Untersuchungen an Nagetieren überhaupt erst möglich, was die komplette Quinazolinonstrukturklasse für diese Untersuchungen disqualifizierte, da sie nur die humane mPGES-1 hemmen. In Bezug auf inhibitorische Wirkstärke zeigte die Substanz einen  $IC_{50}$  von etwa 10  $\mu\text{M}$  auf isolierter mikrosomaler Fraktion, was im Vergleich zu anderen Derivaten vergleichsweise hoch ist. Im zellbasierten Aktivitätsassay konnte aber bei 10  $\mu\text{M}$  Substanzkonzentration noch eine deutliche Hemmung der  $\text{PGE}_2$ -Synthese gemessen werden (bei 100  $\mu\text{M}$  wurde eine vollständige Hemmung beobachtet). FR4-Dev6 konnte außerdem in humanem Vollblut konzentrationsabhängig das  $\text{PGE}_2$ -Level reduzieren (von etwa 85 % Restaktivität bei 1  $\mu\text{M}$  zu 39 % bei 100  $\mu\text{M}$ ). Das Fettsäureprofil von FR4-Dev6 in humanem Vollblut zeigte keine Beeinflussung der anderen Prostanoiden ( $\text{TXB}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGD}_2$ ) sowie von 12(S)-HETE und 15(S)-HETE, dafür aber eine günstige zusätzliche Hemmung von  $\text{LTB}_4$  und 5(S)-HETE. FR4-Dev6 hemmte bei 10  $\mu\text{M}$  nur sehr schwach die Cyclooxygenasen-1 und -2 (COX-1: 10 %, COX-2: 19 %) und zeigte keine Einschränkung der Zellviabilität bei dieser Konzentration. Nachteilig sind die vergleichsweise niedrige Wirkstärke (erfordert eine hohe Dosis) und die hohe Lipophilie (LogP von  $5,56 \pm 0,36$ , berechnet mit ACD/ChemSketch, Version 12.01). Der LogP-Wert von FR4-Dev6 ist allerdings deutlich niedriger als der anderer Derivate. So hat beispielsweise die wirkstärkste Substanz FR4-Dev28 (niedrigster  $IC_{50}$  auf isolierter mikrosomaler Fraktion) einen LogP von  $7,41 \pm 0,39$ . Außerdem konnte FR-Dev28 das  $\text{PGE}_2$ -Level in humanem Vollblut nur um 30 % senken (100  $\mu\text{M}$ ).

#### **4.9.3 Entwicklung einer Formulierung zur oralen und parenteralen Applikation von FR4-Dev6**

Da ein medizinischer Wirkstoff alleine noch kein Medikament ist, benötigt er eine Formulierung. Diese ist eine Zusammensetzung von Hilfsstoffen, in die der Wirkstoff eingebettet wird und die Applikation des Wirkstoffs erleichtert. Je nach Applikationsform (z. B. oral, intravenös, transdermal, subkutan etc.) kann die Formulierung die Anwendung erleichtern (z. B. Cremes für eine Anwendung auf

der Haut) oder anders ausgedrückt bedingen einige Anwendungen die Zusammensetzung der Formulierung (z. B. flüssige Darreichungsformen bei intravenöser Injektion). Die Formulierung hat aber auch maßgeblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und Stabilität des Wirkstoffs. Überzogene Tabletten können so eine Resistenz gegen die Magensäure bilden und damit den Wirkstoff schützen. Nano- bzw. Mikroemulsionen können die Aufnahme des Wirkstoffs deutlich erhöhen, da die einzelnen enthaltenden Domänen (mit dem Wirkstoff) im Durchmesser sehr klein sind und damit die Membrangängigkeit und Verteilung erleichtert wird<sup>213</sup>.

Die Entwicklung einer Formulierung für präklinische Untersuchungen am Tier folgte den Empfehlungen der European Federation of Pharmaceutical Industries Associations (EFPIA) and the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), die für verschiedene Tierspezies das Administrationsvolumen je nach Applikationsroute empfehlen<sup>109</sup>. Danach sollte das Volumen bei oraler Applikation auf 10 ml/kg und bei Intraperitonealer (i. p.) auf 20 ml/kg beschränkt werden. Auch Hull empfiehlt ein maximales Volumen von 20 ml/kg (oral und i. p.).<sup>110</sup> Bei der Zusammensetzung wurde explizit darauf geachtet nur Hilfsstoffe zu verwenden, die auch für eine Anwendung am Menschen zugelassen sind, um auch für die Tiere eine verträgliche Formulierung zu ermöglichen und potentielle Nebenwirkungen zu reduzieren. Gad et al. haben eine Liste gängiger nichtklinischer Vehikel und deren maximales Dosierungsvolumen veröffentlicht<sup>112</sup>. Neervannan beschreibt die Herausforderungen bei der Entwicklung präklinischer Formulierungen<sup>111</sup>. Demnach werden die Testsubstanzen für das initiale Screening nach "Hits" zumeist in einfachen Lösungsmitteln wie DMSO gelöst. Alle in dieser Arbeit verwendeten mPGES-1-Testsubstanzen wurden ebenfalls in DMSO gelöst. Als alleiniger Hilfsstoff in einer Formulierung für eine Anwendung am Tier ist dieses Lösungsmittel allerdings weitgehend ungeeignet, obwohl es auf Grund seiner amphipathischen Eigenschaft eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen lösen kann. Zahlreiche (Neben)wirkungen wurden bislang für DMSO

beschrieben - unter anderem Übelkeit und Erbrechen, Hämolyse, Hautauschlag, Nierenversagen, Bluthochdruck, Bradykardie<sup>115</sup>.

Neervannan beschränkt die Menge daher auf maximal 50 % der Gesamtformulierung bzw. 0,5 mL/kg (bei längerer Anwendungsdauer), wohingegen Gad 10 mL/kg (i. p. 3 Tage) bzw. 100 mg/kg (i. p. 1 Monat) empfiehlt. Die - im Vergleich zu Wasser - höhere Viskosität erfordert bei Applikation mit Spritzen außerdem Kanülen mit großem Durchmesser. Gängige gelbe Kanülen (nach EN ISO 6009) mit einem Außendurchmesser von 0,30 mm konnten somit selbst für eine einmalige intraperitoneale Anwendung an der Maus mit 100 % DMSO nicht verwendet werden.

Die größte Schwierigkeit stellte die sehr hohe Lipophilität von FR4-Dev6 dar. Versuche, die Substanz in wässrigen Lösungen (VE-Wasser bzw. isotonischer Kochsalzlösung) zu lösen, schlugen fehl.

In der Literatur werden zahlreiche Methoden beschrieben, welche Formulierungen für lipophile Substanzen vorschlagen<sup>214</sup>. Unter anderem kann ein Hilfslösungsmittel wie Ethanol oder PGE-400 (Polyethylenglykol 400) hinzugefügt werden<sup>215</sup>; Mizellen mit Tensiden (Netzmitteln) gebildet werden<sup>216</sup>; der Wirkstoff in eine Polymermatrix eingebettet werden<sup>217</sup>; der pH-Wert angepasst werden<sup>218</sup>; eine Komplexierung mit Cyclodextrinen durchgeführt werden usw.

Zahlreiche Veröffentlichungen favorisieren die günstigen Eigenschaften einer Mikroemulsion für lipophile Substanzen<sup>219-221</sup>. Dabei werden zwei nicht mischbare Phasen (Öl und Wasser) und ein Tensid (und häufig ein weiteres Cotensid) plus eventuell ein Kosolvenz (z. B. Ethanol) eingesetzt um eine klare thermodynamisch stabile Mischung zu bilden<sup>222</sup>. So konnte beispielsweise die Bioverfügbarkeit von Celecoxib durch den Einsatz von Mikroemulsionen deutlich gesteigert werden<sup>223</sup>. Es wurden verschiedene Mischungen aus Wasser, natürlichen Ölen (Sonnenblumenöl, Maiskeimöl) oder industriell aufgereinigter Glyceride (Miglyol, Capmul) oder mittelkettiger Ester (Captex) und Tensiden (Tween, Span, Cremophor, PEG) hergestellt<sup>219, 224-228</sup>. Auch wurden Mischungen mit Phospholipiden (Lecithin) angesetzt<sup>229</sup>. Mit keiner dieser Ansätze konnte eine Mikroemulsion hergestellt werden, die den Wirkstoff



FR4-Dev6 inkorporierte. Nach Zugabe der wässrigen Phase veränderte sich die Mikroemulsion entweder zu einer milchigen Emulsion oder ein Ausfallen des Wirkstoffs wurde beobachtet. Verdünnungsreihen mit verschiedenen Lösungsmitteln zeigten, dass FR4-Dev6 in wässrigen Lösungsmitteln sehr schwer oder praktisch unlöslich ist, aber auch in Ölen nicht die benötigte Löslichkeit zeigte. Lediglich DMSO und NMP kamen als Wirkstoffträger in Frage.

FR4-Dev6 wurde deshalb in DMSO gelöst und anschließend mit einem niedrig viskösen Öl (Miglyol) verdünnt. Eine Mischung aus DMSO und Miglyol wurde auch von Tapias et al. zur intraperitonealen Administration von Rotenone eingesetzt<sup>118</sup>.

Die Vorteile dieser Formulierung sind vergleichsweise niedrige Materialkosten, sehr geringer technischer Aufwand bei der Zubereitung, Stabilität der Lösung, wasserfreie Komponenten und sehr gute Verträglichkeit. Außerdem kann diese Formulierung sowohl für eine perorale, wie auch intraperitoneale Gabe bei Versuchstieren eingesetzt werden.

#### **4.9.4 Bewertung pharmakokinetischer Eigenschaften nach oraler und intraperitonealer Gabe von FR4-Dev6**

Primäres Ziel der Versuche war eine Aussage über LADME-Parameter nach Applikation von FR4-Dev6 treffen zu können. Im Folgenden werden zentrale pharmakokinetische Aspekte diskutiert. Die Berechnung gängiger Parameter wie die absolute Bioverfügbarkeit konnte hier nicht angewendet werden, da keine Werte einer intravenösen Applikation zur Verfügung standen. Gleiches gilt für die Berechnung der *Clearance*, für die eine Messung der Testsubstanz bzw. deren Metabolite im Urin nötig gewesen wäre.

##### Liberation:

Die Freisetzung einer Substanz aus seiner Formulierung betrifft vor allem feste Darreichungsformen, da der Wirkstoff hier zuerst in Lösung gehen muss, bevor er aufgenommen wird. Da der Wirkstoff bei der hier gewählten Formulierung

bereits gelöst ist und eine flüssige Darreichungsform gewählt wurde, kann dieser Parameter vernachlässigt werden

#### Absorption:

Die Aufnahme eines Wirkstoffs aus dem Gastrointestinaltrakt nach oraler Gabe ist die erste große Hürde. Geht der Wirkstoff schlecht in Lösung, ist auf Grund des Milieus chemisch bzw. enzymatisch instabil oder zeigt eine geringe Permeabilitätsrate über die Mukosa wird eventuell nur ein geringer Anteil des Wirkstoffs resorbiert. Aus dem Vergleich des Plasmalevels nach oraler Gabe und dem Plasmalevel nach intravenöser Gabe kann dann die Bioverfügbarkeit berechnet werden. Da die hier eingesetzte Formulierung keine intravenöse Applikation ermöglicht, wurde stattdessen eine intraperitoneale Applikation gewählt. Im Vergleich zur intravenösen Applikation umgeht der Wirkstoff hier zwar auch die Magen-Darm-Resorption und damit zum größten Teil den *First-Path-Effekt* durch die Leber, allerdings muss auch hier eine Aufnahme über das Peritoneum oder direkt in die intraperitoneal gelegenen Organe stattfinden.

Da nach intraperitonealer Applikation bereits nach 3 min ein sehr hoher Anstieg FR4-Dev6 im Blutplasmaspiegel gemessen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass eine sehr schnelle Resorption stattgefunden hat. Auch nach oraler Gabe wurde ein schneller Anstieg des Blutplasmalevels beobachtet. Die Resorptionsgeschwindigkeit hängt primär von den Stoffeigenschaften und der Formulierung ab. Lipophile Substanzen können leicht über die Zellmembran wandern und zeigen daher häufig eine schnelle Resorption. Da die Testsubstanz FR4-Dev6 leicht sauer ist, liegt sie im Magen in nicht-dissoziierter (protonierter) Form vor. Da sie außerdem stark lipophil ist, wird von einer Aufnahme über die Magenschleimhaut und / oder Dünndarm ausgegangen. Untersuchungen mit unterschiedlich sauren bzw. basischen Arzneimitteln zeigten eine verstärkte Aufnahme von leicht sauren Substanzen wie z. B. (Acetyl-)Salicylsäure oder Thiopenta, während basische Substanzen wie Chinin fast gar nicht über den Magen aufgenommen werden<sup>230</sup>. Diese These wird durch die Analyse der Konzentrationen in den einzelnen Geweben gestützt. So wurden die höchsten Substanzkonzentrationen nach oraler Gabe nach kurzer Zeit im Magen, in der Lunge und im Dünndarm gemessen, wobei alle Organe

zuvor gespült wurden, um Substanzreste von der Applikation zu reduzieren. Ein hoher Anstieg von FR4-Dev6 in der Lunge wird auf eine Resorption über die Lungenalveolen vermutet. Da die Formulierung deutlich visköser als Wasser ist verbleibt sie länger im Ösophagus und Teile des Wirkstoffs können so in die Lunge gelangen. Eine weitere Erklärung ist eine unpräzise Applikation der Schlundsonde, wodurch direkt geringe Mengen der Substanz in die Lunge appliziert werden können. Diese These wird durch den sehr großen Standardfehler gestützt, der auf eine ungleichmäßige Behandlung der Tiere hindeutet.

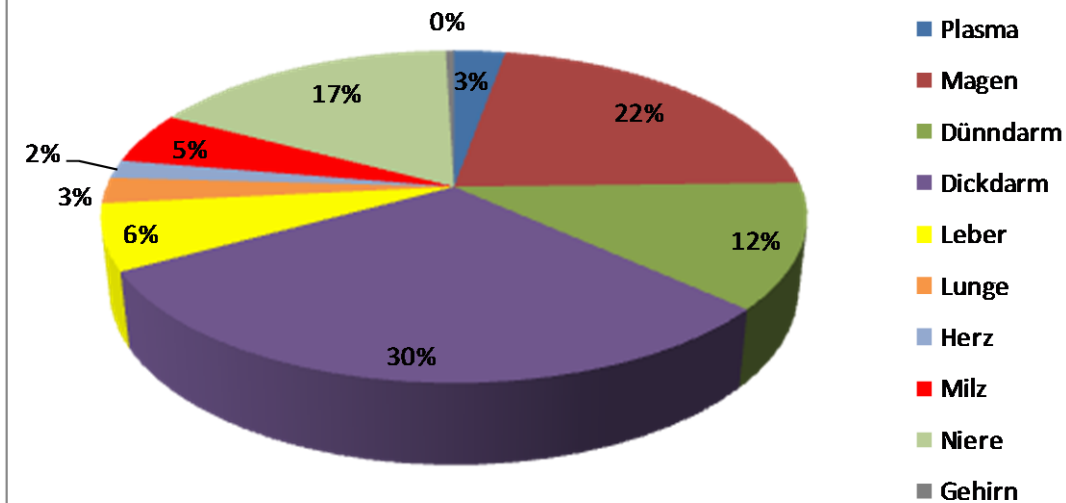
Im Vergleich zur oralen Applikation ist das Plasmalevel nach intraperitonealer Gabe bereits nach 10 Minuten etwa 5 mal so hoch, was eine deutlich niedrigere Resorption bei oraler Gabe oder eine Instabilität der Substanz im Gastrointestinaltrakt spricht. Wässriger Mageninhalt könnte beispielsweise zum Ausfallen des Wirkstoffs führen, wie es bereits bei der Formulierung mit wässrigen Komponenten beobachtet wurde.

#### Distribution:

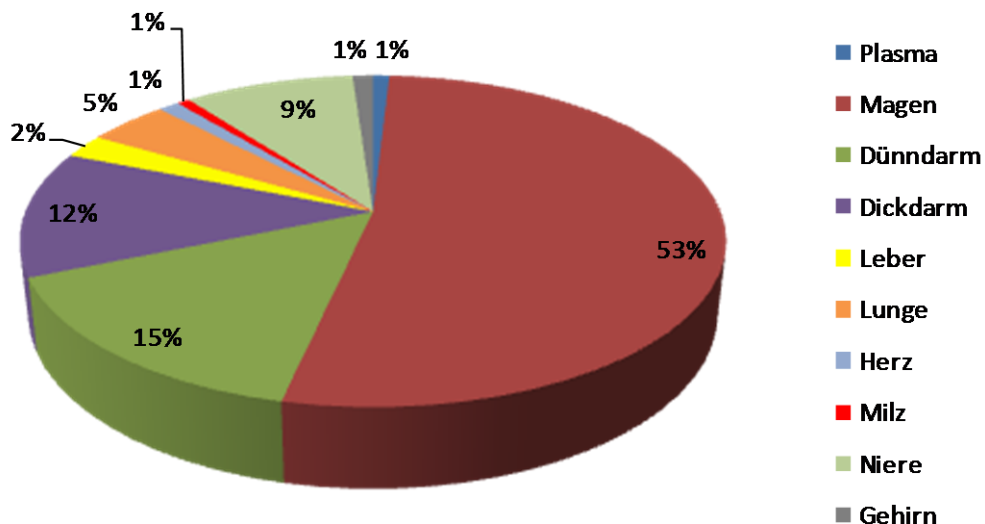
Die Verteilung einer Substanz von der Blutbahn in die verschiedenen Organe ist ein kritischer Faktor in Bezug auf die Wirksamkeit eines Wirkstoffs. Gelangt er nicht an den gewünschten Wirkort oder ist die freie Konzentration dort zu niedrig kann das Zielmolekül nur unzureichend beeinflusst werden. Die Verteilung eines Pharmakons hängt stark von den physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Lipophilie, Hydrophilie, Säure-Basen-Eigenschaften, Molekülgröße und Affinität zu bestimmten Strukturen ab. Lipophile Substanzen reichern sich eher in fettreichen Geweben und subzellularen Strukturen an, sehr große Moleküle können die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und zahlreiche Wirkstoffe gehen Bindungen mit Plasmaproteinen ein<sup>231</sup>. Eine hohe Plasmaproteinbindung wurde bereits aus den Ergebnissen der zellbasierten Versuche abgeleitet. Sie wurde auch für zahlreiche NSAIDs festgestellt<sup>232</sup>. Die Testsubstanz FR4-Dev6 teilt mit vielen NSAIDs die leicht saure Eigenschaft. Dies ermöglicht eine Akkumulation in sauren Milieus, wie es in entzündeten Geweben vorkommt<sup>233</sup>. Kombiniert mit einer Depotwirkung auf Grund hoher Plasmabindung kann selbst bei einer kurzen Plasmahalbwertszeit eine

antiphlogistische Wirkung erzielt werden<sup>234</sup>. Eine extrem kurze Plasmahalbwertszeit wurde auch für FR4-Dev6 beobachtet: Bereits 30 Minuten nach Applikation (i. p.) wurde nur noch 1/5 der maximalen Plasmakonzentration gemessen. Nach zwei Stunden konnte nur noch ein niedriger basaler Level von 25 ng/mL gemessen werden, der auch nach sechs Stunden nicht weiter abnahm. Die Verteilung von FR4-Dev6 wurde in den Organen Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Lunge, Herz, Milz, Niere und Gehirn gemessen. Mit Ausnahme des Magens wurde bei allen Organen ein rascher Konzentrationsanstieg innerhalb der ersten 10 min festgestellt, der innerhalb von 1 - 2 Stunden wieder auf ein basales Level abfiel. Im Magen wurde selbst nach intraperitonealer Applikation ein rascher Anstieg gemessen, der aber selbst nach sechs Stunden noch nicht vollständig auf ein basales Niveau zurückgefallen war. Interessanterweise konnte nach oraler Gabe ein Abfall der Gewebekonzentration im Magen beobachtet werden, die in den nachfolgenden Stunden wieder deutlich anstieg, was ein Indiz für die Gewebsanreicherung der Testsubstanz im Magen ist. Eine Akkumulation konnte außerdem in der Niere beobachtet werden. Abbildung 27 verdeutlicht, dass über den gesamten Messzeitraum hinweg die größte AUC (*Area under the curve*) im Magen-Darm-Trakt gemessen wurde, was auf eine Verteilung der Testsubstanz in diese Gewebe hindeutet. Da keine intravenösen Werte vorliegen, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt nicht größtenteils durch direkte Diffusion am Applikationsort bedingt ist. Diese Vermutung liegt nahe, da nach oraler Gabe die größte Wirkstoffmenge im Magengewebe gefunden wurde, gefolgt von Dünndarm und Dickdarm, während nach intraperitonealer Gabe die größte Gesamtmenge im Dickdarm gemessen wurde, der den größten Teil der Bauchhöhle einnimmt. Der Darm und das daran anknüpfende Fettgewebe begünstigen zudem eine Akkumulation lipophiler Substanzen. Darüber hinaus können lipophile Substanzen auch in membranösen Strukturen (z. B. Zellmembranen) eingelagert werden.

### Verteilung von FR4-Dev6 nach intraperitonealer Gabe über 6h [% totaler AUC]



### Verteilung von FR4-Dev6 nach peroraler Gabe über 6h [% totaler AUC]



**Abbildung 27:** Relative Verteilung von FR4-Dev6 nach intraperitonealer oder peroraler Gabe in verschiedenen Geweben und Plasma. Angabe in % des aufsummierten AUC aller gemessenen Organe.

#### Metabolismus:

Über die Verstoffwechslung von FR4-Dev6 können nur bedingt Aussagen getroffen werden, da weder die Metabolite der Substanz bekannt sind, noch entsprechende Messmethoden etabliert sind. Für eine renale Ausscheidung müsste die Substanz allerdings zuerst metabolisch in eine wasserlösliche Form überführt werden (z.B. durch Glucuronidierung in der Leber).

#### Toxizität:

Über den Zeitraum von sechs Stunden wurden in keiner der Testgruppen Nebenwirkungen oder toxische Effekte beobachtet. Die gute Verträglichkeit der Formulierung kann somit bestätigt werden und entspricht bislang publizierten toxikologischen Untersuchungen zu mittelkettigen Triglyceriden<sup>116</sup>. Nach einer kurzen Stressphase, die durch die Applikation bedingt war, zeigten die Tiere auch keinerlei ungewöhnliches Einzel- oder Gruppenverhalten.

#### **4.9.5 Untersuchungen zur Wirksamkeit von FR4-Dev6 in einem *in vivo*-Entzündungsmodell**

Die mPGES-1 und deren primäres Produkt PGE<sub>2</sub> sind wichtige Mediatoren in Entzündungsprozessen, bei der Schmerzvermittlung, bei Fieber, sowie bei verschiedenen physiologischen Funktionen in verschiedenen Organen (Magen, Niere, etc.). Auch wurde eine Überexpression der mPGES-1 in verschiedenen Tumorarten festgestellt<sup>44, 235</sup>. Zahlreiche Tiermodelle bilden diese pathologischen Prozesse ab. In dieser Arbeit wurde eine Entzündung durch Applikation der stark proinflammatorisch wirkenden Substanz Zymosan induziert. Diese wurde lokal in eine der Hinterpfoten appliziert, nachdem direkt zuvor der Wirkstoff FR4-Dev intraperitoneal verabreicht wurde. Nach wenigen Stunden kann ein Anschwellen der Pfote mit gesteigerter Sensibilität (thermale und mechanische Hyperalgesie) beobachtet werden<sup>236</sup>. Obwohl das Pfortenvolumen durch die Zymosanbehandlung signifikant vergrößert war, blieb die Steigerung unter den im Institut üblichen Werten. Eine mögliche Ursache ist das eingesetzte Vehikel der Test- und Kontrollsubstanz. Die Formulierung

wurde auch den Kontrollgruppen appliziert (ohne Wirkstoff ohne Zymosan bzw. ohne Wirkstoff mit Zymosan). Die Formulierung enthielt 5 % DMSO (v/v), welches für seine antiphlogistische Wirkung bekannt ist<sup>115, 237-238</sup>. Da aber kein anderes Lösungsmittel mit ausreichender Löslichkeitskapazität zur Verfügung stand, musste dieser Umstand in Kauf genommen werden. Als Kontrollsubstanz wurde der COX-2-Inhibitor Celecoxib gewählt.

Weder die Kontrollsubstanz noch der Wirkstoff FR4-Dev6 konnten die Zymosan-induzierte Pfotenschwellung signifikant reduzieren. Selbst eine 10-fach erhöhte Dosis FR4-Dev6 (100 mg/kg KG) reduzierte das Pfotenvolumen nur marginal.

Zymosan ist dafür bekannt über seine Bindung an den Toll-like-Rezeptor 2 (TLR-2) eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B und TNF $\alpha$  auszulösen, welche zentrale Aktivatoren im Entzündungsprozess darstellen. Unter anderem wird dadurch die Expression der COX-2 und mPGES-1 induziert, was zu einer Erhöhung des PGE<sub>2</sub>-Levels führt<sup>66-67, 239</sup>. Um zu überprüfen, ob eine Steigerung des PGE<sub>2</sub>-Levels nach Zymosanjektion bei gleichzeitiger Administration der Formulierung bzw. der Test-/Kontrollsubstanzen erfolgt, wurde die PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Pfotenödemgewebe mittels LC-MS/MS quantifiziert. Dabei konnte keine signifikante Steigerung des PGE<sub>2</sub>-Levels gemessen werden. Auch das ebenfalls gemessene Leukotrien B<sub>4</sub> zeigte keine Erhöhung im Pfotenödem. Parallel zur Bestimmung von PGE<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> wurde auch im Pfotenödem die Konzentration an FR4-Dev6 gemessen, um eine Aussage über die Verteilung in ein entzündetes Gewebe treffen zu können. Dabei wurden 150 pg FR4-Dev6 je Milligramm Pfotenödemgewebe bei einer Dosis von 10 mg/kg KG gemessen und über 2000 pg/mg Gewebe bei einer Dosis von 100 mg/kg KG.

Während also das Blutplasmalevel nach sechs Stunden auf ein Basallevel sinkt, kann in diesem Versuch ein deutlich erhöhtes Level im Pfotenödem gemessen werden. Umgerechnet entspricht das gemessene Level im Pfotenödem 0,35  $\mu$ M bei einer Dosis von 10 mg/kg KG und 5,38  $\mu$ M bei einer Dosis von 100 mg/kg KG. Die Berechnung basiert auf der Annahme, dass das Muskelgewebe der Pfote eine Dichte von 1,06 kg/L hat<sup>240</sup>. Nach Gabe der niedrigeren Dosis wird somit nach sechs Stunden Inkubationszeit eine Konzentration im Gewebe

erreicht, die nicht für eine ausreichende Hemmung der mPGES-1 reichen dürfte, da in den Vorversuchen auf isoliertem Enzym ein  $IC_{50}$  von 10  $\mu$ M ermittelt wurde. Nach Gabe der höheren Dosis wird eine deutlich höhere Gewebskonzentration erreicht, die eine leichte Hemmung bewirken könnte.

Das eingesetzte Entzündungsmodell war im Zusammenhang mit der gewählten Formulierung allerdings nicht in der Lage überhaupt ein erhöhtes Prostaglandin  $E_2$ -Level zu erzeugen. Somit kann keine eindeutige Aussage über die *in vivo*-Wirksamkeit des Benzensulfonamid-mPGES-1-Inhibitors FR4-Dev6 getroffen werden.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Suche nach neuen Zielmolekülen und Wirkstoffen für die Schmerztherapie ist eine unerlässliche Aufgabe, um Nebenwirkungen heutiger auf dem Markt befindlicher Schmerzmedikamente entgegenzuwirken. Ein vielversprechendes Ziel - als Alternative zu cyclooxygenasehemmenden Medikamenten (tNSDAIDs und Coxibe) - ist die mikrosomale Prostaglandin E-Synthase 1 (mPGES-1). In dieser Arbeit wurden zwei Substanzklassen rund um die Benzensulfonamid-Leitstruktur FR4 und die Quinazolinon-Leitstruktur FR20 aufgebaut. Die Benzensulfonamidklasse enthält 32 Derivate, die Klasse der Quinazolinone 24 Derivate. Beide Strukturklassen konnten durch chemische Modulation an verschiedenen Resten erweitert werden. Durch strukturelle Variationen konnte die Aktivität der FR4-Klasse von initial 14  $\mu\text{M}$  auf 0,8  $\mu\text{M}$  (FR4-Dev28) optimiert werden. In der FR20-Klasse konnten zahlreiche equipotente Derivate gefunden werden. Beide Klassen zeigten eine niedrige Toxizität (ab etwa 100  $\mu\text{M}$ ) und konnten auch auf zellulärer Ebene den  $\text{PGE}_2$ -Level konzentrationsabhängig reduzieren. In humanen Vollblutversuchen wurde die Kreuzreaktivität dieser Substanzen auf andere Eicosanoide untersucht. Beide Klassen konnten auch hier den  $\text{PGE}_2$ -Level reduzieren. Ein Prostanoidshunting in Folge der mPGES-1-Hemmung konnte dabei nicht festgestellt werden. Darüber hinaus wurde eine dualinhibitorische Funktion der Benzensulfonamide beobachtet. Neben der mPGES-1 wurde auch das 5LOX-vermittelte  $\text{LTB}_2$ -Level reduziert. Dieser Effekt trat bei den Quinazolinonen nicht auf. Neben der humanen mPGES-1 wurde auch der Einfluss auf das murine Enzym untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Hemmung von der Wahl der Klasse abhängt: Benzensulfonamide hemmen die murine mPGES-1, Quinazolinone nicht. Damit konnte erstmals eine Strukturklasse mit dualinhibitorischer (mPGES-1/5LOX) und speziesübergreifender Hemmung (human/murin) beschrieben werden. Untersuchungen an erstellten Homologie-Modellen der humanen und murinen mPGES-1 zeigten Unterschiede der Bindetaschen der beiden Spezies. PLIF-

Analysen der beiden Strukturklassen deckten verschiedene Bindungsmuster auf.

*In vivo*-Pharmakologische Untersuchungen von FR4-Dev6 zeigten eine sehr schnelle Resorption ins Blut ( $t_{\text{Max}} = 10$  min) sowohl nach intraperitonealer als auch nach oraler Applikation, gefolgt von einer raschen Verteilung in zahlreiche Organe. Hohe Konzentrationen wurden im Gastrointestinaltrakt und der Niere gemessen, beides Organe, in denen  $\text{PGE}_2$  eine physiologische Funktion ausübt. Die Konzentration fiel bereits nach 30 min in allen Organen wieder stark ab, ein basaler Level war aber noch nach sechs Stunden mit der eigens entwickelten LC-MS/MS-Methode detektierbar. Eine antiinflammatorische Wirkung in einem Zymosan-induzierten Entzündungsmodell konnte nicht bestätigt werden, da die gewählte Formulierung bereits den  $\text{PGE}_2$ -Level stark reduzierte. Eine starke Akkumulation von FR4-Dev6 konnte aber im Pfotenödem gemessen werden.

Die umfassende Charakterisierung der vorgestellten Substanzklassen hat neben grundlegenden Struktur-Aktivitätsbeziehungen neue Einsichten in die Wirkungsweise von mPGES-1-Inhibitoren geliefert. Diese Ergebnisse können in Zukunft für weitere Entwicklungen von neuartigen, verträglicheren Analgetika, Antiphlogistika und Antipyretika mit dem Zielmolekül mPGES-1 genutzt werden.

## 6 PERSPEKTIVE (AUSBLICK)

Zukünftige Untersuchungen zur Funktionsweise der mPGES-1 und dem Wirkmechanismus von mPGES-1-Inhibitoren könnten durch hochauflösende 3D-Kristallstrukturen unterstützt werden, welche idealerweise mit einem Wirkstoff kokristallisiert sind. Solche Modelle könnten außerdem für ein gezieltes kombiniertes rezeptor- und ligandenbasiertes *in silico*-Screening eingesetzt werden. Unterstützt durch Struktur-Aktivitäts-Beziehungsanalysen könnten dann Modelle entwickelt werden, die eine Aktivitätsvorhersage ermöglichen. Die Evaluierung der Hemmung der murinen mPGES-1 von weiteren Wirkstoffen und Wirkstoffklassen ist dringend nötig, um zuverlässige Modelle für eine Vorhersage erstellen zu können.

Die Entwicklung von potenten mPGES-1-Inhibitoren ist bereits weit vorangeschritten. Nun ist es an der Zeit diese Wirkstoffe in klinisch relevanten Modellen zu erproben. Auf Grund ihrer teilweise sehr hohen Lipophilie wird die Galenik hier gefordert sein angepasste Formulierungen zu entwickeln. Neuartige Ansätze wie Mikroemulsionen, partikelbeladene Vesikel, Kopplungen an Biopharmazeutika oder subkutane Depots könnten neben einer stark verbesserten Aufnahme eine gezieltere Verteilung in pathophysiologisch relevante Kompartimente zum Ziel haben.

mPGES-1-Inhibitoren als Alternative zu Cyclooxygenasehemmern stellen eine vielversprechende Option dar.<sup>241</sup> Ein Hauptziel ist - neben der Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Produktion bei pathophysiologischen Prozessen - ein günstigeres Nebenwirkungsprofil zu erreichen, um Patienten mit gastrointestinalen, renalen und kardiovaskulären Vorbelastungen besser versorgen zu können.

Zusätzlich zu einer Hemmung der mPGES-1 könnten gezielt Wirkstoffe mit weiteren Zielmolekülen entwickelt werden, um synergistische Effekte zu erzielen.

Neben direkten Inhibitoren der mPGES-1 könnten auch Wirkstoffe entwickelt werden, die die Aktivierung der Transkription der mPGES-1 beeinflussen (z. B.

am Promotor), die Proteinsynthese frühzeitig beeinflussen (z. B. siRNA) oder das Protein selbst als Ziel haben (z. B. Antikörper).

Benzensulfonamid- bzw. quinazolinbasierte Wirkstoffe – wie in dieser Arbeit vorgestellt – stellen eine gute Grundlage für direkte Inhibitoren dar. Ihre weitere Optimierung könnte die inhibitorische Potenz steigern, die Plasmaproteinbindung verringern, die Lipophilität reduzieren (um die Formulierung zu erleichtern) und die metabolische Stabilität untersuchen und gegebenenfalls verbessern. Weiterhin könnte der Aufnahmemechanismus in die Zelle untersucht werden und eine Beeinflussung weiterer Zielmoleküle außerhalb der Arachidonsäurekaskade in Betracht gezogen werden.

Ein Screening von bekannten Medikamenten auf Hemmung der mPGES-1 könnte zu neuen Indikationsgebieten bei bereits bekanntem Nebenwirkungsprofil führen.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

**5-LOX:** 5-Lipoxygenase

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**BHT:** Butylhydroxytoluol

**BtMG:** Betäubungsmittelgesetz

**cAMP:** cyclischem Adenosinmonophosphat

**COX-1 / 2:** Cyclooxygenase 1 / 2

**cPGES:** zytosolische Prostaglandin E Synthase

**cPLA2:** zytosolische Phospholipase A2

**DAG:** Diacylglycerol

**DAGL:** Diacylglycerol-Lipase

**DGLA:** Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure

**DMARD:** krankheitskontrollierenden Medikamente (*Disease modifying anti-rheumatic drugs*)

**DMSO:** Dimethylsulfoxid

**DSMZ:** Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

**DTT:** Dithiothreitol

**ECVAM:** *European Centre for the Validation of Alternative Methods*

**EDTA:** Ethylendiamintetraessigsäure

**EFPIA:** *European Federation of Pharmaceutical Industries Association*

**FCS:** fötales Kälberserum

**FLAP:** Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein

**GLA:**  $\gamma$ -Linolensäure

**GPCRs:** spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren

**GSH:** Glutathion

**HDAC1:** Histon-Deacetylase (*Histone deacetylase 1*)

**HETE:** Hydroxyeikosanoidtetraensäure (*Hydroxyeicosatetraenoic acid*)

**HLOQ:** obere Quantifizierungsgrenze (*highest limit of quantitation*)

**HM:** Homogenisierungs-Medium

**HPLC:** Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

**HTS:** Hochdurchsatzscreening (*High Throughput Screening*)

**IP3:** Inositoltriphosphat

**IS:** Interner Standard

**KG:** Körpergewicht

**LADME:** Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion  
(*Liberation, Absorption, Distribution, Metabolization, Excretion*)

**LC/MS-MS:** Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

**LLOQ:** untere Quantifizierungsgrenze (*lower limit of quantitation*)

**LPS:** Lipopolysaccharid

**MAPEG-Enzyme:** Membran-assoziierte Proteine, die am Eicosanoid und  
Glutathionmetabolismus beteiligt sind (*membrane associated  
proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism*)

**MC:** Morbus Crohn

**mPGES-1:** mikrosomale Prostaglandin E Synthase 1

**mPGES-2:** mikrosomale Prostaglandin E Synthase 2

**MS/MS:** Tandem-Massenspektrometrie

**NIH 3T3:** embryonale Mausfibroblasten Zelllinie

**NSAR / tNSAIDs:** traditionelle nichtsteroidale Antiphlogistika / Antirheumatika  
(*traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs*)

**OA:** Osteoarthritis

**OTC:** freiverkäufliche, rezeptfreie Medikamente (*Over the counter*)

**PBS:** Phosphat-gepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*)

**PEG:** Polyethylenglykol

**PG:** Prostaglandinrezeptor

**PGD<sub>2</sub>:** Prostaglandin D<sub>2</sub>

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandin E<sub>2</sub>

**PGF<sub>2α</sub>:** Prostaglandin F<sub>2α</sub>

**PGG<sub>2</sub>:** Prostaglandin G<sub>2</sub>

**PGH<sub>2</sub>:** Prostaglandin H<sub>2</sub>

**PGIM:** PGI<sub>2</sub>-Metabolit 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>

**PGT:** Prostaglandin-Transporter

**PLA<sub>2</sub>**: Phospholipase A<sub>2</sub>  
**PLC**: Phospholipase C  
**PLIF**: Protein-Ligand-Interaktions-Fingerabdrücke (*Protein-Ligand-Interaction-Fingerprints*)  
**PPAR**: Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptoren  
**RAW 264.7**: Mausmakrophagen-ähnliche Zelllinie  
**SAR**: Struktur-Aktivitäts-Beziehungsanalyse (*Structure-Activity-Relationship*)  
**SOMs**: selbstorganisierenden Karten (*Self-organizing maps*)  
**SPR-Spektroskopie**: Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*)  
**SQUIRREL**: *Sophisticated Quantification of InteRaction Relationship*  
**TLR-2**: Toll-like-Rezeptor 2  
**TRPV1**: *Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*  
**TNF $\alpha$** : Tumornekrosefaktor  $\alpha$   
**TXA<sub>2</sub>**: Thromboxan A<sub>2</sub>  
**TXM**: TXB<sub>2</sub>-Metabolit 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub>  
**UC**: Colitis ulcerosa (*ulcerative colitis*)  
**WB**: Western-Blot

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Schmidt, R. *LC-MS/MS-Analyse von Eicosanoiden*. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, 2006.
2. Bonica, J. *Editorial The need of a taxonomy*. PAIN 1979, 6, 247-252.
3. Scholz, J.; Woolf, C. J. *Can we conquer pain?* Nat Neurosci 2002, 5 Suppl, 1062-7.
4. Boddeke, E. W. *Involvement of chemokines in pain*. Eur J Pharmacol 2001, 429, 115-9.
5. Mantyh, P. W.; Clohisy, D. R.; Koltzenburg, M.; Hunt, S. P. *Molecular mechanisms of cancer pain*. Nat Rev Cancer 2002, 2, 201-9.
6. Schneider, M.; Abholz, H. H.; Blumenroth, M.; Flügge, C.; Gerken, M.; Jäniche, H.; Kunz, R.; Mau, W.; Specker, C. *Interdisziplinäre Leitlinie Management der frühen rheumatoiden Arthritis*. Springer Verlag: 2011.
7. Schwabe, U.; Paffrath, D. *Arzneiverordnungs-Report 2013 Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*.
8. Verheesen, M. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Selbstmedikation, Umsatzstärkste Indikationsbereiche ab 2001*; 2012.
9. Vitaku, E.; Ilardi, E.; Njarðarson, J. *Top 200 Pharmaceutical Products by US Prescription in 2012*; University of Arizona: 2013.
10. Lindsley, C. W. *The top prescription drugs of 2012 globally: biologics dominate, but small molecule CNS drugs hold on to top spots*. ACS Chem Neurosci 2013, 4, 905-7.
11. Barmer GEK Schwäbisch Gmünd; Grobe, T. G.; Dörning, H.; Schwartz, F. W. *Barmer GEK-Arztreport 2011*. Asgard-Verlag: 2011.
12. Barmer GEK Schwäbisch Gmünd; Grobe, T. G.; Bitzer, E. M.; Schwartz, F. W. *Barmer GEK-Arztreport 2013*. Asgard-Verlag: 2013.
13. WHO. *WHO Model List - Essential Medicines*. In World Health Organization: 2013.
14. Halverson, P. B. *Nonsteroidal antiinflammatory drugs: benefits, risks, and COX-2 selectivity*. Orthop Nurs 1999, 18, 21-6; quiz 27-8.
15. Mitchell, J. A.; Akarasereenont, P.; Thiemermann, C.; Flower, R. J.; Vane, J. R. *Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase*. Proc Natl Acad Sci U S A 1993, 90, 11693-7.
16. Cryer, B.; Feldman, M. *Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Am J Med 1998, 104, 413-21.
17. Vyvey, M. *Steroids as pain relief adjuvants*. Can Fam Physician 2010, 56, 1295-7, e415.
18. Watanabe, S.; Bruera, E. *Corticosteroids as adjuvant analgesics*. J Pain Symptom Manage 1994, 9, 442-5.
19. Mensah-Nyagan, A. G.; Meyer, L.; Schaeffer, V.; Kibaly, C.; Patten-Mensah, C. *Evidence for a key role of steroids in the modulation of pain*. Psychoneuroendocrinology 2009, 34 Suppl 1, S169-77.



20. Porter, J.; Jick, H. *Addiction rare in patients treated with narcotics*. N Engl J Med 1980, 302, 123.
21. Curtiss, P. H., Jr.; Clark, W. S.; Herndon, C. H. *Vertebral fractures resulting from prolonged cortisone and corticotropin therapy*. J Am Med Assoc 1954, 156, 467-9.
22. Moghadam-Kia, S.; Werth, V. P. *Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects*. Int J Dermatol 2010, 49, 239-48.
23. Dieterle, L. *Psychopharmaka in der Schmerztherapie*. [http://www.szbo.de/dieterle\\_psychopharmaka\\_in\\_der\\_schmerztherapie.pdf](http://www.szbo.de/dieterle_psychopharmaka_in_der_schmerztherapie.pdf) (25.12.2013).
24. Moore, R. A.; Derry, S.; McQuay, H. J. *Cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: balancing gastrointestinal and cardiovascular risk*. BMC Musculoskelet Disord 2007, 8, 73.
25. Traversa, G.; Walker, A. M.; Ippolito, F. M.; Caffari, B.; Capurso, L.; Dezi, A.; Koch, M.; Maggini, M.; Alegiani, S. S.; Raschetti, R. *Gastroduodenal toxicity of different nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Epidemiology 1995, 6, 49-54.
26. Mutschler, E. *Mutschler Arzneimittelwirkungen : Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie ; mit 257 Tabellen*. 10., vollst. überarb. und erw. Aufl.. ed.; Wiss. Verl.-Ges.: Stuttgart, 2013; p XXIII, 1197 S.
27. Guan, Y.; Zhang, Y.; Breyer, R. M.; Fowler, B.; Davis, L.; Hebert, R. L.; Breyer, M. D. *Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na<sup>+</sup> absorption by activating the EP1 receptor*. J Clin Invest 1998, 102, 194-201.
28. Bombardier, C.; Laine, L.; Reicin, A.; Shapiro, D.; Burgos-Vargas, R.; Davis, B.; Day, R.; Ferraz, M. B.; Hawkey, C. J.; Hochberg, M. C.; Kvien, T. K.; Schnitzer, T. J. *Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group*. N Engl J Med 2000, 343, 1520-8, 2 p following 1528.
29. Curfman, G. D.; Morrissey, S.; Drazen, J. M. *Expression of concern: Bombardier et al., "Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis," N Engl J Med 2000;343:1520-8*. N Engl J Med 2005, 353, 2813-4.
30. Gislason, G. H.; Rasmussen, J. N.; Abildstrom, S. Z.; Schramm, T. K.; Hansen, M. L.; Fosbol, E. L.; Sorensen, R.; Folke, F.; Buch, P.; Gadsboll, N.; Rasmussen, S.; Poulsen, H. E.; Kober, L.; Madsen, M.; Torp-Pedersen, C. *Increased mortality and cardiovascular morbidity associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in chronic heart failure*. Arch Intern Med 2009, 169, 141-9.
31. Hiroyuki, O.; Susumu, G.; Kazushige, S.; Wataru, F.; Hidemasa, B.; Minoru, K. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?ko00590](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ko00590) (20.10.2013).
32. Boron, W. F. *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. Updated ed.; Elsevier Saunders: Philadelphia, Pa., 2006; p XIII, 1319 S.

33. Warner, T. D.; Mitchell, J. A. *Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic*. FASEB J 2004, 18, 790-804.
34. Chan, B. S.; Satriano, J. A.; Pucci, M.; Schuster, V. L. *Mechanism of prostaglandin E2 transport across the plasma membrane of HeLa cells and Xenopus oocytes expressing the prostaglandin transporter "PGT"*. J Biol Chem 1998, 273, 6689-97.
35. Schuster, V. L. *Prostaglandin transport*. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002, 68-69, 633-47.
36. Reid, G.; Wielinga, P.; Zelcer, N.; van der Heijden, I.; Kuil, A.; de Haas, M.; Wijnholds, J.; Borst, P. *The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100, 9244-9.
37. Wobst, I. *Untersuchungen zum Einfluss von Dimethylcelecoxib auf die Prostanoid-Biosynthese*. Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt, 2009.
38. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M. *Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH 2008; Vol. 9.
39. Kamei, D.; Yamakawa, K.; Takegoshi, Y.; Mikami-Nakanishi, M.; Nakatani, Y.; Oh-Ishi, S.; Yasui, H.; Azuma, Y.; Hirasawa, N.; Ohuchi, K.; Kawaguchi, H.; Ishikawa, Y.; Ishii, T.; Uematsu, S.; Akira, S.; Murakami, M.; Kudo, I. *Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin e synthase-1*. J Biol Chem 2004, 279, 33684-95.
40. Trebino, C. E.; Stock, J. L.; Gibbons, C. P.; Naiman, B. M.; Wachtmann, T. S.; Umland, J. P.; Pandher, K.; Lapointe, J. M.; Saha, S.; Roach, M. L.; Carter, D.; Thomas, N. A.; Durtschi, B. A.; McNeish, J. D.; Hambor, J. E.; Jakobsson, P. J.; Carty, T. J.; Perez, J. R.; Audoly, L. P. *Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100, 9044-9.
41. Boyce, J. A. *Eicosanoids in asthma, allergic inflammation, and host defense*. Curr Mol Med 2008, 8, 335-49.
42. Heller, A.; Koch, T.; Schmeck, J.; van Ackern, K. *Lipid mediators in inflammatory disorders*. Drugs 1998, 55, 487-96.
43. Khanapure, S. P.; Garvey, D. S.; Janero, D. R.; Letts, L. G. *Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers*. Curr Top Med Chem 2007, 7, 311-40.
44. Nakanishi, M.; Rosenberg, D. W. *Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer*. Semin Immunopathol 2013, 35, 123-37.
45. Engblom, D.; Saha, S.; Engstrom, L.; Westman, M.; Audoly, L. P.; Jakobsson, P. J.; Blomqvist, A. *Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis*. Nat Neurosci 2003, 6, 1137-8.
46. Wang, D.; Dubois, R. N. *Eicosanoids and cancer*. Nat Rev Cancer 2010, 10, 181-93.

47. Castellone, M. D.; Teramoto, H.; Williams, B. O.; Druey, K. M.; Gutkind, J. S. *Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis*. *Science* 2005, 310, 1504-10.
48. Wang, D.; Buchanan, F. G.; Wang, H.; Dey, S. K.; DuBois, R. N. *Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade*. *Cancer Res* 2005, 65, 1822-9.
49. Poligone, B.; Baldwin, A. S. *Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins*. *J Biol Chem* 2001, 276, 38658-64.
50. Sheng, H.; Shao, J.; Morrow, J. D.; Beauchamp, R. D.; DuBois, R. N. *Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells*. *Cancer Res* 1998, 58, 362-6.
51. Buchanan, F. G.; Gorden, D. L.; Matta, P.; Shi, Q.; Matrisian, L. M.; DuBois, R. N. *Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, 1492-7.
52. Buchanan, F. G.; Wang, D.; Bargiacchi, F.; DuBois, R. N. *Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor*. *J Biol Chem* 2003, 278, 35451-7.
53. Han, C.; Michalopoulos, G. K.; Wu, T. *Prostaglandin E2 receptor EP1 transactivates EGFR/MET receptor tyrosine kinases and enhances invasiveness in human hepatocellular carcinoma cells*. *J Cell Physiol* 2006, 207, 261-70.
54. Ito, H.; Duxbury, M.; Benoit, E.; Clancy, T. E.; Zinner, M. J.; Ashley, S. W.; Whang, E. E. *Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2*. *Cancer Res* 2004, 64, 7439-46.
55. Pan, M. R.; Hou, M. F.; Chang, H. C.; Hung, W. C. *Cyclooxygenase-2 up-regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells*. *J Biol Chem* 2008, 283, 11155-63.
56. Yang, L.; Huang, Y.; Porta, R.; Yanagisawa, K.; Gonzalez, A.; Segi, E.; Johnson, D. H.; Narumiya, S.; Carbone, D. P. *Host and direct antitumor effects and profound reduction in tumor metastasis with selective EP4 receptor antagonism*. *Cancer Res* 2006, 66, 9665-72.
57. Tanioka, T.; Nakatani, Y.; Semmyo, N.; Murakami, M.; Kudo, I. *Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis*. *J Biol Chem* 2000, 275, 32775-82.
58. Jakobsson, P. J.; Thoren, S.; Morgenstern, R.; Samuelsson, B. *Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96, 7220-5.
59. Tanikawa, N.; Ohmiya, Y.; Ohkubo, H.; Hashimoto, K.; Kangawa, K.; Kojima, M.; Ito, S.; Watanabe, K. *Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 291, 884-9.

60. Kudo, I.; Murakami, M. *Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis*. J Biochem Mol Biol 2005, 38, 633-8.
61. Murakami, M.; Nakashima, K.; Kamei, D.; Masuda, S.; Ishikawa, Y.; Ishii, T.; Ohmiya, Y.; Watanabe, K.; Kudo, I. *Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2*. J Biol Chem 2003, 278, 37937-47.
62. Ek, M.; Engblom, D.; Saha, S.; Blomqvist, A.; Jakobsson, P. J.; Ericsson-Dahlstrand, A. *Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier*. Nature 2001, 410, 430-1.
63. Guan, Y.; Zhang, Y.; Schneider, A.; Riendeau, D.; Mancini, J. A.; Davis, L.; Komhoff, M.; Breyer, R. M.; Breyer, M. D. *Urogenital distribution of a mouse membrane-associated prostaglandin E(2) synthase*. Am J Physiol Renal Physiol 2001, 281, F1173-7.
64. Dieter, P.; Scheibe, R.; Jakobsson, P. J.; Watanabe, K.; Kolada, A.; Kamionka, S. *Functional coupling of cyclooxygenase 1 and 2 to discrete prostanoid synthases in liver macrophages*. Biochem Biophys Res Commun 2000, 276, 488-92.
65. Matsumoto, H.; Naraba, H.; Murakami, M.; Kudo, I.; Yamaki, K.; Ueno, A.; Oh-ishi, S. *Concordant induction of prostaglandin E2 synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E2 over thromboxane and prostaglandin D2 in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages*. Biochem Biophys Res Commun 1997, 230, 110-4.
66. Deckmann, K.; Rörsch, F.; Geisslinger, G.; Grösch, S. *Dimethylcelecoxib induces an inhibitory complex consisting of HDAC1/NF-kappaB(p65)RelA leading to transcriptional downregulation of mPGES-1 and EGR1*. Cell Signal 2012, 24, 460-7.
67. Deckmann, K.; Rörsch, F.; Steri, R.; Schubert-Zsilavec, M.; Geisslinger, G.; Grösch, S. *Dimethylcelecoxib inhibits mPGES-1 promoter activity by influencing EGR1 and NF-kappaB*. Biochem Pharmacol 2010, 80, 1365-72.
68. Jegerschöld, C.; Pawelzik, S. C.; Purhonen, P.; Bhakat, P.; Gheorghe, K. R.; Gyobu, N.; Mitsuoka, K.; Morgenstern, R.; Jakobsson, P. J.; Hebert, H. *Structural basis for induced formation of the inflammatory mediator prostaglandin E2*. Proc Natl Acad Sci U S A 2008, 105, 11110-5.
69. Sjogren, T.; Nord, J.; Ek, M.; Johansson, P.; Liu, G.; Geschwindner, S. *Crystal structure of microsomal prostaglandin E2 synthase provides insight into diversity in the MAPEG superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A 2013, 110, 3806-11.
70. Brenneis, C.; Coste, O.; Schmidt, R.; Angioni, C.; Popp, L.; Nüsing, R. M.; Becker, W.; Scholich, K.; Geisslinger, G. *Consequences of altered eicosanoid patterns for nociceptive processing in mPGES-1-deficient mice*. J Cell Mol Med 2008, 12, 639-48.
71. Samuelsson, B.; Morgenstern, R.; Jakobsson, P. J. *Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target*. Pharmacol Rev 2007, 59, 207-24.

72. Koeberle, A.; Werz, O. *Inhibitors of the microsomal prostaglandin E(2) synthase-1 as alternative to non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)--a critical review*. *Curr Med Chem* 2009, 16, 4274-96.
73. Côté, B.; Boulet, L.; Brideau, C.; Claveau, D.; Ethier, D.; Frenette, R.; Gagnon, M.; Giroux, A.; Guay, J.; Guiral, S.; Mancini, J.; Martins, E.; Masse, F.; Methot, N.; Riendeau, D.; Rubin, J.; Xu, D.; Yu, H.; Ducharme, Y.; Friesen, R. W. *Substituted phenanthrene imidazoles as potent, selective, and orally active mPGES-1 inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett* 2007, 17, 6816-20.
74. Riendeau, D.; Aspiotis, R.; Ethier, D.; Gareau, Y.; Grimm, E. L.; Guay, J.; Guiral, S.; Juteau, H.; Mancini, J. A.; Methot, N.; Rubin, J.; Friesen, R. W. *Inhibitors of the inducible microsomal prostaglandin E2 synthase (mPGES-1) derived from MK-886*. *Bioorg Med Chem Lett* 2005, 15, 3352-5.
75. Chang, H. H.; Meuillet, E. J. *Identification and development of mPGES-1 inhibitors: where we are at?* *Future Med Chem* 2011, 3, 1909-34.
76. Arhancet, G. B.; Walker, D. P.; Metz, S.; Fobian, Y. M.; Heasley, S. E.; Carter, J. S.; Springer, J. R.; Jones, D. E.; Hayes, M. J.; Shaffer, A. F.; Jerome, G. M.; Baratta, M. T.; Zweifel, B.; Moore, W. M.; Masferrer, J. L.; Vazquez, M. L. *Discovery and SAR of PF-4693627, a potent, selective and orally bioavailable mPGES-1 inhibitor for the potential treatment of inflammation*. *Bioorg Med Chem Lett* 2013, 23, 1114-9.
77. Radmark, O.; Samuelsson, B. *Microsomal prostaglandin E synthase-1 and 5-lipoxygenase: potential drug targets in cancer*. *J Intern Med* 2010, 268, 5-14.
78. Elkady, M.; Niess, R.; Schaible, A. M.; Bauer, J.; Luderer, S.; Ambrosi, G.; Werz, O.; Laufer, S. A. *Modified acidic nonsteroidal anti-inflammatory drugs as dual inhibitors of mPGES-1 and 5-LOX*. *J Med Chem* 2012, 55, 8958-62.
79. Koeberle, A.; Rossi, A.; Zettl, H.; Pergola, C.; Dehm, F.; Bauer, J.; Greiner, C.; Reckel, S.; Hoernig, C.; Northoff, H.; Bernhard, F.; Dötsch, V.; Sautebin, L.; Schubert-Zsilavecz, M.; Werz, O. *The molecular pharmacology and in vivo activity of 2-(4-chloro-6-(2,3-dimethylphenylamino)pyrimidin-2-ylthio)octanoic acid (YS121), a dual inhibitor of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase*. *J Pharmacol Exp Ther* 2010, 332, 840-8.
80. Greiner, C.; Zettl, H.; Koeberle, A.; Pergola, C.; Northoff, H.; Schubert-Zsilavecz, M.; Werz, O. *Identification of 2-mercaptohexanoic acids as dual inhibitors of 5-lipoxygenase and microsomal prostaglandin E(2) synthase-1*. *Bioorg Med Chem* 2011, 19, 3394-401.
81. Hieke, M.; Greiner, C.; Thieme, T. M.; Schubert-Zsilavecz, M.; Werz, O.; Zettl, H. *A novel class of dual mPGES-1/5-LO inhibitors based on the alpha-naphthyl pirinixic acid scaffold*. *Bioorg Med Chem Lett* 2011, 21, 1329-33.
82. Altavilla, D.; Minutoli, L.; Polito, F.; Irrera, N.; Arena, S.; Magno, C.; Rinaldi, M.; Burnett, B. P.; Squadrito, F.; Bitto, A. *Effects of flavocoxid, a dual inhibitor of COX and 5-lipoxygenase enzymes, on benign prostatic hyperplasia*. *Br J Pharmacol* 2012, 167, 95-108.

83. Meirer, K.; Steinhilber, D.; Proschak, E. *Inhibitors of the arachidonic Acid cascade: interfering with multiple pathways*. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2014, 114, 83-91.
84. la Buscato, E.; Blocher, R.; Lamers, C.; Klingler, F. M.; Hahn, S.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Proschak, E. *Design and synthesis of dual modulators of soluble epoxide hydrolase and peroxisome proliferator-activated receptors*. J Med Chem 2012, 55, 10771-5.
85. DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G. *The price of innovation: new estimates of drug development costs*. J Health Econ 2003, 22, 151-85.
86. Klebe, G. *Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations*. Drug Discov Today 2006, 11, 580-94.
87. Hamza, A.; Zhao, X.; Tong, M.; Tai, H. H.; Zhan, C. G. *Novel human mPGES-1 inhibitors identified through structure-based virtual screening*. Bioorg Med Chem 2011, 19, 6077-86.
88. Waltenberger, B.; Wiechmann, K.; Bauer, J.; Markt, P.; Noha, S. M.; Wolber, G.; Rollinger, J. M.; Werz, O.; Schuster, D.; Stuppner, H. *Pharmacophore modeling and virtual screening for novel acidic inhibitors of microsomal prostaglandin E(2) synthase-1 (mPGES-1)*. J Med Chem 2011, 54, 3163-74.
89. Lee, K.; Pham, V. C.; Choi, M. J.; Kim, K. J.; Lee, K. T.; Han, S. G.; Yu, Y. G.; Lee, J. Y. *Fragment-based discovery of novel and selective mPGES-1 inhibitors Part 1: identification of sulfonamido-1,2,3-triazole-4,5-dicarboxylic acid*. Bioorg Med Chem Lett 2013, 23, 75-80.
90. Bauer, J.; Waltenberger, B.; Noha, S. M.; Schuster, D.; Rollinger, J. M.; Boustie, J.; Chollet, M.; Stuppner, H.; Werz, O. *Discovery of depsides and depsidones from lichen as potent inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 using pharmacophore models*. ChemMedChem 2012, 7, 2077-81.
91. De Simone, R.; Chini, M. G.; Bruno, I.; Riccio, R.; Mueller, D.; Werz, O.; Bifulco, G. *Structure-based discovery of inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1, 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein: promising hits for the development of new anti-inflammatory agents*. J Med Chem 2011, 54, 1565-75.
92. Rörsch, F. *In silico und in vitro Screening nach Inhibitoren der mikrosomalen Prostaglandin E Synthase (mPGES)*. Diploma Thesis, Goethe-Universität, Frankfurt, 2009.
93. Schmuker, M.; Schwarte, F.; Bruck, A.; Proschak, E.; Tanrikulu, Y.; Givehchi, A.; Scheiffele, K.; Schneider, G. *SOMMER: self-organising maps for education and research*. J Mol Model 2007, 13, 225-8.
94. Proschak, E.; Zettl, H.; Tanrikulu, Y.; Weisel, M.; Kriegl, J. M.; Rau, O.; Schubert-Zsilavecz, M.; Schneider, G. *From molecular shape to potent bioactive agents I: bioisosteric replacement of molecular fragments*. ChemMedChem 2009, 4, 41-4.
95. Bradford, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 1976, 72, 248-54.

96. Thoren, S.; Jakobsson, P. J. *Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4.* Eur J Biochem 2000, 267, 6428-34.
97. Ago, H.; Kanaoka, Y.; Irikura, D.; Lam, B. K.; Shimamura, T.; Austen, K. F.; Miyano, M. *Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis.* Nature 2007, 448, 609-12.
98. Schrödinger, L. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.* In 2010.
99. Martinez Molina, D.; Wetterholm, A.; Kohl, A.; McCarthy, A. A.; Niegowski, D.; Ohlson, E.; Hammarberg, T.; Eshaghi, S.; Haeggstrom, J. Z.; Nordlund, P. *Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase.* Nature 2007, 448, 613-6.
100. Sali, A. <http://www.salilab.org/modeller/>. In 2009.
101. John, B.; Sali, A. *Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment.* Nucleic Acids Res 2003, 31, 3982-92.
102. Shen, M. Y.; Sali, A. *Statistical potential for assessment and prediction of protein structures.* Protein Sci 2006, 15, 2507-24.
103. Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.* Journal of Applied Crystallography 1993, 26, 283-291.
104. The UniProt Consortium. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). <http://www.uniprot.org>
105. Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Soding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.* Mol Syst Biol 2011, 7, 539.
106. Labute, P. *LowModeMD--implicit low-mode velocity filtering applied to conformational search of macrocycles and protein loops.* J Chem Inf Model 2010, 50, 792-800.
107. Liu, J. F.; Kaselj, M.; Isome, Y.; Ye, P.; Sargent, K.; Sprague, K.; Cherrak, D.; Wilson, C. J.; Si, Y.; Yohannes, D.; Ng, S. C. *Design and synthesis of a quinazolinone natural product-templated library with cytotoxic activity.* J Comb Chem 2006, 8, 7-10.
108. Klapars, A.; Huang, X.; Buchwald, S. L. *A general and efficient copper catalyst for the amidation of aryl halides.* J Am Chem Soc 2002, 124, 7421-8.
109. Diehl, K. H.; Hull, R.; Morton, D.; Pfister, R.; Rabemampianina, Y.; Smith, D.; Vidal, J. M.; van de Vorstenbosch, C. *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes.* J Appl Toxicol 2001, 21, 15-23.
110. Hull, R. M. *Guideline limit volumes for dosing animals in the preclinical stage of safety evaluation.* Toxicology Subcommittee of the Association of the British Pharmaceutical Industry. Hum Exp Toxicol 1995, 14, 305-7.
111. Neervannan, S. *Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges.* Expert Opin Drug Metab Toxicol 2006, 2, 715-31.

112. Gad, S. C.; Cassidy, C. D.; Aubert, N.; Spainhour, B.; Robbe, H. *Nonclinical vehicle use in studies by multiple routes in multiple species*. *Int J Toxicol* 2006, 25, 499-521.
113. Jouyban, A.; Fakhree, M. A.; Shayanfar, A. *Review of pharmaceutical applications of N-methyl-2-pyrrolidone*. *J Pharm Pharm Sci* 2010, 13, 524-35.
114. U.S. National Library of Medicine. ChemIDplus advanced. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/> (Dezember 2012).
115. Santos, N. C.; Figueira-Coelho, J.; Martins-Silva, J.; Saldanha, C. *Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects*. *Biochem Pharmacol* 2003, 65, 1035-41.
116. Traul, K. A.; Driedger, A.; Ingle, D. L.; Nakhasi, D. *Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides*. *Food Chem Toxicol* 2000, 38, 79-98.
117. Sellers, R. S.; Antman, M.; Phillips, J.; Khan, K. N.; Furst, S. M. *Effects of miglyol 812 on rats after 4 weeks of gavage as compared with methylcellulose/tween 80*. *Drug Chem Toxicol* 2005, 28, 423-32.
118. Tapias, V.; Cannon, J. R.; Greenamyre, J. T. *Melatonin treatment potentiates neurodegeneration in a rat rotenone Parkinson's disease model*. *J Neurosci Res* 2010, 88, 420-7.
119. Pawelzik, S. C.; Uda, N. R.; Spahiu, L.; Jegerschold, C.; Stenberg, P.; Hebert, H.; Morgenstern, R.; Jakobsson, P. J. *Identification of key residues determining species differences in inhibitor binding of microsomal prostaglandin E synthase-1*. *J Biol Chem* 2010, 285, 29254-61.
120. Gao, W. *Prostaglandin D2 is involved in the mechanisms underlying fever in rats*. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, 2007.
121. Kalinski, P. *Regulation of immune responses by prostaglandin E2*. *J Immunol* 2012, 188, 21-8.
122. Schneider, A.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Lu, W. J.; Rao, R.; Fan, X.; Redha, R.; Davis, L.; Breyer, R. M.; Harris, R.; Guan, Y.; Breyer, M. D. *Membrane-associated PGE synthase-1 (mPGES-1) is coexpressed with both COX-1 and COX-2 in the kidney*. *Kidney Int* 2004, 65, 1205-13.
123. Kojima, F.; Matnani, R. G.; Kawai, S.; Ushikubi, F.; Crofford, L. J. *Potential roles of microsomal prostaglandin E synthase-1 in rheumatoid arthritis*. *Inflamm Regen* 2011, 31, 157-166.
124. Korotkova, M.; Jakobsson, P. J. *Microsomal prostaglandin E synthase-1 in rheumatic diseases*. *Frontiers in Pharmacology* 2011, 1.
125. Saha, S.; Engstrom, L.; Mackerlova, L.; Jakobsson, P. J.; Blomqvist, A. *Impaired febrile responses to immune challenge in mice deficient in microsomal prostaglandin E synthase-1*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, 288, R1100-7.
126. Bleicher, K. H.; Bohm, H. J.; Muller, K.; Alanine, A. I. *Hit and lead generation: beyond high-throughput screening*. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2, 369-78.
127. Mason, J. S.; Good, A. C.; Martin, E. J. *3-D pharmacophores in drug discovery*. *Curr Pharm Des* 2001, 7, 567-97.



128. Wolber, G.; Langer, T. *LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters*. *J Chem Inf Model* 2005, 45, 160-9.
129. Theivendren Panneer, S.; Palanirajan Vijayaraj, K. *Quinazoline Marketed drugs – A Review*. *Research in Pharmacy* 2011, 1, 1-21.
130. Xu, D.; Rowland, S. E.; Clark, P.; Giroux, A.; Cote, B.; Guiral, S.; Salem, M.; Ducharme, Y.; Friesen, R. W.; Methot, N.; Mancini, J.; Audoly, L.; Riendeau, D. *MF63 [2-(6-chloro-1H-phenanthro[9,10-d]imidazol-2-yl)-isophthalonitrile], a selective microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibitor, relieves pyresis and pain in preclinical models of inflammation*. *J Pharmacol Exp Ther* 2008, 326, 754-63.
131. Wang, J.; Limburg, D.; Carter, J.; Mbalaviele, G.; Gierse, J.; Vazquez, M. *Selective inducible microsomal prostaglandin E(2) synthase-1 (mPGES-1) inhibitors derived from an oxicam template*. *Bioorg Med Chem Lett* 2010, 20, 1604-9.
132. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, 46, 3-26.
133. Teague, S. J.; Davis, A. M.; Leeson, P. D.; Oprea, T. *The Design of Leadlike Combinatorial Libraries*. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999, 38, 3743-3748.
134. Hann, M. M.; Leach, A. R.; Harper, G. *Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery*. *J Chem Inf Comput Sci* 2001, 41, 856-64.
135. Wenlock, M. C.; Austin, R. P.; Barton, P.; Davis, A. M.; Leeson, P. D. *A comparison of physicochemical property profiles of development and marketed oral drugs*. *J Med Chem* 2003, 46, 1250-6.
136. Lazarus, M.; Eguchi, N.; Matsumoto, S.; Nagata, N.; Yano, T.; Killian, G. J.; Urade, Y. *Species-specific expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenases in male monkey reproductive organs*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004, 71, 233-40.
137. Stark, K.; Bylund, J.; Torma, H.; Sahlen, G.; Oliw, E. H. *On the mechanism of biosynthesis of 19-hydroxyprostaglandins of human seminal fluid and expression of cyclooxygenase-2, PGH 19-hydroxylase (CYP4F8) and microsomal PGE synthase-1 in seminal vesicles and vas deferens*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005, 75, 47-64.
138. Mbalaviele, G.; Pauley, A. M.; Shaffer, A. F.; Zweifel, B. S.; Mathialagan, S.; Mnich, S. J.; Nemirovskiy, O. V.; Carter, J.; Gierse, J. K.; Wang, J. L.; Vazquez, M. L.; Moore, W. M.; Masferrer, J. L. *Distinction of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) inhibition from cyclooxygenase-2 inhibition in cells using a novel, selective mPGES-1 inhibitor*. *Biochem Pharmacol* 2010, 79, 1445-54.
139. Thoren, S.; Weinander, R.; Saha, S.; Jegerschold, C.; Pettersson, P. L.; Samuelsson, B.; Hebert, H.; Hamberg, M.; Morgenstern, R.; Jakobsson, P. J. *Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination*. *J Biol Chem* 2003, 278, 22199-209.

140. Ouellet, M.; Falguyret, J. P.; Ear, P. H.; Pen, A.; Mancini, J. A.; Riendeau, D.; Percival, M. D. *Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin E synthase-1*. *Protein Expr Purif* 2002, 26, 489-95.
141. Leveridge, M. V.; Bardera, A. I.; LaMarr, W.; Billinton, A.; Bellenie, B.; Edge, C.; Francis, P.; Christodoulou, E.; Shillings, A.; Hibbs, M.; Fosberry, A.; Tanner, R.; Hardwicke, P.; Craggs, P.; Sinha, Y.; Elegbe, O.; Alvarez-Ruiz, E.; Martin-Plaza, J. J.; Barroso-Poveda, V.; Baddeley, S.; Chung, C. W.; Hutchinson, J. *Lead discovery for microsomal prostaglandin E synthase using a combination of high-throughput fluorescent-based assays and RapidFire mass spectrometry*. *J Biomol Screen* 2012, 17, 641-50.
142. Massé, F.; Guiral, S.; Fortin, L. J.; Cauchon, E.; Ethier, D.; Guay, J.; Brideau, C. *An automated multistep high-throughput screening assay for the identification of lead inhibitors of the inducible enzyme mPGES-1*. *J Biomol Screen* 2005, 10, 599-605.
143. Pradelles, P.; Grassi, J.; Maclouf, J. *Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholinesterase*. *Methods Enzymol* 1990, 187, 24-34.
144. Yin, K.; Forman, L. J. *Enzyme immunoassays (EIAs) of eicosanoids*. *Methods Mol Biol* 1999, 120, 107-18.
145. David Percival, M. *Continuous spectrophotometric assay amenable to 96-well plate format for prostaglandin E synthase activity*. *Anal Biochem* 2003, 313, 307-10.
146. Schmidt, R.; Coste, O.; Geisslinger, G. *LC-MS/MS-analysis of prostaglandin E2 and D2 in microdialysis samples of rats*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005, 826, 188-97.
147. Cook, J. A.; Mitchell, J. B. *Viability measurements in mammalian cell systems*. *Anal Biochem* 1989, 179, 1-7.
148. Judson, R.; Kavlock, R.; Martin, M.; Reif, D.; Houck, K.; Knudsen, T.; Richard, A.; Tice, R. R.; Whelan, M.; Xia, M.; Huang, R.; Austin, C.; Daston, G.; Hartung, T.; Fowle, J. R., 3rd; Wooge, W.; Tong, W.; Dix, D. *Perspectives on validation of high-throughput assays supporting 21st century toxicity testing*. *ALTEX* 2013, 30, 51-6.
149. Berg, E. L.; Yang, J.; Melrose, J.; Nguyen, D.; Privat, S.; Rosler, E.; Kunkel, E. J.; Ekins, S. *Chemical target and pathway toxicity mechanisms defined in primary human cell systems*. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010, 61, 3-15.
150. Niles, A. L.; Moravec, R. A.; Riss, T. L. *Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development*. *Expert Opin Drug Discov* 2008, 3, 655-69.
151. Slater, K. *Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery*. *Curr Opin Biotechnol* 2001, 12, 70-4.
152. Cronin, M. T.; Bajot, F.; Enoch, S. J.; Madden, J. C.; Roberts, D. W.; Schwobel, J. *The in chemico-in silico interface: challenges for integrating experimental and computational chemistry to identify toxicity*. *Altern Lab Anim* 2009, 37, 513-21.

153. Matthews, E. J.; Contrera, J. F. *In silico approaches to explore toxicity end points: issues and concerns for estimating human health effects*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007, 3, 125-34.
154. Merlot, C. *In silico methods for early toxicity assessment*. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2008, 11, 80-5.
155. Vedani, A.; Dobler, M.; Lill, M. A. *The challenge of predicting drug toxicity in silico*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006, 99, 195-208.
156. Borlak, J. *Handbook of toxicogenomics strategies and applications*.
157. Valdes, J. J. *Toxicogenomics and proteomics*. IOS Press: Amsterdam [u.a.], 2004; p VIII, 207 S.
158. Euling, S. Y. *Toxicogenomics in risk assessment*. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013.
159. Wang, Z.; Kim, M. C.; Marquez, M.; Thorsen, T. *High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis*. *Lab Chip* 2007, 7, 740-5.
160. Peskin, A. V.; Winterbourn, C. C. *A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1)*. *Clin Chim Acta* 2000, 293, 157-66.
161. Hehlhans, T.; Pfeffer, K. *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. *Immunology* 2005, 115, 1-20.
162. Weber, A.; Wasiliew, P.; Kracht, M. *Interleukin-1 (IL-1) pathway*. *Sci Signal* 2010, 3, cm1.
163. Dinarello, C. A. *Blocking IL-1 in systemic inflammation*. *J Exp Med* 2005, 201, 1355-9.
164. Davidsohn, I. *Sulfonamide toxicity; interpretation of laboratory findings*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1946, 55, 447-52.
165. Lynn, J. M. *Sulfonamide toxicity*. *Calif Med* 1949, 70, 48-56.
166. Slatore, C. G.; Tilles, S. A. *Sulfonamide hypersensitivity*. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004, 24, 477-90, vii.
167. Labreze, C.; Chawki, D.; Taieb, A.; Maleville, J. *[Skin reactions following administration of sulfonamide]*. *Arch Pediatr* 1995, 2, 1125-6.
168. Chantachaeng, W.; Chularojanamontri, L.; Kulthanan, K.; Jongjarearnprasert, K.; Dhana, N. *Cutaneous adverse reactions to sulfonamide antibiotics*. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2011, 29, 284-9.
169. Knowles, S.; Shapiro, L.; Shear, N. H. *Should celecoxib be contraindicated in patients who are allergic to sulfonamides? Revisiting the meaning of 'sulfa' allergy*. *Drug Saf* 2001, 24, 239-47.
170. Wulf, N. R.; Matuszewski, K. A. *Sulfonamide cross-reactivity: Is there evidence to support broad cross-allergenicity?* *Am J Health Syst Pharm* 2013, 70, 1483-94.
171. Lehmann, D. F. *The metabolic rationale for a lack of cross-reactivity between sulfonamide antimicrobials and other sulfonamide-containing drugs*. *Drug Metab Lett* 2012, 6, 129-33.
172. Shear, N. H.; Spielberg, S. P.; Grant, D. M.; Tang, B. K.; Kalow, W. *Differences in metabolism of sulfonamides predisposing to idiosyncratic toxicity*. *Ann Intern Med* 1986, 105, 179-84.

173. Bock, J. M.; Menon, S. G.; Sinclair, L. L.; Bedford, N. S.; Goswami, P. C.; Domann, F. E.; Trask, D. K. *Celecoxib toxicity is cell cycle phase specific*. *Cancer Res* 2007, 67, 3801-8.
174. Combes, R. D. *In silico methods for toxicity prediction*. *Adv Exp Med Biol* 2012, 745, 96-116.
175. Mathias, N. R.; Crison, J. *The use of modeling tools to drive efficient oral product design*. *AAPS J* 2012, 14, 591-600.
176. Bernardo, P. H.; Tong, J. C. *In silico design of small molecules*. *Methods Mol Biol* 2012, 800, 25-31.
177. Damre, A. A.; Iyer, K. R.; Lyubimov, A. V. *The Significance and Determination of Plasma Protein Binding*. In *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*, John Wiley & Sons, Inc.: 2011.
178. Lardner, A. *The effects of extracellular pH on immune function*. *J Leukoc Biol* 2001, 69, 522-30.
179. Steen, K. H.; Steen, A. E.; Reeh, P. W. *A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, in vitro*. *J Neurosci* 1995, 15, 3982-9.
180. Giroux, A.; Boulet, L.; Brideau, C.; Chau, A.; Claveau, D.; Cote, B.; Ethier, D.; Frenette, R.; Gagnon, M.; Guay, J.; Guiral, S.; Mancini, J.; Martins, E.; Masse, F.; Methot, N.; Riendeau, D.; Rubin, J.; Xu, D.; Yu, H.; Ducharme, Y.; Friesen, R. W. *Discovery of disubstituted phenanthrene imidazoles as potent, selective and orally active mPGES-1 inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett* 2009, 19, 5837-41.
181. Chiasson, J. F.; Boulet, L.; Brideau, C.; Chau, A.; Claveau, D.; Cote, B.; Ethier, D.; Giroux, A.; Guay, J.; Guiral, S.; Mancini, J.; Masse, F.; Methot, N.; Riendeau, D.; Roy, P.; Rubin, J.; Xu, D.; Yu, H.; Ducharme, Y.; Friesen, R. W. *Trisubstituted ureas as potent and selective mPGES-1 inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett* 2011, 21, 1488-92.
182. Kariv, I.; Cao, H.; Oldenburg, K. R. *Development of a high throughput equilibrium dialysis method*. *J Pharm Sci* 2001, 90, 580-87.
183. Waters, N. J.; Jones, R.; Williams, G.; Sohal, B. *Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding*. *J Pharm Sci* 2008, 97, 4586-95.
184. Cook, J. A.; Geisel, J.; Halushka, P. V.; Reines, H. D. *Prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid*. *New Horiz* 1993, 1, 60-9.
185. Jakobsson, P. J.; Morgenstern, R.; Mancini, J.; Ford-Hutchinson, A.; Persson, B. *Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism*. *Protein Sci* 1999, 8, 689-92.
186. Koeberle, A.; Haberl, E. M.; Rossi, A.; Pergola, C.; Dehm, F.; Northoff, H.; Troschuetz, R.; Sautebin, L.; Werz, O. *Discovery of benzo[g]indol-3-carboxylates as potent inhibitors of microsomal prostaglandin E(2) synthase-1*. *Bioorg Med Chem* 2009, 17, 7924-32.
187. Koeberle, A.; Zettl, H.; Greiner, C.; Wurglics, M.; Schubert-Zsilavecz, M.; Werz, O. *Pirinixic acid derivatives as novel dual inhibitors of microsomal*

- prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase*. J Med Chem 2008, 51, 8068-76.
188. Trebino, C. E.; Eskra, J. D.; Wachtmann, T. S.; Perez, J. R.; Carty, T. J.; Audoly, L. P. *Redirection of eicosanoid metabolism in mPGES-1-deficient macrophages*. J Biol Chem 2005, 280, 16579-85.
  189. Boulet, L.; Ouellet, M.; Bateman, K. P.; Ethier, D.; Percival, M. D.; Riendeau, D.; Mancini, J. A.; Methot, N. *Deletion of microsomal prostaglandin E2 (PGE2) synthase-1 reduces inducible and basal PGE2 production and alters the gastric prostanoid profile*. J Biol Chem 2004, 279, 23229-37.
  190. Cheng, Y.; Wang, M.; Yu, Y.; Lawson, J.; Funk, C. D.; Fitzgerald, G. A. *Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function*. J Clin Invest 2006, 116, 1391-9.
  191. Idborg, H.; Olsson, P.; Leclerc, P.; Raouf, J.; Jakobsson, P. J.; Korotkova, M. *Effects of mPGES-1 deletion on eicosanoid and fatty acid profiles in mice*. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2013.
  192. Dahlen, S. E. *Treatment of asthma with antileukotrienes: first line or last resort therapy?* Eur J Pharmacol 2006, 533, 40-56.
  193. Werz, O.; Steinhilber, D. *Development of 5-lipoxygenase inhibitors--lessons from cellular enzyme regulation*. Biochem Pharmacol 2005, 70, 327-33.
  194. Pergola, C.; Dodt, G.; Rossi, A.; Neunhoeffer, E.; Lawrenz, B.; Northoff, H.; Samuelsson, B.; Radmark, O.; Sautebin, L.; Werz, O. *ERK-mediated regulation of leukotriene biosynthesis by androgens: a molecular basis for gender differences in inflammation and asthma*. Proc Natl Acad Sci U S A 2008, 105, 19881-6.
  195. Pergola, C.; Rogge, A.; Dodt, G.; Northoff, H.; Weinigel, C.; Barz, D.; Radmark, O.; Sautebin, L.; Werz, O. *Testosterone suppresses phospholipase D, causing sex differences in leukotriene biosynthesis in human monocytes*. FASEB J 2011, 25, 3377-87.
  196. Schaible, A. M.; Koeberle, A.; Northoff, H.; Lawrenz, B.; Weinigel, C.; Barz, D.; Werz, O.; Pergola, C. *High capacity for leukotriene biosynthesis in peripheral blood during pregnancy*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2013, 89, 245-55.
  197. Maier, T. J.; Tausch, L.; Hoernig, M.; Coste, O.; Schmidt, R.; Angioni, C.; Metzner, J.; Grösch, S.; Pergola, C.; Steinhilber, D.; Werz, O.; Geisslinger, G. *Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase*. Biochem Pharmacol 2008, 76, 862-72.
  198. Gabler, M.; Schubert-Zsilavec, M. *Tertiary alkylamines as nucleophiles in substitution reactions at heteroaromatic halide during the synthesis of the highly potent pirinixic acid derivative 2-(4-chloro-6-(2,3-dimethylphenylamino)pyrimidin-2-ylthio)octanoic acid (YS-121)*. Molecules 2011, 16, 10013-28.
  199. Hieke, M.; Greiner, C.; Dittrich, M.; Reisen, F.; Schneider, G.; Schubert-Zsilavec, M.; Werz, O. *Discovery and biological evaluation of a novel class of dual microsomal prostaglandin E2 synthase-1/5-lipoxygenase inhibitors based on 2-[(4,6-diphenethoxy)pyrimidin-2-yl]thio]hexanoic acid*. J Med Chem 2011, 54, 4490-507.

200. Yamamoto, S.; Sugahara, S.; Ikeda, K.; Shimizu, Y. *Pharmacological profile of a novel phosphodiesterase 7A and -4 dual inhibitor, YM-393059, on acute and chronic inflammation models*. Eur J Pharmacol 2006, 550, 166-72.
201. Yang, H. J.; Youn, H.; Seong, K. M.; Yun, Y. J.; Kim, W.; Kim, Y. H.; Lee, J. Y.; Kim, C. S.; Jin, Y. W.; Youn, B. *Psoralidin, a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX, regulates ionizing radiation (IR)-induced pulmonary inflammation*. Biochem Pharmacol 2011, 82, 524-34.
202. Ekins, S.; Ring, B. J.; Grace, J.; McRobie-Belle, D. J.; Wrighton, S. A. *Present and future in vitro approaches for drug metabolism*. J Pharmacol Toxicol Methods 2000, 44, 313-24.
203. Ekins, S.; Waller, C. L.; Swaan, P. W.; Cruciani, G.; Wrighton, S. A.; Wikel, J. H. *Progress in predicting human ADME parameters in silico*. J Pharmacol Toxicol Methods 2000, 44, 251-72.
204. Korfmacher, W. A. *Using mass spectrometry for drug metabolism studies*.
205. Tingle, M. D.; Helsby, N. A. *Can in vitro drug metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies?* Environ Toxicol Pharmacol 2006, 21, 184-90.
206. Lipscomb, J. C.; Poet, T. S. *In vitro measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling*. Pharmacol Ther 2008, 118, 82-103.
207. Walsky, R. L.; Obach, R. S. *Validated assays for human cytochrome P450 activities*. Drug Metab Dispos 2004, 32, 647-60.
208. Kusahara, H.; Sugiyama, Y. *In vitro-in vivo extrapolation of transporter-mediated clearance in the liver and kidney*. Drug Metab Pharmacokinet 2009, 24, 37-52.
209. Bauer, J.; Koeberle, A.; Dehm, F.; Pollastro, F.; Appendino, G.; Northoff, H.; Rossi, A.; Sautebin, L.; Werz, O. *Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinyll pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy in vivo*. Biochem Pharmacol 2011, 81, 259-68.
210. Koeberle, A.; Rossi, A.; Bauer, J.; Dehm, F.; Verotta, L.; Northoff, H.; Sautebin, L.; Werz, O. *Hyperforin, an Anti-Inflammatory Constituent from St. John's Wort, Inhibits Microsomal Prostaglandin E(2) Synthase-1 and Suppresses Prostaglandin E(2) Formation in vivo*. Front Pharmacol 2011, 2, 7.
211. Baumgartner, L.; Sosa, S.; Atanasov, A. G.; Bodensieck, A.; Fakhrudin, N.; Bauer, J.; Favero, G. D.; Ponti, C.; Heiss, E. H.; Schwaiger, S.; Ladurner, A.; Widowitz, U.; Loggia, R. D.; Rollinger, J. M.; Werz, O.; Bauer, R.; Dirsch, V. M.; Tubaro, A.; Stuppner, H. *Lignan derivatives from Krameria lappacea roots inhibit acute inflammation in vivo and pro-inflammatory mediators in vitro*. J Nat Prod 2011, 74, 1779-86.
212. Park, S. J.; Han, S. G.; Ahsan, H. M.; Lee, K.; Lee, J. Y.; Shin, J. S.; Lee, K. T.; Kang, N. S.; Yu, Y. G. *Identification of novel mPGES-1 inhibitors through screening of a chemical library*. Bioorg Med Chem Lett 2012, 22, 7335-9.
213. Gibaud, S.; Attivi, D. *Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications*. Expert Opin Drug Deliv 2012, 9, 937-51.

214. Mallick, S.; Pattnaik, S.; Swain, K.; De, P. K. *Current perspectives of solubilization: potential for improved bioavailability*. Drug Dev Ind Pharm 2007, 33, 865-73.
215. Seedher, N.; Bhatia, S. *Solubility enhancement of Cox-2 inhibitors using various solvent systems*. AAPS PharmSciTech 2003, 4, E33.
216. Alkhamis, K. A.; Allaboun, H.; Al-Momani, W. Y. *Study of the solubilization of gliclazide by aqueous micellar solutions*. J Pharm Sci 2003, 92, 839-46.
217. Grassi, M.; Colombo, I.; Lapasin, R. *Drug release from an ensemble of swellable crosslinked polymer particles*. J Control Release 2000, 68, 97-113.
218. Hadgraft, J.; Valenta, C. *pH, pK(a) and dermal delivery*. Int J Pharm 2000, 200, 243-7.
219. Constantinides, P. P. *Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects*. Pharm Res 1995, 12, 1561-72.
220. Lawrence, M. J.; Rees, G. D. *Microemulsion-based media as novel drug delivery systems*. Adv Drug Deliv Rev 2000, 45, 89-121.
221. Talegaonkar, S.; Azeem, A.; Ahmad, F. J.; Khar, R. K.; Pathan, S. A.; Khan, Z. I. *Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery*. Recent Pat Drug Deliv Formul 2008, 2, 238-57.
222. Narang, A. S.; Delmarre, D.; Gao, D. *Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions*. Int J Pharm 2007, 345, 9-25.
223. Subramanian, N.; Ray, S.; Ghosal, S. K.; Bhadra, R.; Moulik, S. P. *Formulation design of self-microemulsifying drug delivery systems for improved oral bioavailability of celecoxib*. Biol Pharm Bull 2004, 27, 1993-9.
224. Strickley, R. G. *Solubilizing excipients in oral and injectable formulations*. Pharm Res 2004, 21, 201-30.
225. Ren, Q. *Intranasal Drug Delivery of Physostigmine and Evaluation of Direct Targeting Efficiency to the Central Nervous System*. St. John's University: 2007.
226. Yiv, S. H.; Tustian, A. K. *Drug delivery compositions suitable for intravenous injection* US 6,245,349 B1, 2001.
227. Prajapati, H. N.; Dalrymple, D. M.; Serajuddin, A. T. *A comparative evaluation of mono-, di- and triglyceride of medium chain fatty acids by lipid/surfactant/water phase diagram, solubility determination and dispersion testing for application in pharmaceutical dosage form development*. Pharm Res 2012, 29, 285-305.
228. Sadurni, N.; Solans, C.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M. J. *Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications*. Eur J Pharm Sci 2005, 26, 438-45.
229. Patel, N.; Schmid, U.; Lawrence, M. J. *Phospholipid-based microemulsions suitable for use in foods*. J Agric Food Chem 2006, 54, 7817-24.
230. Althaus, F. R.; Frey, H. H. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke: 2007.

231. Hescheler, J.; Oberdisse, E.; Hackenthal, E.; Rommelspacher, H.; Hübner-Steiner, U. *Pharmakologie und Toxikologie*. Springer: 2001.
232. Lin, J. H.; Cocchetto, D. M.; Duggan, D. E. *Protein binding as a primary determinant of the clinical pharmacokinetic properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Clin Pharmacokinet 1987, 12, 402-32.
233. Graefe, K. H.; Bönisch, H.; Lutz, W. K. *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme: 2011.
234. Gensthaller, B. M. *Diclofenac: Lang wirksam im Entzündungsgewebe*. Pharmazeutische Zeitung 2007, 152, 38.
235. Nakanishi, M.; Gokhale, V.; Meillet, E. J.; Rosenberg, D. W. *mPGES-1 as a target for cancer suppression: A comprehensive invited review "Phospholipase A2 and lipid mediators"*. Biochimie 2010, 92, 660-4.
236. Brenneis, C. *Untersuchung der Rolle von mPGES-1 bei der nozizeptiven Transmission*. 2007; p VI, 97 Bl.
237. Hollebeeck, S.; Raas, T.; Piront, N.; Schneider, Y. J.; Toussaint, O.; Larondelle, Y.; During, A. *Dimethyl sulfoxide (DMSO) attenuates the inflammatory response in the in vitro intestinal Caco-2 cell model*. Toxicol Lett 2011, 206, 268-75.
238. Jacob, S. W.; Herschler, R. *Pharmacology of DMSO*. Cryobiology 1986, 23, 14-27.
239. Bage, T.; Lindberg, J.; Lundeberg, J.; Modeer, T.; Yucel-Lindberg, T. *Signal pathways JNK and NF-kappaB, identified by global gene expression profiling, are involved in regulation of TNFalpha-induced mPGES-1 and COX-2 expression in gingival fibroblasts*. BMC Genomics 2010, 11, 241.
240. Urbanek, M. G.; Picken, E. B.; Kalliainen, L. K.; Kuzon, W. M., Jr. *Specific force deficit in skeletal muscles of old rats is partially explained by the existence of denervated muscle fibers*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2001, 56, B191-7.
241. Jachak, S. M. *PGE synthase inhibitors as an alternative to COX-2 inhibitors*. Curr Opin Investig Drugs 2007, 8, 411-5.



## 9 ANHANG

### 9.1 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

1. Hanke T, Rörsch F, Thieme TM, Ferreiros N, Schneider G, Geisslinger G, Proschak E, Grösch S, Schubert-Zsilavecz M; **Synthesis and pharmacological characterization of benzenesulfonamides as dual species inhibitors of human and murine mPGES-1**. Bioorg Med Chem. 2013;21:7874-83.
2. Rörsch F, Buscató E, Deckmann K, Schneider G, Schubert-Zsilavecz M, Geisslinger G, Proschak E, Grösch S; **Structure-activity relationship of nonacidic quinazolinone inhibitors of human microsomal prostaglandin synthase 1 (mPGES 1)**; J Med Chem. 2012 Apr 26;55(8):3792-803
3. Rörsch F, Wobst I, Zettl H, Schubert-Zsilavecz M, Grösch S, Geisslinger G, Schneider G, Proschak E; **Nonacidic inhibitors of human microsomal prostaglandin synthase 1 (mPGES 1) identified by a multistep virtual screening protocol**; J Med Chem. 2010 Jan 28;53(2):911-5.
4. Rörsch F, Deckmann K, Buscató E, Schneider G, Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Geisslinger G, Proschak E, Grösch S; **Optimization and pharmacological profiling of mPGES1 inhibitors**; 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e. V. (DGPT 2011); 30. März bis 1. April 2011 in Frankfurt a. M. (Poster)
5. Rörsch F, Buscató E, Schneider G, Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Geisslinger G, Proschak E, Grösch S; **DESIGN OF mPGES-1 INHIBITORS**; RICT 2010, 30. Juni bis 2. Juli 2010, Reims, Frankreich (Poster)

### 9.2 Sonstige Veröffentlichungen

1. Buscato E, Wisniewska JM, Rodl CB, Bruggerhoff A, Kaiser A, Rörsch F, Kostewicz E, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M, Grösch S, Steinhilber D, Hofmann B, Proschak E; **Structure-activity relationship and in vitro pharmacological evaluation of imidazo[1,2-a]pyridine-based inhibitors of 5-LO**. Future Med Chem. 2013;5:865-80

2. Kahnt AS, Rörsch F, Diehl O, Hofmann B, Lehmann C, Steinbrink SD, Angioni C, Geisslinger G, Grösch S, Steinhilber D, Maier TJ; ***Cysteinyl leukotriene-receptor-1 antagonists interfere with PGE<sub>2</sub> synthesis by inhibiting mPGES-1 activity.*** Biochem Pharmacol. 2013;86:286-96.
3. Deckmann K, Rörsch F, Geisslinger G, Grösch S; ***Identification of DNA-protein complexes using an improved, combined western blotting-electrophoretic mobility shift assay (WEMSA) with a fluorescence imaging system;*** Mol Biosyst. 2012 Apr 3;8(5):1389-95.
4. Deckmann K, Rörsch F, Geisslinger G, Grösch S; ***Dimethylcelecoxib induces an inhibitory complex consisting of HDAC1/NF- $\kappa$ B(p65)RelA leading to transcriptional downregulation of mPGES-1 and EGR1;*** Cell Signal. 2012 Feb;24(2):460-7.
5. Wisniewska JM, Rödl CB, Kahnt AS, Buscató E, Ulrich S, Tanrikulu Y, Achenbach J, Rörsch F, Grösch S, Schneider G, Cinatl J Jr, Proschak E, Steinhilber D, Hofmann B; ***Molecular characterization of EP6--a novel imidazo[1,2-a]pyridine based direct 5-lipoxygenase inhibitor;*** Biochem Pharmacol. 2012 Jan 15;83(2):228-40.
6. Deckmann K, Rörsch F, Steri R, Schubert-Zsilavec M, Geisslinger G, Grösch S; ***Dimethylcelecoxib inhibits mPGES-1 promoter activity by influencing EGR1 and NF- $\kappa$ B;*** Biochem Pharmacol. 2010 Nov 1;80(9):1365-72.
7. Hartmann D, Rode S, Sandner J, Rörsch F, Deckmann K, Grösch S; ***Rolle von Lipiden in der Tumorentstehung;*** Deutschland Land der Ideen April 2010 (Poster)

## 9.3 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Florian Alexander Rörsch  
Josef-Weinheber-Straße 8a  
5204 Straßwalchen  
Österreich

Geboren am 21.08.1982 in Frankfurt am Main,  
Deutschland

### Wissenschaftliche Ausbildung

- 2009 - 2012 Naturwissenschaftliche Promotion im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie am *pharmazentrum frankfurt / ZAFES*, Institut für Klinische Pharmakologie der Uniklinik Frankfurt unter Anleitung von Prof. Dr. Sabine Grösch, Prof. Dr. Dieter Steinhilber, Jun.-Prof. Dr. Ewgenij Proschak, Prof. Dr. Dr. Gerd Geisslinger
- 10/2009 - 10/2012 Forschungsstipendium der Firma Merz GmbH & Co. KGaA im Rahmen des internationalen Graduierten Kollegs „Roles of Eicosanoids in Biology and Medicine“ (GRK 757)
- 06/2009 Aufnahme in die Graduiertenschule GRADE BioMed FIRST - die Goethe Graduate Academy "Frankfurt International Research School for Translational Biomedicine"
- 05/2009 Erlangung des akademischen Grades „Diplom-Bioinformatiker“
- 10/2003 - 05/2009 Bioinformatikstudium an der Goethe Universität in Frankfurt am Main

### Schulische Ausbildung

- 06/2002 Allgemeine Hochschulreife an der Freiherr-vom-Stein-Schule
- 1993 - 2002 Besuch des Freiherr-vom-Stein-Gymnasiums in Frankfurt

1989 - 1993            Besuch der Minna-Specht-Grundschule in Frankfurt

### **Berufs- und Arbeitserfahrung**

Seit 01/2013            Sandoz Biopharmaceuticals and Oncology Injectables,  
Unterach am Attersee, Österreich

2009 - 2011            Betreuung, Versuchsplanung und Anleitung von  
internationalen Studenten des Masterstudienganges „MSc  
Interdisciplinary Neuroscience“

2006                    Praktikum bei Merz Pharmaceuticals GmbH (Abteilung  
R+D)

2005 - 2008            Beschäftigt bei Ongate GmbH (Entwicklungsabteilung)

2004 - 2005            Aushilfe bei Vogelsbergbäcker GmbH

2002 - 2003            Zivildienst bei den Mainkrokodilen gGmbH Frankfurt

2001 - 2002            Layouterstellung und Umsetzung der Internetplattform der  
Firma Sensortherm GmbH

1999 - 2001            Redakteur bei Art+Work=Werbeagentur, Frankfurt

1999                    Tätigkeit als Trainer einer Jugendgruppe im Sportverein  
TSV Sachsenhausen 1857, Frankfurt

## 9.4 Förderung und Danksagung

Diese interdisziplinäre Arbeit, an der Schnittstelle von Bioinformatik, Chemie, Biologie, Medizin und Pharmazie, wurde am Institut für Klinische Pharmakologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main angefertigt. Unterstützt wurde diese Arbeit durch Merz GmbH & Co. KGaA, das LOEWE Lipid Signaling Forschungszentrum Frankfurt (LiFF), die Deutsche Forschungsgesellschaft DFG (Sachbeihilfe PR 1405/2-1 und SFB 1039 Projekt A07), durch Oncogenic Signaling Frankfurt (OSF), den Fonds der Chemischen Industrie und die European Graduate School "Roles of Eicosanoids in Biology and Medicine" (DFG GRK 757/1). Mein besonderer Dank geht an meine Graduiertenschule GRADE BioMed FIRST - die Goethe Graduate Academy "Frankfurt International Research School for Translational Biomedicine".

Ganz herzlich danke ich an dieser Stelle meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Sabine Grösch für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung, Unterstützung und Förderung. Ebenso danken möchte ich meinem langjährigen Betreuer und Mentor Jun.-Prof. Dr. Ewgenij Proschak, Herrn Prof. Dr. Dieter Steinhilber für eine tolle Arbeit in der Graduiertenschule und die Begutachtung meiner Arbeit, dem Direktor der Klinischen Pharmakologie, Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger, für ein spannendes Arbeitsumfeld, lehrreiche Einblicke in die Medizin und seine Unterstützung bei dieser Arbeit, Prof. Dr. Gisbert Schneider, der mich die Bioinformatik gelehrt hat und die Grundsteine für diese Arbeit gelegt, sowie Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz für die Unterstützung der Synthese von Sulfonamidwirkstoffen.

Danken will ich auch den vielen Kollegen und Freunden, die zu dieser Arbeit direkt oder indirekt beigetragen haben: Dr. Klaus Deckmann, Dr. Theresa Thieme, Thomas Hanke, Dr. Arsequell Estel la Buscato, Kerstin Birod, Carlo Angioni, Sandra Labocha, Yannick Schreiber, Julia Homann, Dr. Nerea Ferreirós Bouzas, Dr. Astrid Kahnt, Dr. Ivonne Wobst, Dr. Susanne Schiffmann, Dr. Thorsten Maier, Ruth Wanger, Marthe Wegener, Dominik Vogt, Dr. Brigitte Held, Wei Xiao, Friederike Scholl, Ute Burkhardt, Karin Meirer, Janosch

Achenbach, sowie allen Mitarbeitern der Klinischen Pharmakologie und Pharmazeutischen Chemie der Goethe-Universität Frankfurt.

Zu guter letzt bedanke ich mich bei meiner Familie und Freunden, deren Motivation, Unterstützung, Freude und Liebe mich jeden Tag aufs Neue begleiten.

## 9.5 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über die "Entwicklung von Inhibitoren der mikrosomalen Prostaglandin E Synthase 1" selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den .....

Florian Alexander Rörsch