

**Topische Antimykotika zur
photodynamischen Therapie
der Onychomykose**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

VORGELEGT VON
Björn Jansen

Kiel 2022

Dekan:

Prof. Dr. Frank Kempken

Erstgutachter:

Prof. Dr. Christian Peifer

Zweitgutachterin:

Prof. Dr. Deniz Tasdemir

Tag der mündlichen Prüfung:

13.07.2022

Zum Druck genehmigt:

13.07.2022

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. Christian Peifer
im Fachbereich Pharmazeutische und Medizinische Chemie
des Pharmazeutischen Institutes
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
im Zeitraum von Oktober 2017 bis Juni 2022
angefertigt

Teile dieser Arbeit wurde im Rahmen einer Erfindungsmeldung (Aktenzeichen: IPR_2022_0054) an
die Abteilung für Technologietransfer der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel übermittelt.

Erklärung zu §8 Abs. 1 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Björn Jansen, an Eides statt, dass Inhalt und Form dieser Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig von mir erarbeitet und zusammengestellt wurden. Es wurden keine weiteren Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen verwendet. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) entstanden und hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Es handelt sich um meinen ersten Promotionsversuch und mir wurde kein akademischer Grad entzogen.

Ort, Datum

gez. (Björn Jansen)

Meiner Familie.

Kurzzusammenfassung

In der Behandlung der Nagelpilzerkrankung, auch Onychomykose genannt, stehen hauptsächlich zwei Therapien zur Auswahl. Zum einen kann eine systemische Behandlung mit oraler Arzneimittelgabe erfolgen, die auf Grund von Nebenwirkungen oder Wechselwirkungen jedoch nicht für jeden zugänglich ist. Zum anderen kann eine topische Behandlung erfolgen, in der das Antimykotikum direkt auf dem Nagel appliziert wird. Durch die schwer zu durchdringende Keratinstruktur der Nägel ist die Wirkstoffverfügbarkeit bei den bisherigen Antimykotika jedoch stark eingeschränkt. Dazu kommt es durch die lange Therapie von über drei Monaten oft zu einer geringen Adhärenz bei den Patienten, sodass häufig ein Rezidiv eintritt.

In der Bestrebung, die topischen Behandlungsmöglichkeiten zu verbessern, wurde ein innovatives Therapiekonzept basierend auf der photodynamischen Aktivierung der Wirkstoffe verfolgt. So sollte die gesuchte Substanzklasse neben einer hohen Affinität zu Keratin (Keratinophilie), um die Wirkstoffverfügbarkeit im Nagel zu erhöhen, durch Bestrahlung mit Licht einer Keratindurchdringenden Wellenlänge ($\lambda > 500$ nm) photodynamisch aktivierbar sein.

Beide Voraussetzungen fanden sich in der Klasse der Naphthochinone, bekannt durch den Naturfarbstoff Henna (Lawson, 2-Hydroxynaphthochinon) zum Färben von Haut und Haaren, wieder. Die Derivate des Naphthazarins (**12**, 5,8-Dihydroxynaphthochinon) wiesen zudem geeignete Anregungswellenlängen zwischen 500 - 550 nm auf.

Durch das Permeationsmodell der FRANZ-Diffusionszelle in Verbindung mit Keratinmembranen, konnte für das NaphthazarinGrundgerüst **12** eine hohe Keratinophilie nachgewiesen werden, da sich die Substanz im Keratin anreicherte, aber nicht in die darunterliegende Phase überging. In anschließenden Untersuchungen zur Eindringtiefe in Keratin zeigte sich mittels RAMAN-spektroskopischen Untersuchungen ein Vorteil gegenüber dem Wirkstoff Ciclopirox (**99**) in der topischen Arzneimittelformulierung Ciclopoli®.

Zeitgleich wurden in Synthesen weitere Naphthazarinderivate dargestellt, sodass in photodynamischen IC₅₀-Bestimmungen an den Hauptpathogenen der Onychomykose *Candida albicans* und *Trichophyton rubrum* 15 Verbindungen untersucht wurden. Bei 14 Verbindungen wurde gegen beide Erreger eine photoaktivierte Wirkung nach Bestrahlung festgestellt und unter anderem mit Deoxyshikonin (**20**) eine Hitsubstanz gegen beide Pathogene gefunden. Mit 213 ± 55 nM gegen *C. albicans* (Ca) und 32.2 ± 17.4 nM gegen *T. rubrum* (Tru) erwies sich **20** potenter als die jeweiligen Standardreferenzen Nystatin (**31**, Ca: 692 ± 128 nM) und Clotrimazol (**103**, Tru: 114 ± 61 nM).

Anschließend wurde anhand von mit Tru-Kulturen infiziertem Keratin und einer Wirkstoffformulierung in Form eines Nagellackes eine photodynamische Wirkung im Nagelmodell direkt nachgewiesen. Die Keratinophilie sowie die photodynamische Aktivierung wurde unter Verwendung von Deoxyshikonin (**20**), stellvertretend für die Naphthazarine, in diesem *in vitro* Experiment bestätigt.

Abstract

In the treatment of onychomycosis there are mainly two therapies available. The first one, the systemic treatment, is based on an oral drug administration and due to side effects or interactions with other medication it is not accessible to everyone. The second option is the topical treatment which consists of the topical application of the antifungal directly onto the nail. This treatment suffers from a low availability of the active ingredient in the nail plate due to the difficult penetration of the keratin structure. In addition, the long duration of more than three month in which the therapies take place, often lead to a low compliance of the patients, so that frequent recurrences occur.

In an effort to improve the topical treatment, an innovative therapy concept based on the photodynamic activation of the active ingredient was pursued. In addition to having a high affinity for keratin (keratinophilicity), to increase the availability of the active ingredient in the nail, the new class of substances should be able to be photoactivated by irradiation with light of a keratin-penetrating wavelength ($\lambda > 500$ nm).

Both requirements were found in the class of naphthoquinones, known from the natural dye henna (lawson, 2-hydroxynaphthoquinone) that is known for its coloring properties of the skin and the hair. Especially the derivatives of naphthazarin (**104**, 5,8-dihydroxynaphthoquinone) showed suitable excitation wavelengths between 500 - 550 nm.

Using the permeation model of the FRANZ diffusion cell in connection with keratin membranes, a high keratinophilicity could be demonstrated for the naphthazarin scaffold **12**, since the substance accumulated in the keratin but did not pass into the underlying layer. In subsequent investigations to assess the depth of penetration into the keratin, RAMAN-spectroscopic investigations showed an advantage of deoxyshikonin **20** used in a self-provided and not optimized varnish compared to the active ingredient ciclopirox (**99**) of the commercially available topical drug Ciclopoli®.

In this study, naphthazarin derivatives were synthesized so that 15 compounds were investigated in photodynamic IC₅₀ determinations on the main pathogens *candida albicans* and *trichophyton rubrum*. In 14 compounds, a photoactivated effect against both pathogens was found after irradiation. Deoxyshikonine (**105**) was found to be a hit compound against both pathogens. With 213 ± 55 nM against *C. albicans* (Ca) and 32.2 ± 17.4 nM versus *T. rubrum* (Tru), **105** proved to be more potent than the standard references nystatin (**106**, Ca: 692 ± 128 nM) and clotrimazole (**107**, Tru: 114 ± 61 nM). In a subsequent nail model, a photodynamic effect in the tissue was directly demonstrated using infected keratin (Tru) and a topically applied active ingredient formulation in the form of a varnish. The keratinophilicity as well as the photodynamic activation was confirmed in this *in vitro* experiment using deoxyshikonine (**105**), representative for the naphthazarin compounds.

Abkürzungen

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACN	Acetonitril
Atm.	Atmosphäre
Aufl.	Auflage
bs	breites Singulett
Ca	<i>Candida albicans</i>
d	Duplett
DC	Dünnschichtchromatografie
DCM	Dichlormethan
DME	1,2-Dimethoxyethan, Monoglyme
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DOS	Deoxyshikonin bzw. Deoxyalkannin
EE	Ethylacetat
EI	Elektronische Ionisation
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alteri</i>)
ex	<i>excitation</i>
FCA	FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung/Alkylierung
ges.	gesättigt
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC	<i>internal conversion</i>
ISC	<i>intersystem crossing</i>
i. Vak.	im Vakuum

IR	Infrarot
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LG	<i>leaving group</i> , Abgangsgruppe
Lsg.	Lösung
m _c	Multiplett (zentriert)
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle
NBS	N-Bromsuccinimid
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NQ	<i>naphthoquinone</i> (Naphthochinon)
org.	organisch
PE	Petrolether
prim.	primär
PS	<i>photosensitizer</i>
PUVA	Psoralen und UV-A-Strahlung
q	Quartett
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
S.	Seite
sek.	sekundär
sh	<i>shoulder</i>
spp.	<i>species pluralis</i>
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TEA	Trimethylamin
tert.	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
Tru	<i>Trichophyton rubrum</i>
UV/vis	Ultraviolett/ <i>visible</i>
wässr.	wässrig

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Onychomykose	2
1.2. Der Aufbau des Nagels	3
1.3. Permeationsuntersuchungen am Keratin: Die FRANZ-Diffusionszelle	5
1.4. Therapien der Onychomykose	7
1.5. Photodynamische Therapie	8
2. Zielsetzung	13
3. Ermitteln der neuen Wirkstoffklasse	15
3.1. Kriterien	15
3.2. Bestimmung der Aktivierungswellenlänge	16
3.3. Initiales Wirksamkeitsscreening an <i>C. albicans</i> und <i>T. rubrum</i>	22
3.4. IC ₅₀ -Bestimmung der Naphthazarinderivate 12 , 19 und 20 an <i>C. albicans</i>	24
4. Synthese	27
4.1. Retrosynthetischer Ansatz	27
4.2. Synthesen des Naphthazarinringgrundgerüsts (Retrosynthetischer Ansatz 1)	28
4.2.1. Aus 1,5-Dinitronaphthalin	30
4.2.2. Aus Hydrochinon/1,4-Dimethoxybenzen	31
4.2.3. Einführen der Seitenkette in das Naphthazarinringgerüst (108)	35
4.3. Synthese der Zielverbindungen (Retrosynthetischer Ansatz 2)	38
4.3.1. Synthese der Fumar-/Maleinsäurederivate	38
4.3.2. Synthese der Zielverbindungen	43
4.3.3. Aminierung des Naphthazarinringgerüsts 12	45
4.3.4. Optimierungsversuche der FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung	46
5. Permeationsverhalten der Naphthazarinderivate in Keratin	51
5.1. Permeationsmodell: FRANZ-Diffusionszellen	51
5.1.1. Miniatur-FRANZ-Zellen	53
5.2. RAMAN-mikroskopische Untersuchungen	55
5.3. Verhalten des Naphthazarinringgerüsts im Keratin	59

5.4. Photochemische Aktivierung im Keratin	63
6. Wirksamkeitsuntersuchungen an den Pathogenen	65
6.1. Bestimmung der IC ₅₀ -Werte gegen <i>C. albicans</i>	65
6.2. Bestimmung der IC ₅₀ -Werte gegen <i>T. rubrum</i>	68
6.3. Struktur-Wirkungs-Beziehung	72
6.4. Testung der Hitsubstanz in einem infizierten Nagelmodell	75
6.4.1. Erste Testreihe	75
6.4.2. Zweite Testreihe	79
6.4.3. Bestimmung der Erregerlast in den Membranen	82
6.4.4. Dritte Testreihe	83
7. Fazit	91
8. Ausblick	95
9. Experimenteller Teil	99
9.1. Allgemeine Arbeitstechniken	99
9.1.1. NMR-Spektroskopie	99
9.1.2. HPLC-Analytik	100
9.1.3. Dünnschicht-Chromatographie	101
9.1.4. Flash-Chromatographie	101
9.1.5. Massenspektrometrie	101
9.2. Spezielle Arbeitsmethoden	101
9.2.1. Lampe für die Bestrahlungstests	101
9.2.2. UV/Vis-Messungen	102
9.2.3. Membranen aus Rinderhufen	102
9.2.4. Testung mit FRANZ-Diffusionszellen	102
9.2.5. Miniatur-FRANZ-Zellen	103
9.2.6. Raman-Mikroskopie	103
9.2.7. ESR-Spektroskopie	104
9.2.8. Untersuchung der Verfärbung	104
9.3. Biologische Testungen	105
9.3.1. Screenings in 96-well-Mikrotiterplatten	105
9.3.2. Modifiziertes Infizierte-Membranmodell	107
9.4. Synthesen	111
9.4.1. Synthese von 2- <i>n</i> -Butylaminonaphthazarin (95)	134
A. Anhang	137
A.1. Verbindungsverzeichnis	137
A.2. Etablierung der FRANZ-Diffusionszelle anhand von Ciclopirox (99)	141
A.3. Ramanspektren	142

A.4. Zusatzdaten zur eingesetzten Lampe	142
A.5. Emissionsspektrum der eingesetzten Lampe	143
A.6. UV/Vis-Spektren der synthetisierten Zielverbindungen	143
A.7. Dosis-Wirkungs-Kurven der Testsubstanzen gegen <i>C. albicans</i>	144
A.8. Dosis-Wirkungs-Kurven der Testsubstanzen gegen <i>T. rubrum</i>	153
Danksagung	163
Literatur	165

Kapitel 1.

Einleitung

Bereits seit 3000 v. Chr. ist die Anwendung von Lacken zur Verschönerung des Aussehens der menschlichen Finger- und Fußnägel bekannt und diese wurden unter Verwendung von Naturfarbstoffen eingesetzt.^[1] Auf Grund fehlender Erfahrungen zu filmbildenden Substanzen wurden die Farbstoffe in Eiweiß, in Ölen oder als wässrige Pasten angemischt und direkt auf die Nägel aufgetragen, um zu einer Färbung zu gelangen. So wurden auch im antiken Ägypten die Nägel der Oberschicht mit dem „Henna-Farbstoff“ zu einem kräftigen Orangeton gefärbt, was anhand von Rückständen an jahrtausendealten Mumien nachgewiesen wurde.^[2]

Im Laufe der Zeit industrialisierte sich diese Form der Körperverschönerung, als im Jahre 1932 die Firma *Revlon* gegründet wurde, die auf Basis damaliger Autolackierungen die ersten industriell gefertigten kosmetischen Nagellacke der Welt vermarktete.^[3] Mit der Zeit wandelte sich diese Branche in einen weltweiten Markt mit einem geschätzten Wert von etwa 14.3 Mrd. USD (2021).^[4] Die Verwendung dieser Nagellacke in der breiten Bevölkerung, ist vornehmlich kosmetischer Natur, um die Fingernägel mit Farben oder auch Texturen zu versehen. Mitunter dienen sie aber auch dem Zweck, Deformationen und Verfärbungen der Nägel zu überdecken, die ansonsten zu Schamgefühlen und Unwohlsein der Betroffenen führen können.^[5,6] Diese optischen Veränderungen werden beispielsweise durch Psoriasis (Schuppenflechte), Traumata (Sport oder Unfall), aber auch durch Infektionskrankheiten bewirkt.^[7,8]

Aber nicht nur den kosmetischen Nutzen fand man in der Zusammensetzung aus filmbildendem Polymer, Weichmacher, Lösungsmittel und Farbstoff bzw. Pigment, sondern auch den praktischen Nutzen, Wirkstoffe in die Nägel einzubringen.^[6] In der Kosmetik werden neben färbenden Substanzen auch verschiedene Zusätze hinzugefügt, um die Konstitution des Nagels zu stärken. Dieses Einbringen von Substanzen wurde in der medizinischen Anwendung ausgenutzt, um die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen im Nagelkompartiment zu vermitteln. Die Lackschicht dient dabei als Wirkstoffdepot, von dem aus ein eingesetzter Wirkstoff in den Nagel permeieren kann. Hauptsächlich in der Therapie der Onychomykose findet diese Darreichungsform ihre Verwendung.^[9]

1.1. Onychomykose

Der menschliche Nagel bildet eine natürliche Barriere zum Schutze der Finger.^[10] Ist diese Barriere beschädigt oder liegt ein geschwächtes Immunsystem vor, sei es durch Medikamente oder Krankheiten induziert, kann es zu einer Infektion mit Humanpathogenen und zur Ausbildung einer Onychomykose kommen.^[11,12] Die Nagelpilzerkrankung, auch Onychomykose (gr.) oder *Tinea unguium* (lat.) genannt, ist mit etwa 50 % die häufigste der weltweit auftretenden Nagelerkrankungen.^[13,14] Die hauptverantwortlichen Pathogene sind die Dermatophyten *Trichophyton rubrum* und *Trichophyton mentagrophytes*, die etwa 60 - 70 % der durch Dermatophyten ausgelösten Onychomykose ausmachen.^[15,16] Daneben werden auch Infektionen durch Hefen oder Schimmelpilze ausgelöst. Unter den Hefen sind vor allem die *Candida spp.*, wie *Candida albicans*, die Pathogene. Zur gesunden Pilzflora des Menschen gehörend, breiten sich die Hefen vor allem bei immunsuppressierten Patienten opportunistisch aus.^[17] Eine Nagelpilzerkrankung verursacht von Schimmelpilzen (nicht-dermatophytische Schimmelpilze, z.B. *Aspergillus spp.* und *Fusarium spp.*) ist mit 10 - 15 % aller Fälle im Vergleich zur Gesamtheit an Infektionen jedoch eher selten.^[18] Neben diesen Infektionen kann es auch zu einer gemischten Infektion von mehreren Pathogenen kommen, sodass eine erfolgreiche Therapie weiter erschwert wird.^[19,20]

Die Verbreitung der Onychomykose ist auf alle Bevölkerungsschichten und Altersgruppen verteilt. Jedoch liegen Faktoren vor, die eine Infektion der Nägel begünstigen. So sind vor allem ältere Menschen (schlechtere Durchblutung und schwächeres Immunsystem), Sportler (Beschädigung der Nägel) und immunsupprimierte Menschen besonders betroffen.^[21] Aber auch alltägliche Faktoren wie zu enges Schuhwerk, häufiges Barfußlaufen oder Schwitzen an den Extremitäten können eine Onychomykose begünstigen. Die Infektion ist ein weltweites Problem, von der angenommen wird, dass mindestens 10 % der Weltbevölkerung betroffen ist.^[22]

Die Krankheit, die hauptsächlich die Fußnägel und dort vor allem den großen Zeh betrifft, äußert sich in verschiedenen optischen Erscheinungen. Je nach Art der Infektion und Angriffspunkt der Pathogene, kann sie eine andere Gestalt annehmen. Im nachfolgenden ist eine Auflistung der Auftretenden Arten von Nagelpilzbefall.^[23,24]

- DLSO (Ditale und Laterale Subunguale Onychomykose)
Die häufigste Form der Onychomykose. Eine Infektion erfolgt über das Hyponychium (siehe Abb. 1.1) zwischen Nagel und Zehen- bzw. Fingerspitze. Die DLSO wird durch eine Hautpilzinfektion (*Tinea pedis*) begünstigt.
- WSO (Weiße Superfizielle Onychomykose)
Die superfizielle oder auch oberflächliche Onychomykose findet sich in den oberen Nagelschichten (dorsaler Nagel) wieder und ist an einer weißlichen Verfärbung zu erkennen. Von dort aus kann sie sich in den Nagel ausbreiten.
- PSO (Proximale Subunguale Onychomykose)
In dieser selteneren Form der Onychomykose wird die Nagelfalz und die Nagelhaut (Cuticulum), am Lunulum befindlich, befallen.

- EO (Endonyx-Onychomykose)
Hierbei handelt es sich um einen Befall der gesamten Nagelplatte mit einer weißen Verfärbung.
- TDO (Totale dystrophische Onychomykose)
Hierbei handelt es sich um die vollständige Zerstörung der Nagelplatte und stellt das Endstadium aller Onychomykosearten dar.

Wird die Krankheit nicht behandelt, ist keine Heilung zu erwarten. Die Folge sind zerstörte Nagelplatten (TDO) und die Infektion noch nicht betroffener Nägel bzw. die Verbreitung der Pathogene.^[25-27] Desweiteren kann es zu unregelmäßigem Nagelwachstum und Infektionen bei nachwachsenden Nägeln führen. Wird die Krankheit mit den aktuell verfügbaren Therapien behandelt, kommt es bei etwa 10 - 53 % der Patienten innerhalb von zweieinhalb Jahren zu Rezidiven.^[28-31] Daher ist es unerlässlich, die Forschung auf diesem Gebiet voranzutreiben. Kann eine systemische Behandlung nicht verfolgt werden, sei es auf Grund von Kontraindikationen im Zusammenhang mit anderen Medikamenten oder durch Leber- oder Nierenschäden bedingt, steht nur eine topische Behandlung zur Verfügung.^[13] Die Wirkstoffe werden in Formulierungen wie Lacken, Lösungen oder Cremes äußerlich auf den Nagel aufgetragen und verhindern Nebenwirkungen, sowie Interaktionen mit anderen Medikamenten (siehe Abschnitt 1.4). Ihre primäre Limitation besteht im kompakten Aufbau des Nagels.

1.2. Der Aufbau des Nagels

Die menschliche Nagelplatte besteht aus einer Keratinplatte, die im Durchschnitt eine Dicke von 0.25 - 1 mm aufweist.^[32-34] Die Platte ist aus etwa 80 - 90 Schichten aus flachen, keratinisierten Hautzellen aufgebaut, die untereinander kovalent verbunden sind. Durch den hohen Cysteingehalt (10.6 %) in den Aminosäureketten wird durch Bildung von Disulfidbrücken eine dichte Quervernetzung geschaffen.^[35,36] Im Vergleich dazu besitzt die Haut lediglich 1.2 % Cysteine und ist dadurch flexibler. Neben dieser Proteinstruktur befinden sich Spurenelemente wie beispielsweise Eisen, Zink, Kupfer, Magnesium und Calcium im Nagel.^[37-39] Der Aufbau der Nagelplatte wird heute als mehrteilig angesehen.^[40,41] Er beginnt oben mit der dorsalen Nagelplatte, die eine sehr harte Schicht mit einer niedrigen Permeabilität darstellt. Darunter liegt die intermediäre, die wie die nachfolgende ventrale Schicht eine höhere Permeation zulässt. Die ventrale Schicht liegt direkt auf dem Nagelbett auf (siehe. Abb. 1.1). Das Dickenverhältnis der drei Abschnitte ist 3 : 5 : 2, sodass die intermediäre den größten Teil einnimmt. In seiner Struktur ist das Nagelkeratin fast identisch mit der Struktur der Haare und wird aus α -Keratin gebildet.^[42,43] In Abb. 1.1 sind die Bestandteile des Nagels zu sehen.

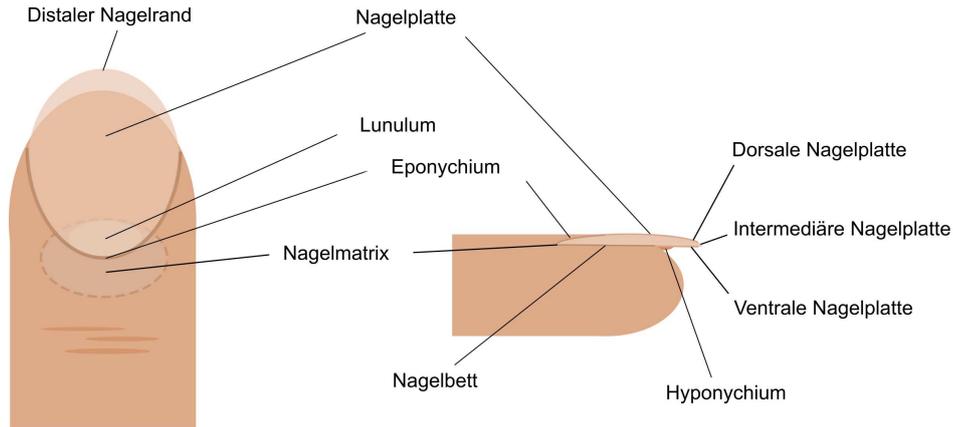


Abb. 1.1.: Schematische Darstellung des Aufbaus des menschlichen Nagels. Die Abbildung wurde nach WALTERS *et al.* erstellt^[36].

Durch diese feste Struktur schützt der Nagel die Finger und Zehen, die als primäre Werkzeuge des Menschen neben mechanischen auch chemischen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind.^[10] Desweiteren bietet seine Keratinstruktur auch einen starken Schutz vor eingehender elektromagnetischer Strahlung wie beispielsweise Sonnenstrahlung. Sowohl im UV-Bereich als auch Teile des sichtbaren Lichts (unter 600 nm) werden durch das Keratin absorbiert, bzw. gestreut. In Abhängigkeit von der Nageldicke sinkt der prozentuale Teil der transmittierten Strahlung (siehe Abb. 1.2).^[44] Licht mit Wellenlängen von unter 300 nm wird beinahe vollständig absorbiert.^[45]

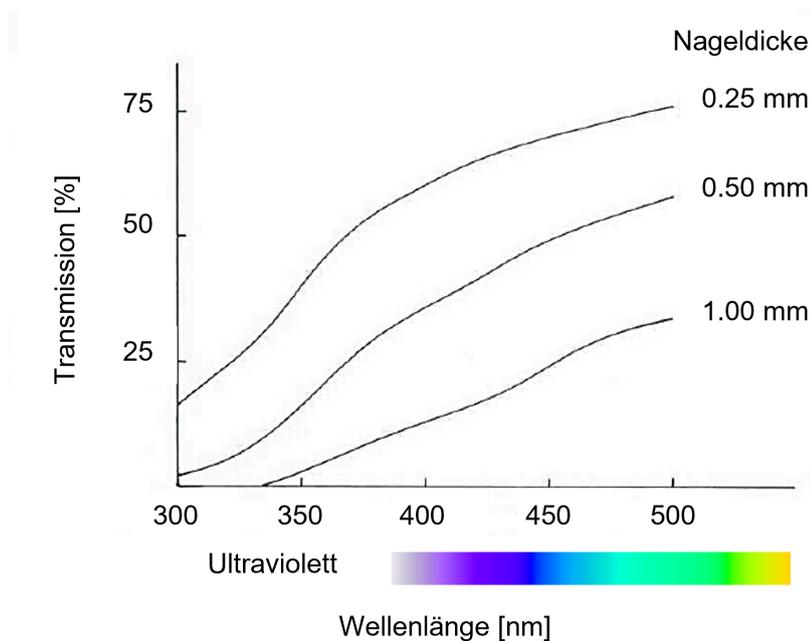


Abb. 1.2.: Abgebildet ist das Transmissionsspektrum durch den menschlichen Nagel. In Abhängigkeit von der Dicke des Nagels wird das Licht kleinerer Wellenlängen (< 300 nm) vollständig absorbiert und gelangt nicht bis ans Nagelbett. Die Abbildung wurde von PARKER *et al.* entnommen und modifiziert.^[44]

Um diese Struktur zu durchdringen und Wirkstoffe in den Nagel einbringen zu können, spielen sogenannte Penetrationsverstärker (*penetration enhancers*) eine wichtige Rolle. Diese Moleküle sorgen durch ihre Struktur und chemischen Eigenschaften dafür, dass die dicht vernetzten Keratine aufgelockert werden.^[35] Dieser Prozess geschieht durch Einlagerung oder chemische Reduktion der Disulfidbrücken, was zu einem Auflösen der Quervernetzung der Keratine führt.

Ist der Nagel dehydriert, wird seine ansonsten flexible Struktur hart und spröde. Das Wasser, das sich zwischen den Keratinstrukturen einlagert, wirkt als natürlicher Penetrationsverstärker und Weichmacher des Nagels.^[33] Der Wassergehalt entspricht einem Prozentanteil von 10-25%, wobei der Lipidgehalt nur einen Anteil von weniger als 5 % ausmacht.^[46,47] Durch Diffusionsuntersuchungen wurde festgestellt, dass der Nagel sich entsprechend wie eine hydrophile Gelmembran verhält und anders als beispielsweise die Haut, keine lipophile Membran darstellt.^[36,48] Dieses Verhalten beeinflusst die Permeation topisch angewendeter Wirkstoffe und hängt von den Eigenschaften des Moleküls an sich (Größe, Sterik, Hydrophilie und Ladung) und der verwendeten Formulierung (Darreichungsform, pH-Wert, Wirkstoffkonzentration, *penetration enhancer*) des Wirkstoffs ab. Aber auch der Zustand und die Form des Nagels kann zur Effizienz beitragen.

Die Untersuchung eines neuen, potenziellen Wirkstoffs für eine topische Anwendung sowie seine Formulierung werden daher direkt an Keratinmodell durchgeführt, um alle Einflüsse berücksichtigen zu können.^[35]

1.3. Permeationsuntersuchungen am Keratin: Die FRANZ-Diffusionszelle

Das Fehlen einer einheitlichen Testmethode, die als Ersatz für echte humane Finger- und Fußnägel eingesetzt werden kann, erschwerte lange Zeit die Untersuchung neuer transungualer Wirkstoffe und die Erforschung des Diffusionsmechanismus von Substanzen im Keratinkompartiment im Allgemeinen.^[49,50] Das 1997 von MERTIN und LIPPOLD vorgestellte Nagelmodell unter Verwendung von FRANZ-Diffusionszellen (siehe Abb. 1.3) etablierte sich daher rasch zu einem wissenschaftlichen Standard in diesem Forschungsbereich.^[49]

In Verbindung mit einer Membran aus Keratin ergibt sich ein Modell, das als Ersatz für einen menschlichen Nagel herangezogen werden kann. Das darunter liegende Akzeptorkompartiment stellt eine entfernte Imitation des Nagelbetts bzw. des Blutes dar. Das Keratin der Membran wird typischerweise aus *bovinem* Huf angefertigt und ist zwischen 50 und 300 μm in der Dicke. Obgleich in seiner Struktur weniger kompakt als das Keratin humaner Nägel eignet es sich durch seine einfache Handhabung und Bearbeitbarkeit als ideales Modell, um erste Daten zur Affinität zu Keratin (Keratinophilie) von potenziellen Wirkstoffen zu sammeln. Mit Hilfe der nachfolgenden Gleichung kann ein angenäherter Bezug zwischen dem für *bovinem* Keratin bestimmten Permeabilitätskoeffizienten P_H und dem im humanen Keratin bestimmten Koeffizienten P_N gezogen werden (siehe Gleichung 1.1).^[52]

$$\log P_N = 3.723 + 1.751 \log P_H \quad (1.1)$$

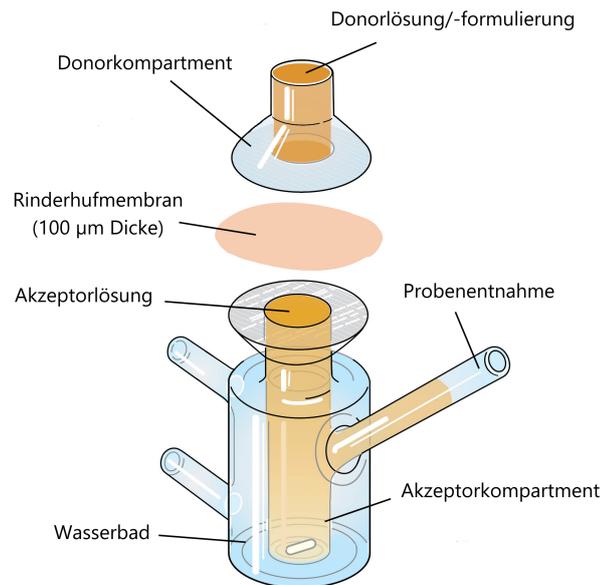


Abb. 1.3.: Schematischer Aufbau einer FRANZ-Diffusions-Zelle wie sie von MERTIN und LIPPOLD etabliert und in dieser Arbeit in Verbindung mit Keratinmembranen als Nagelmodell eingesetzt wurde. Die Abbildung wurde der Firmenseite von PermeGear entnommen und modifiziert.^[51]

In diesem Zusammenhang entspricht P_N dem Permeabilitätskoeffizienten durch den menschlichen Nagel und P_H dem Permeabilitätskoeffizienten durch Rinderhufkeratin.

P_H kann über die Bestimmung der diffundierten Masse des Wirkstoffs pro Zeit ($\frac{dm}{dt}$) erfolgen. Die Massen des diffundierten Wirkstoffs wird per Kalibriergerate und HPLC-Analytik ermittelt. Mit der nachfolgenden Gleichung 1.2 können die Permeabilitätskoeffizienten P bestimmt werden:

$$P = \frac{dm}{dt} = \frac{D_B \cdot A}{h_B} (C_{BD} - C_{BA}) \quad (1.2)$$

Hier entspricht D_B dem effektiven Diffusionskoeffizienten, h_B der Dicke der Membran und C_{BD} Konzentration der Donorseite und C_{BA} Konzentration der Akzeptorseite.

Experimente auf dieser Grundlage wurden von verschiedenen Autoren durchgeführt.^[40,52] Dabei wurde ein direkter Zusammenhang des Permeabilitätskoeffizienten P und des Molekulargewichts einer Verbindung nachgewiesen. Ob der geringe Lipidanteil im Nagel und die Lipophilie einer Substanz ebenfalls eine Rolle in der Permeation spielt (lipophiler Permeationsweg), ist jeher Gegenstand von Diskussionen.^[53] Diese empirisch bestimmten Sachverhalte dienen als eine Grundlage für die Untersuchung potenzieller neuer Wirkstoffe für die topische Anwendung.

Neben *bovinem* Keratin wird auch von der Verwendung von *porcinen* oder *equinen* Keratinmembranen berichtet.^[54,55] Nicht nur die Herkunft der Membranen unterscheidet sich in unterschiedlichen Arbeiten, sondern auch die eingesetzten Formulierungen/Medien für Donor- und Akzeptorkompartimente weichen oftmals voneinander ab. Sie werden für den Zweck der jeweiligen Testung ausgewählt und an den eingesetzten Wirkstoff angepasst. Daher ist eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Studien schwierig. In Tab. 1.1 sind Beispiele verschiedener Zusammensetzungen aufgelistet.

Tab. 1.1.: Versuchsbedingungen veröffentlichter Diffusionstests mit FRANZ-Zellen oder modifizierten FRANZ-Zellen.

Donormedium	Akzeptormedium	Referenz
Wirkstoffe in PBS-Puffer/EtOH (42 % v/v, pH 8.1)	PBS-Puffer/EtOH (42 % v/v, pH 8.1)	MERTIN und LIPPOLD ^[56]
EtOH in H ₂ O und Alkohole	D ₂ O	NAUMANN <i>et al.</i> ^[57]
Ciclopirox-Lack	PBS-Puffer (pH 7.4)	TÄUBER <i>et al.</i> ^[58]
Ciclopirox-Lack	PBS-Puffer (pH 7.4)	MONTI <i>et al.</i> ^[59]
Formulierung	EtOH (70 % v/v)	MIRON <i>et al.</i> ^[60]

Es gibt variable Möglichkeiten, die Testsubstanz auf die Membran aufzubringen. Je nach Eigenschaften des Wirkstoffs werden dafür Lösungen, Gele oder Lacke verwendet. Durch physiologische Puffer als Akzeptormedium kann das menschliche Nagelbett vereinfacht imitiert werden, sodass die ermittelten Eigenschaften des potenziellen Wirkstoffs auf den menschlichen Nagel übertragen werden können.

1.4. Therapien der Onychomykose

Die bisher therapeutisch eingesetzten antimykotischen Wirkstoffe beruhen im Allgemeinen auf dem Prinzip der Hemmung der Ergosterolbiosynthese in den Pilzorganismen.^[61–63] Im Menschen erfolgt keine Biosynthese zu Ergosterol, sodass sich die bisherige Entwicklung von Antimykotika in diesem für Pilzorganismen spezifischen Biosyntheseweg konzentriert hat. Liegt eine Onychomykose vor, wird in erster Regel die orale Therapie verfolgt, die wie auch die parenterale Therapie eine lange Anwendungszeit und Adhärenz bei Patienten benötigt.^[35] Dies ist durch das sehr langsame Nagelwachstum und die benötigte Anreicherung des Wirkstoffs im Keratin bedingt.

Wirkstoffe wie Terbinafin (35 - 50 % Heilungsrate) , Fluconazol (bis 31 % Heilungsrate) und Itracozazol (25 - 40 % Heilungsrate) sorgen mit Heilungsraten von bis zu 50 % für vergleichsweise hohe Erfolge.^[30,64,65] Diese systemischen Antimykotika können jedoch eine Reihe von schwerwiegenden Nebenwirkungen verursachen, so dass eine orale bzw. parenterale Therapie oft limitiert wird. Insbesondere durch die ausgeprägte Lebertoxizität und häufigen Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten ist eine systemische antimykotische Therapie längst nicht für alle von der Onychomykose betroffenen Patienten möglich. Daher muss oftmals auf eine andere Therapiemethode wie die mechanische bzw. chirurgische oder die topische Therapiemethode zurückgegriffen werden.^[35] Früher als Therapie praktiziert, findet das Ziehen der infizierten Nagelplatte auf Grund von Nachteilen wie Schmerzen und Beeinträchtigung im Alltag nicht mehr statt. Eine mechanische Bearbeitung

der Nägel findet nur noch unterstützend in Form von Abtragen von loseem Nagelmaterial oder bei der Nagelabrasion (Abschleifen) zum Anrauen der Oberfläche statt, damit topische Substanzen besser eindringen können.

Die dritte Klasse der möglichen Therapien ist der Einsatz topischer Antimykotika. Während mit Wirkstoffen wie Clotrimazol (Azolantimykotika) oder Terbinafin (Allylamine) gute Anwendungserfolge zur Behandlung von Hautpilzkrankungen erzielt werden, gilt dieses jedoch nicht gleichermaßen zur Therapie von Nagelpilzkrankungen.^[66] Im Gegensatz zur Haut zeichnet sich das Nagelkompartiment durch eine sehr stark limitierte Bioverfügbarkeit für Wirkstoffe aus (siehe Abschnitt 1.2).^[35] Aktuell eingesetzte topische Therapeutika zur Behandlung der Onychomykose sind z.B. Bifonazol (z.B. Canesten[®]), Terbinafin (Generika), Ciclopirox (z.B. Nagel Batrafen[®], Ciclopoli[®]) oder Amorolfin (z.B. Loceryl[®]). Dabei sind die Wirkstoffe typischerweise in speziellen Cremes, Lösungen oder Lacken formuliert, um eine lokale Wirksamkeit am Nagel zu vermitteln. Grundsätzlich müssen diese Arzneiformen vom Patienten täglich und konsequent über einen langen Zeitraum (bei Zehennägeln typischerweise > 3 Monate) eingesetzt werden, um einen Therapieerfolg bei der nur sehr langsam nachwachsenden Nagelsubstanz zu erreichen und um Rezidive einer Pilzinfektion nachhaltig zu verhindern.^[67]

Die therapeutische Effektivität der bisher eingesetzten topischen Antimykotika zur Behandlung der Onychomykose hat sich jedoch in zahlreichen Studien an Patienten als unzureichend herausgestellt.^[68] Hauptgründe sind hier vor allem die mangelhafte Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe im Nagelkompartiment sowie die notwendigen langen Anwendungszeiträume durch die Patienten mit entsprechenden hohen Anforderungen an die Adhärenz. Wenn eine topische Behandlung der Onychomykose nicht erfolgreich war und/oder sich die Mykose bereits über einen größeren Bereich der Nägel ausgebreitet hat, kann eine Kombinationstherapie mit oralen Antimykotika notwendig werden, auch um eine drohende systemische Mykose (innerer Organbefall durch Pilze) zu verhindern.

Die aktuelle Forschung legt ihren Fokus stark auf die Formulierungsentwicklung. Neben der Natur des Filmbildners und der Lösungsmittel, ist auch die Verwendung von *penetration enhancern* eine wichtige Optimierungsmöglichkeit.^[69] Dabei werden verschiedene Substanzen eingesetzt wie Harnstoff, Dimethylsulfoxid (DMSO), reduzierende Schwefelverbindungen oder Cyclodextrine.^[69-71] Aus pharmazeutischer/medizinischer Sicht besteht ein großer Innovationsbedarf nicht nur an den eingesetzten Formulierungen, sondern vor allem auch an den Wirkstoffen oder sogar den Therapieformen selbst, um die Therapiedauer herabzusetzen, die Heilungschancen zu erhöhen und den Patienten die Anwendung zu erleichtern.

1.5. Photodynamische Therapie

Neue potente Substanzen scheitern häufig an ihren unzureichenden pharmakokinetischen Eigenschaften und führen vor allem während der Metabolisierung zu . Ein vielversprechendes Gebiet der Arzneistoffentwicklung beschäftigt sich mit dem Konzept der photodynamischen Therapie (PDT, *photodynamic therapy*), um dieses Problem zu umgehen. Kernpunkt dieser Methodik ist das Bestrahlen eines Wirkstoffes, auch *photosensitizer* (PS) genannt, mit Licht einer bestimmten

Wellenlänge, um ihn photochemisch durch Elektronenanregung zu aktivieren (siehe Abb. 1.4).^[72] In Verbindung mit molekularem Sauerstoff werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) gebildet, die in angrenzenden Gewebezellen (z.B. Tumorzellen) oder bei Erregern durch oxidativen Stress Beschädigungen bewirken. Zu diesen reaktiven Sauerstoffspezies gehören u.a. der Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), das Superoxid-Radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), das Hydroxylradikal (HO^\bullet) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), die auch als *messenger*-Moleküle in Signalübertragungen in Zellen fungieren.^[73,74] Werden ROS jedoch im Sinne der PDT in einem großen Überschuss gebildet, können die reduzierenden Abwehrmechanismen der Zelle diese nicht abbauen. Als Folge werden die Zellen zerstört (Nekrose) oder es wird die Apoptose eingeleitet.^[75]

In der nachfolgenden Abb. 1.4 ist der Prozess der Photoaktivierung schematisch dargestellt.

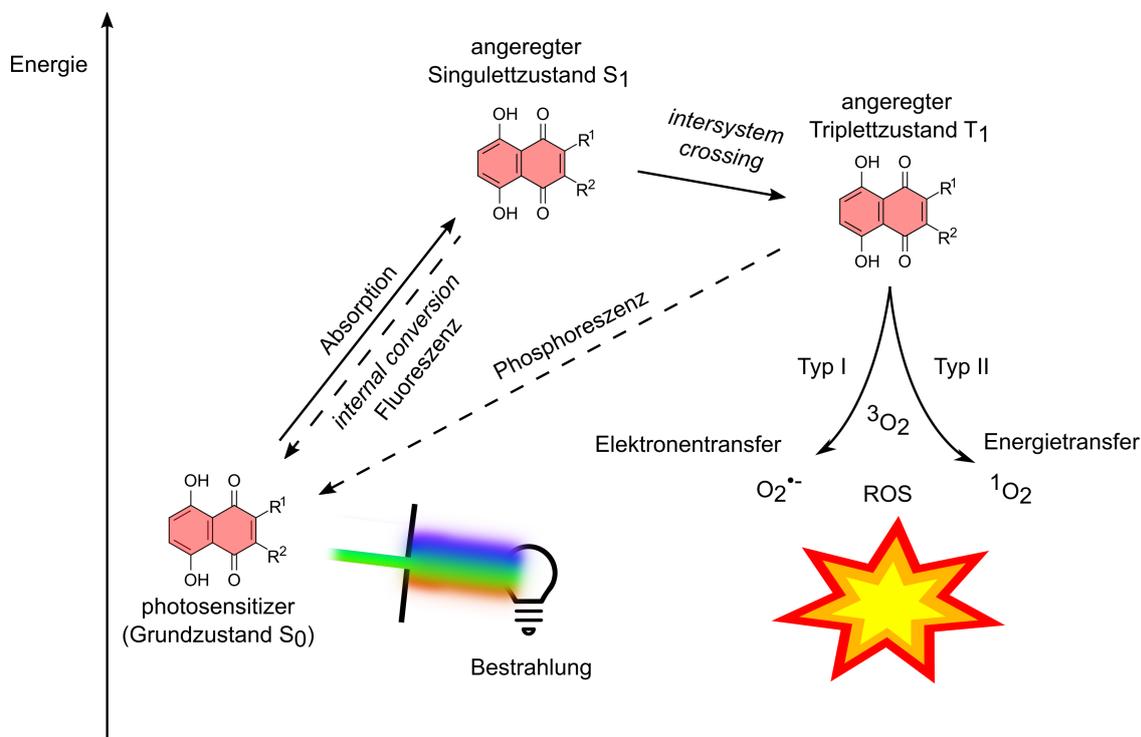


Abb. 1.4.: Abgebildet ist das vereinfachte JABLONSKI-Diagramm, das die elektronischen Übergänge nach Strahlungsanregung von einem *photosensitizer* (PS) veranschaulicht.^[76] Desweiteren sind die Photoreaktionen Typ I und Typ II eingezeichnet, die der PS mit molekularem Sauerstoff eingehen kann.^[77]

Bei der Bestrahlung des PS durch Licht einer geeigneten Wellenlänge wird dieser elektronisch vom S_0 (Grundzustand) in den S_1 -Zustand (angeregten Singulettzustand) angeregt. Durch die Mechanismen der *internal conversion* (IC) oder Fluoreszenz kann durch Energieabgabe erneut der Grundzustand erreicht werden. Entscheidend für photodynamische Applikationen ist jedoch, die Möglichkeit durch *intersystem crossing* (ISC) den angeregten Triplettzustand (T_1) zu erreichen. Trifft das Molekül in diesem angeregten Zustand auf ein Sauerstoffmolekül, kann durch Elektronentransfer (Photoreaktion Typ I) beispielsweise ein Superoxid-Radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) oder durch Energietransfer (Photoreaktion Typ II) Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gebildet werden.^[77]

Was auf den ersten Blick als radikale und ungerichtete Therapie anmuten mag, ist bei näherer Betrachtung durch die steuerbare Bestrahlung eine sehr spezifische Methode der Behandlung. Das Hauptanwendungsgebiet der PDT ist der Bereich der Onkologie. Die oberflächlichen Karzinome können meist ohne weiteres auf diese Art behandelt werden. Die Kombination von PDT mit einem chirurgischem Eingriff eröffnet die Möglichkeit auch im Körper liegende Tumore gezielt behandeln zu können.^[78,79]

Um PS durch das menschliche Gewebe aktivieren zu können, muss die eingesetzte Strahlung bis zum Wirkstoff gelangen. Je nachdem wo das Licht benötigt wird, muss es eine Strecke durch absorbierende Kompartimente zurücklegen. In der Haut und menschlichem Gewebe gibt es das sogenannte bio-optische Fenster, welches bei 600 - 900 nm liegt.^[80] In diesem Wellenlängenbereich absorbieren die Chromophore des menschlichen Gewebes nicht oder nur schwach, sodass entsprechende PS eingesetzt werden können, die in diesem Bereich absorbieren. Neben UVA- und UVB-absorbierenden Proteinen und Nukleinsäuren befinden sich in der Haut und den Gefäßen noch weitere absorbierende Chromophore.^[81] Porphyrine und Hämoproteine absorbieren bereits im Bereich des blauen Lichts (ca. 400 nm) und schwächer im grünen (500 - 560 nm) und roten (620 - 650 nm) Bereich des Spektrums. Hinzu kommen noch Flavine, Karotinoide und Bilirubin, die alle im blauen bis grünen Bereich (< 500 nm) absorbieren. Melanin, ein dunkles Pigment der Haut, absorbiert über einen großen Wellenlängenbereich von etwa 300 - 800 nm, jedoch mit abnehmender Intensität bei steigender Wellenlänge.^[82]

Vergleicht man die Struktur und den Aufbau des Nagels mit den aufgelisteten absorbierenden Chromophoren wird deutlich, dass bis auf die Proteine und die Nukleinsäuren keine der anderen Substanzen in großem Maße vorkommen. So erklärt sich das Transmissionsspektrum des Nagels von PARKER *et al.* (siehe Abb. 1.2).^[44] Die einzigen bedeutsamen Absorptionen finden im UV-Bereich statt. Der sichtbare Bereich unterliegt lediglich den natürlichen Streuprozessen des Lichts (Rayleigh-Streuung).^[83] Daher ist die Verwendung von Licht im Sinne einer photodynamischen Therapie mit Wellenlängen ab 500 nm und höher realistisch. Das stellt einen essentiellen Punkt in der Suche nach einem geeigneten *photosensitizer* für die Therapie der Onychomykose dar.

Die Strukturen der photoaktivierbaren Substanzen (PS) können in der Anwendung im Sinne der PDT vielseitiger Natur sein. Ihre Formen und Funktionen variieren dabei von kleinen Molekülen bis hin zu Verbindungen mit über 500 u Größe. In Abb. 1.5 sind ausgewählte Verbindungen unterschiedlichster Verbindungsklassen zu sehen.^[84,85]

Auch zur Behandlung der Onychomykose wurde die PDT bereits eingesetzt. Allerdings wurde mit bereits therapeutisch bekannten PS gearbeitet, sodass diese nicht optimal auf das Keratin des Nagels abgestimmt waren. Der Fokus lag sowohl auf großen Molekülen (großes π -Elektronensystem, hohe Anregungswellenlänge) wie Hematoporphyrine ähnlich der Verbindung **4**, als auch auf kleineren Verbindungen wie Methylenblau (**1**) oder die *prodrugs* 5-ALA (**2**) und MAL (Metvix[®]), einem Derivat von **2** und **3**.^[84,86-90] In ersten Studien wurden die Wirksamkeiten gegen die Erreger mit Bestrahlung nachgewiesen. Dieser Ansatz hat jedoch für die Therapie der Onychomykose noch keinen Durchbruch erlangt.

An diesem Punkt knüpft die vorliegende Arbeit an. Viele der PS kommen natürlicherweise in der Tier- und Pflanzenwelt vor und verbinden nötige Eigenschaften für den Einsatz am Nagel

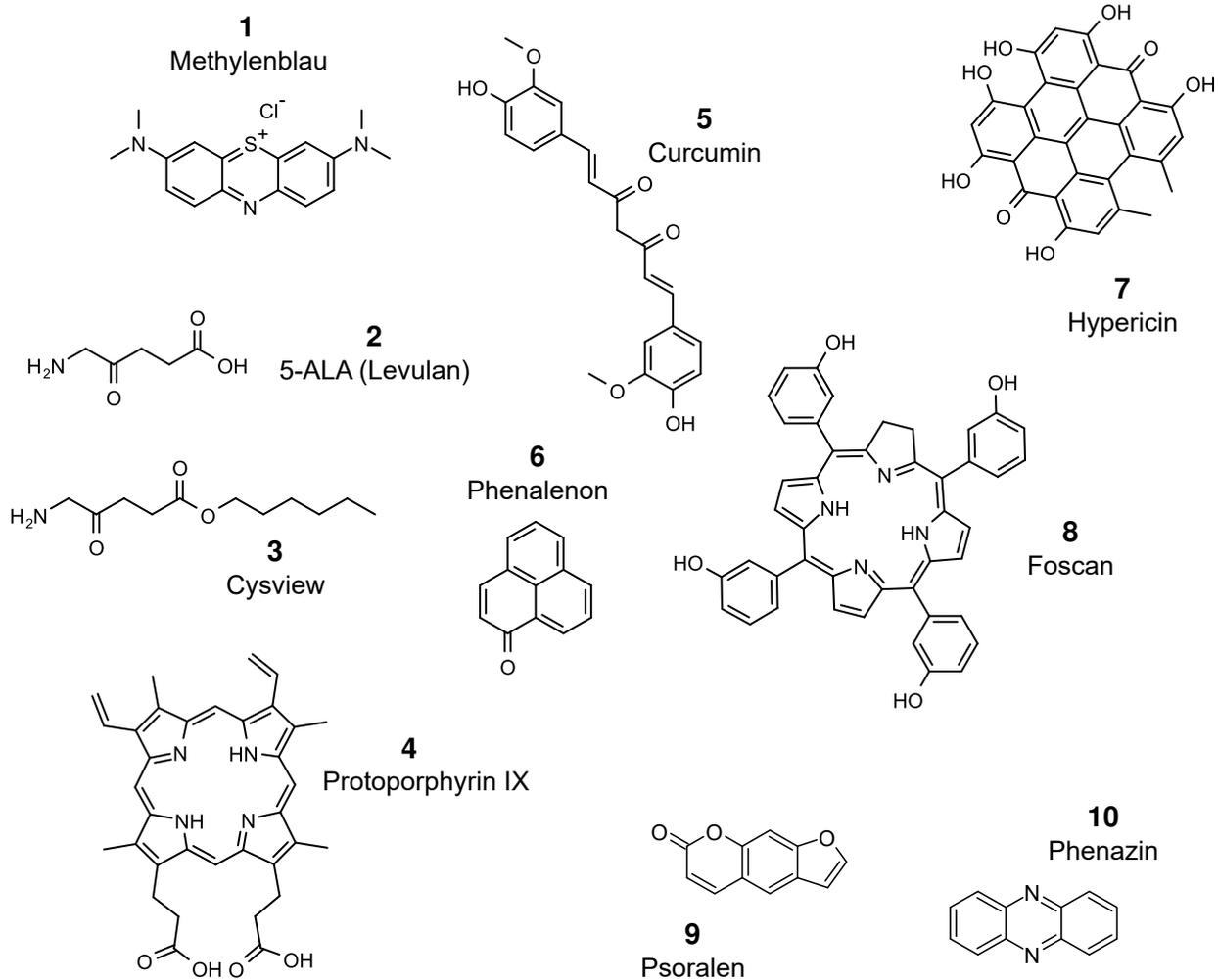


Abb. 1.5.: Abgebildet ist eine Auswahl an möglichen *photosensitizern* (PS) für die photodynamische Therapie.^[84,85]

und der potenziellen photoaktivierten Wirksamkeit gegen die Haupterreger der Onychomykose. Eine Verbindungsklasse beruht auf dem Gerüst des Phenazins (10). Die Phenazine werden von Bakterien verschiedener Spezies gebildet (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces anulatus/antibioticus*, *Enterobacter agglomerans* und weiteren) und dienen vermutlich als natürliche Antibiotika.^[91,92] Die Phenazine sind auch als eine Farbstoffklasse bekannt und einige Derivate zeigen Eigenschaften eines PS.^[93]

Psoralen (9), welches aus der PDT (PUVA-Therapie) im Zusammenhang mit der Psoriasis bekannt ist, ist ebenfalls ein natürlich vorkommendes Molekül.^[94]

Eine Naturstoffklasse, der bisher wenig Beachtung geschenkt wurde, aber als photoaktivierbar beschrieben wird, sind die Chinone.^[95] Das unsubstituierte Grundgerüst, 1,4-Naphthochinon (11) und eines der als photochemisch beschriebenen Derivate, das Naphthazarin (12), sind in Abb. 1.6 zu sehen.

Durch ihre Eigenschaft in Redox-Prozessen im Stoffwechsel von lebenden Organismen zu Semichinonen und Hydrochinonen reduziert zu werden, ergibt sich ihre Funktion und Toxizität.^[96–98] Dieser Vorgang verläuft enzymatisch oder nicht-enzymatisch und wiederholt sich nach Autoxidation

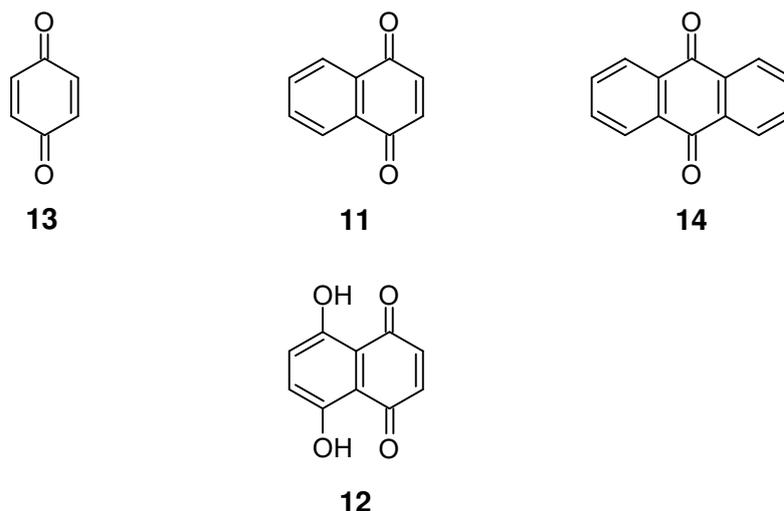


Abb. 1.6.: Dargestellt sind die strukturverwandten Verbindungen von Benzochinon (**13**), Naphthochinon **11**, Anthrachinon und Naphthazarin (**12**).

des Semichinon bzw. Hydrochinon durch molekularen Sauerstoff zum Chinon im sogenannten *redox-cycling*.^[99] Der Sauerstoff wird dabei durch Reduktion in Superoxid-Radikale ($O_2^{\bullet-}$) überführt und übt oxidativen Stress auf die umliegenden Zellbestandteile aus. Auch durch direkte Alkylierung von DNA und Proteinen kommt eine Toxizität der Chinonderivate zustande, da in der chinoiden Struktur des Moleküls (α,β -ungesättigtes Keton) in 2- und 3-Position MICHAEL-Additionen stattfinden können.^[100]

Bekannt ist die Klasse der Naphthochinone jeher als farbige Moleküle. Unter dem Namen „Henna-Farbstoff“ (HNQ, Lawson, 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon) findet sich das berühmteste Beispiel mit einer Substanz, die bereits seit hunderten von Jahren für die nachhaltige Färbung der Haut oder Haaren bekannt ist. Die durch Henna hervorgerufenen Farbeffekte an Haut oder Haaren sind einige Monate von Bestand. Obwohl eine Affinität des Henna-Farbstoffs für das Keratin vorliegt, ist das HNQ selbst in Keratin allerdings nicht ausreichend photodynamisch und antimykotisch wirksam.^[101] Durch zahlreiche Derivate ergibt sich die Möglichkeit unterschiedlicher Wirkungen und macht die Substanzklasse aus diesem Grund attraktiv für weitere Untersuchungen.

Kapitel 2.

Zielsetzung

Stand heute stehen nur wenige Wirkstoffe insbesondere für die verträglichere, topische Therapie der Onychomykose zur Verfügung. Der Behandlungserfolg ist auf Grund der Keratinstruktur des Nagels und der aufwändigen Handhabung der Arzneiformulierung über einen langen Zeitraum mäßig. Rezidive sind daher keine Seltenheit und betrifft einen Großteil der Patienten. Erste Studien mit der photodynamischen Therapie zeigten eine moderne und für alle Patientengruppen zugängliche Methode, um die Behandlung der Onychomykose zu verbessern.

Ziel dieser Arbeit war es, die nachhaltige Etablierung der photodynamischen Therapie zur effektiven Behandlung der Onychomykose mit einem optimierten Wirkstoff zu erarbeiten. Daraus ergab sich die Aufgabenstellung, eine geeignete Substanzklasse für einen potenziellen photoaktivierbaren Arzneistoff mithilfe eines Wirksamkeitsscreenings zu finden, zu charakterisieren und zu optimieren. Durch den bekannten FRANZ-Zellen-Diffusionstest sollte eine Affinität zu Keratin (Keratinophilie), dem Kernpunkt der topischen Behandlung, untersucht werden. Ebenso sollte die gezielte Photoaktivierbarkeit wirksamer Substanzen für weitere Schritte nachgewiesen werden. Sowohl für die Untersuchung und Optimierung der Struktur-Wirkungs-Beziehung als auch für die Optimierung der Keratinophilie und der Wirksamkeit gegen die Hauptpathogene sollten im Rahmen dieser Arbeit mit chemischen Synthesereaktionen Derivate der ermittelten Substanzklasse hergestellt werden.

Durch *in vitro* Untersuchungen sollte die gezielte Photoaktivierbarkeit und Wirksamkeit generierter Derivate verglichen werden mit dem Ziel, eine potente Leitstruktur für einen potenziellen Arzneistoff zu erhalten.

Nach finden einer Hitsubstanz oder Substanzklasse, die alle Eigenschaften eines topischen photoaktivierbaren Antimykotikums erfüllt, sollte anhand eines infizierten Nagelmodells die Wirkung im keratinen Medium des Nagels abgebildet werden, um die mögliche Anwendung *in vivo* zu bestätigen.

Kapitel 3.

Ermitteln der neuen Wirkstoffklasse

3.1. Kriterien

Um einen geeigneten Wirkstoff für die Photodynamische Therapie gegen die Onychomykose zu finden, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden. Diese ergeben sich aus der Art der Therapie und des Mediums, in dem diese angewendet wird. Wie eingangs erläutert, besitzt Keratin eine kompakte Struktur, die physikalisch und chemisch nicht einfach überwunden werden kann. Zudem kommen die photochemischen Voraussetzungen an den Wirkstoff und seine Wirkung an den Pathogenen der Erkrankung (siehe Kap. 1) hinzu. Daher sind die Ansprüche an eine neue effektive Wirkstoffklasse vielfältig und mussten in entsprechenden Untersuchungen als Maßstäbe angesetzt werden. In den folgenden Punkten lassen sich diese Anforderungen zusammenfassen:

1. Keratinophilie

Der wichtigste Punkt in der topischen Anwendung am Nagel ist die sogenannte Keratinophilie eines Wirkstoffs. Zusammengesetzt aus den Worten Keratin (gr., "Horn") und -philie (altgr., "Freund", "Freundschaft"), beschreibt sie die Affinität einer Substanz zu Keratin und mit diesem zu interagieren, sowie durch dieses zu diffundieren (vgl. Lipophilie^[102]). Aktuell erhältliche Antimykotika, ob systemisch oder topisch eingesetzt, sind mit dem Ziel einer hohen Potenz gegen die Pathogene der Onychomykose entwickelt und optimiert worden. Dem gegenüber steht jedoch ein Defizit in der Optimierung der Wirkstoffpermeation durch das Nagelkeratin (siehe Abschnitt 1.2). Die meisten der heute topisch eingesetzten Substanzen sind Wirkstoffe aus der systemischen Therapie, die mit Hilfe optimierter Formulierungen in den Nagel eindringen sollen. Viele Studien zeigten, dass dies bisher oft zu mangelhaftem Behandlungserfolg mit entsprechenden Rezidiven führte.^[68]

2. Photoaktivierbarkeit

Mit dem Ziel, den Wirkstoff im Rahmen einer Photodynamischen Therapie einzusetzen, ist die Photoaktivierbarkeit der Verbindung mit einer das Keratin durchdringenden Wellenlänge **der** Kernpunkt. Wie bereits in Abschnitt 1.5 beschrieben, ist vor allem der Übergang in den angeregten Triplet-Zustand, bzw. die Quantenausbeute entscheidend dafür, in welchem Maße ROS gebildet werden. Treten auf Grund der Molekülbeschaffenheit zu viele Nebenreaktionen

auf (siehe Abschnitt 1.5, Abb. 1.4), wird die Effektivität für eine biologische Anwendung herabgesetzt. An die für diesen Vorgang benötigte Anregungswellenlänge wird ebenfalls eine Voraussetzung gestellt: die Wellenlänge darf nicht zu energiereich sein.

Kurzwellige energiereiche Strahlung mit Wellenlängen von < 500 nm wird von der proteino-genen Struktur des Nagels absorbiert (siehe Abschnitt 1.2, Abb. 1.2) und gelangt nicht durch die Struktur.^[44] Um eine Absorption von Licht mit Wellenlängen von > 500 nm zu erreichen, wird in der Regel ein ausgedehntes π -Elektronensystem im Molekül benötigt, was häufig nur größere Moleküle aufweisen (siehe Abschnitt 1.5). Wie MERTIN und LIPPOLD belegten, führen steigende Molekulargewichte zu einem sinkenden Diffusionskoeffizienten durch den Nagel, bzw. das Keratin.^[52] So kann die erhöhte Wellenlänge oft nur durch eine schlechtere Keratinophilie "erkaufte" werden.

3. Verfügbarkeit

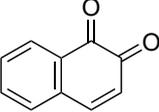
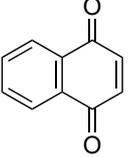
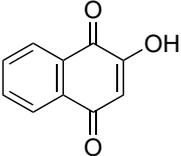
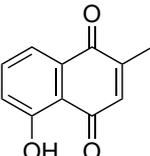
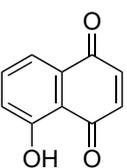
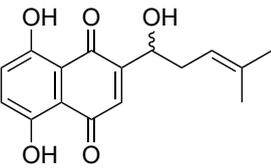
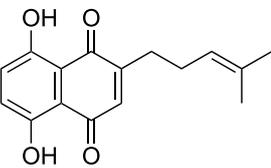
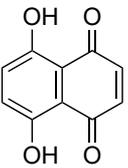
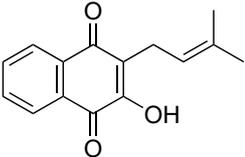
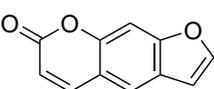
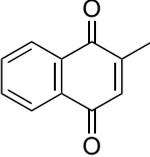
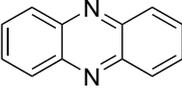
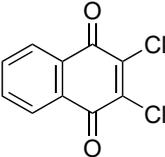
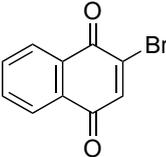
Neben den beiden Hauptkriterien darf die natürliche oder synthetische Verfügbarkeit nicht außer Acht gelassen werden. Ist die neue Wirkstoffklasse synthetisch schwer zugänglich oder sind die natürlichen Ressourcen nicht vorhanden, kann eine Anwendung im großen Maßstab nicht erfolgen. Eine neue, wenn auch wirksamere Therapie, darf ein Kostenmaximum nicht überschreiten, um einer breiten Masse zur Verfügung zu stehen.

Um diesen Kriterien folgend eine neue Wirkstoffklasse zu ermitteln, wurden zunächst vielversprechende Kandidaten in Voruntersuchungen betrachtet. Die im Rahmen dieser Arbeit favorisierten Verbindungen, die Naphthochinone, wurden durch die literaturbekannten und kommerziell erhältlichen Naturstoffe Lawson, Plumbagin, Juglon, Lapachol, Shikonin/Alkannin sowie Deoxyshikonin vertreten.^[96,103–109] Daneben wurden andere Substanzen, denen eine fungizide Wirkung gegen die beiden Hauptpathogene zugeschrieben wird, untersucht (für eine vollständige Liste siehe Tab. 3.1 im nächsten Abschnitt). Auch diese Substanzen wurden nach photochemischen Eigenschaften ausgewählt.^[94]

3.2. Bestimmung der Aktivierungswellenlänge

Die Höhe der Anregungswellenlänge (Punkt 2, im vorherigen Abschnitt) wurde zu Beginn betrachtet, da hier auf effektive Weise ungeeignete Substanzen für die Anwendung im Keratin ausgeschlossen wurden. In UV/Vis-Messungen wurden die Absorptionsspektren einer Reihe potenziell photoaktivierbarer Verbindungsklassen ermittelt (siehe Tab. 3.1). Für die UV/Vis-Spektroskopie wurden die Substanzen in DMSO gelöst und vermessen (siehe Kap. 9).

Tab. 3.1.: Absorptionsmaxima λ_{ex} der untersuchten Substanzen und Substanzklassen gemessen in DMSO. Die Werte sind in nm angegeben.

#	Struktur	λ_{ex}	#	Struktur	λ_{ex}
	1,2-Naphthochinon			1,4-Naphthochinon	
15		398	11		336
	Lawson			Plumbagin	
16		332	17		414
	Juglon			Shikonin	
18		410	19		516
	Deoxyshikonin			Naphthazarin	
20		516	12		512
	Lapachol			Psoralen	
21		392	9		332
	Menadion			Phenazin	
22		334	10		366
	2,3-Dichloro-1,4-NQ			2-Bromo-1,4-NQ	
23		340	24		340

Zwar verschieben sich die Absorptionswellenlängen der Substanzen in Abhängigkeit des eingesetzten Lösungsmittels um einen gewissen Wert (Beispiel Naphthazarin (**12**), siehe Tab. 3.2), jedoch kann ein erster Eindruck anhand der Daten gewonnen werden. Im Übrigen findet eine spätere Anwendung ebenfalls meist in verschiedenen Lösungsmitteln und nicht mit der reinen Substanz statt. Die Messergebnisse zeigten, dass der Großteil der Verbindungen nur bis zu einer Wellenlänge von unter 400 nm absorbiert. Lediglich Naphthochinone mit einer oder mehreren Hydroxygruppen am aromatischen Ring wiesen höhere Absorptionswellenlängen auf.

Tab. 3.2.: Die Absorptionsmaxima λ_{ex} des Naphthazarinringgerüsts **12** in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Werte sind in nm angegeben.

Lösungsmittel	λ_{ex} [nm]	Referenz
Acetonitril	515	PALIT <i>et al.</i> ^[110]
Benzen	517	PALIT <i>et al.</i> ^[110]
CCl ₄	530	TORIBARA <i>et al.</i> ^[111]
Cyclohexan	523	PALIT <i>et al.</i> ^[110]
EtOH	512	PALIT <i>et al.</i> ^[110]
EtOH/H ₂ O (1:1)	505	IDRISS <i>et al.</i> ^[112]
MeOH	520	SPRUIT <i>et al.</i> ^[113]
2-Methyltetrahydrofuran	513	PALIT <i>et al.</i> ^[110]
H ₂ O/iPrOH/Aceton (30.2:5:1)	520	RATH <i>et al.</i> ^[114]
DMF	562 & 604	eigene Messung
DMSO	512	eigene Messung

Das Naphthochinon in seiner Grundstruktur (1,4-Naphthochinon (**11**)) wies in den durchgeführten UV/Vis-Messungen eine maximale Anregungswellenlänge von 336 nm (DMSO) auf und liegt damit beim von SINGH *et al.* ermittelten Wert von 335 nm (CHCl₃).^[115] Diese geringe Absorptionswellenlänge wird bereits durch eine einzelne Substitution einer Hydroxylgruppe in *peri*-Stellung zu einer Chinongruppe stark bathochrom verschoben (336 → 410 nm, vgl. Juglon (**18**)). Nach Einführen einer weiteren Hydroxylgruppe in *para*-Position zur ersten, liegt die Anregungswellenlänge bereits bei 512 nm (vgl. Naphthazarin (**12**)) und damit im Wellenlängenbereich von grünem Licht, mit dem der menschliche Nagel gut durchdrungen werden kann (siehe Abschnitt 1.2). In Abb. 3.1 sind diese Zusammenhänge, die in den UV/Vis-Messungen bestätigt wurden, in einem Schaubild zusammengefasst.

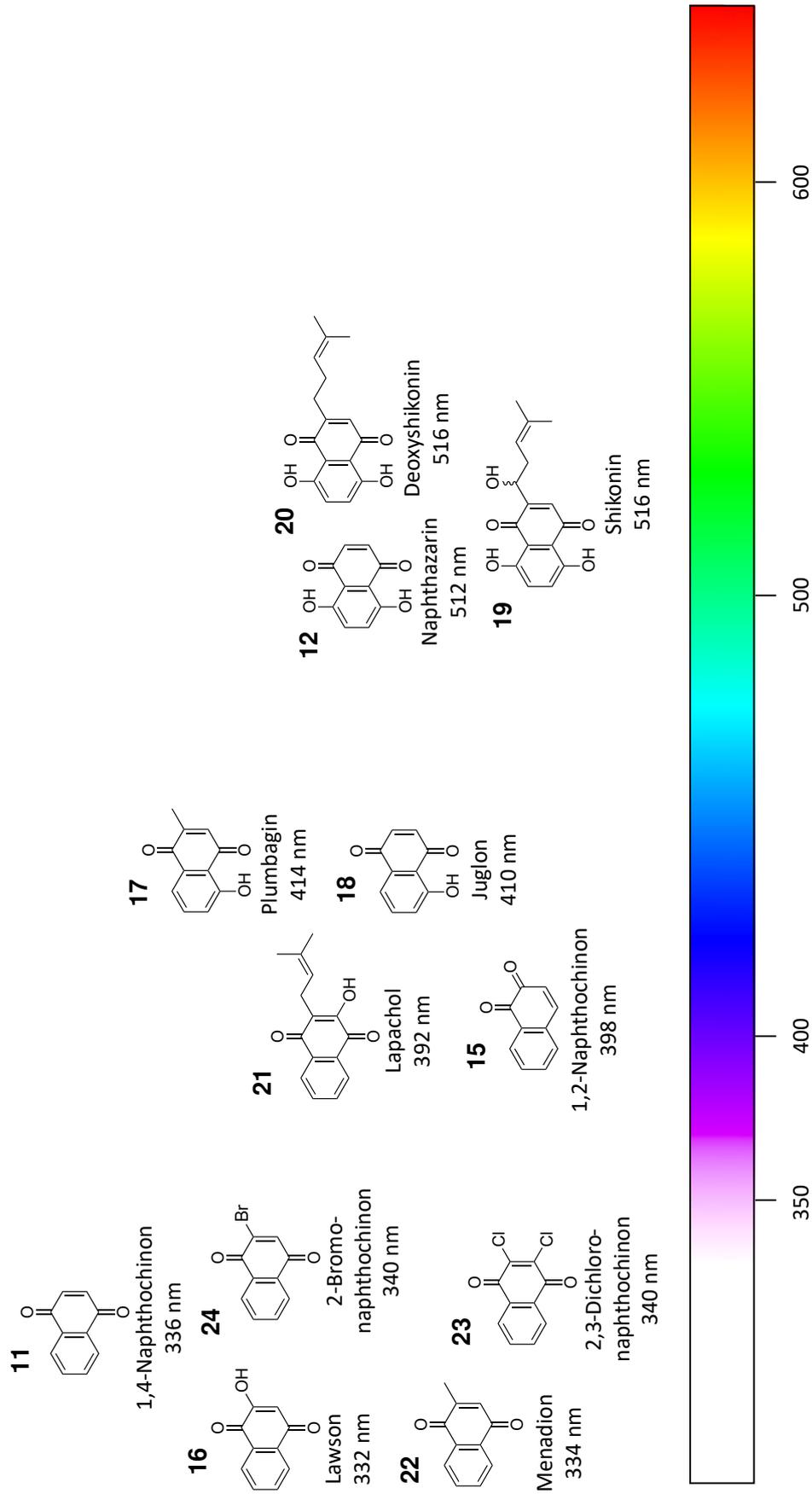


Abb. 3.1.: Im Rahmen der Voruntersuchung wurden verschiedene potenzielle Wirkstoffklassen in UV/Vis-Messungen untersucht. Die Messungen fanden in DMSO statt und unterhalb der Wellenlängenangabe ist die entsprechende Farbe des absorbierten Lichtes aufgeführt. Angelehnt an eine Graphik von SIEWERT *et al.*^[116]

Zu erklären ist dieser stark bathochrome Effekt in Richtung des bio-optischen Fensters durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen und den chinoiden Ketogruppen im Sinne eines 6-Rings.^[117,118] Dadurch kommt ein schneller intramolekularer Protonentransfer zustande.^[119–122] Obwohl die Molekülstruktur durch ihre übersichtliche Konstitution unkompliziert erscheinen mag, ist sie in Wahrheit nicht einfach festzulegen. In Abb. 3.2 sind die möglichen Tautomere des Naphthazarins (**12**) abgebildet.

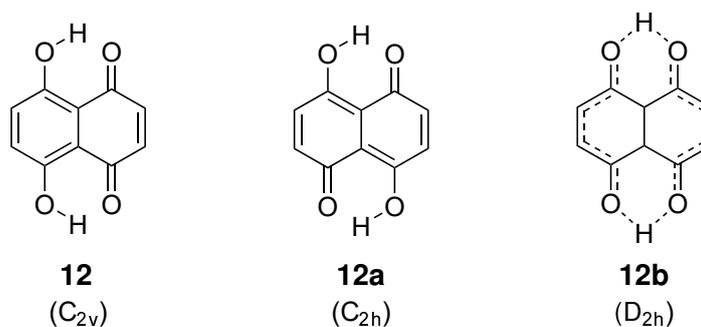


Abb. 3.2.: Die Tautomere von Naphthazarin **12c** (C_{2v}) und **12b** (D_{2h}) besitzen ihre Ketogruppen in 1,4-Position. **12a** (C_{2h}) hingegen besitzt diese in 1,5-Position. Es wird allgemein angenommen, dass **12c** in Lösung am wahrscheinlichsten vorliegt.^[121,123]

Dass es sich um eine schnelle Tautomerisierung, also einen schnellen Protonenaustausch handelt, wurde von CURTIN und PAUL durch Messungen von lediglich einem H-Signal im NMR begründet.^[124] Theoretische Berechnungen und IR-Messungen zeigten, dass es sich bei diesem schnellen Protonenaustausch um einen Tunnelmechanismus handeln könnte.^[119] Welches Tautomer das stabilste in gelöstem und welches in festem Aggregatzustand darstellt, ist seit langem Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen.^[121,125] So wurden zahlreiche NMR-Studien^[119,123,124,126], Röntgenstrukturanalysen^[123,127,128] sowie IR- und Raman-Untersuchungen^[119,121,129,130] durchgeführt. Immer häufiger werden in aktuellen Arbeiten auch theoretische Modelle für diese Untersuchung herangezogen, um die Mechanismen hinter der Struktur des Naphthazarins (**12**) zu ergründen.^[118,129,131,132] Der allgemeine Konsens ist, dass **12** in Lösung unter Normalbedingungen als 1,4-Diketonstruktur **12c** vorliegt und eine C_{2v} -Symmetrie aufweist. Als Kristallstruktur kann es die drei verschiedenen Polymorphe A, B und C ausbilden.^[121] Hier wird angenommen, dass entweder eine C_{2v} - oder eine D_{2h} -Symmetrie vorherrscht.

Liegen in der Struktur des Naphthazarins Substituenten vor, kann dies zu einem Bruch der Symmetrie führen. DE LA VEGA *et al.* untersuchten deshalb verschiedene Naphthazarinderivate mittels NMR-Messungen. Für 2,6- bzw. 2,7-Naphthazarin wurde dabei ein ähnliches Verhalten zum Naphthazarinringgrundgerüst (**12**) beobachtet, was bedeutet, dass nur ein Signal für die Ringprotonen sichtbar war und eine Symmetrie vorlag. Für das monosubstituierte 2-Methylnaphthazarin wurden sowohl für die aromatischen als auch für die chinoiden Protonen die zu erwartenden Signale beobachtet. 7-Methylnaphthazarin wurde hingegen nicht im NMR gefunden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass das 2-substituierte Naphthochinon das energetisch stabilere ist. Wird nun versucht, dieses komplexe Elektronensystem durch weitere Substituenten für eine Erhöhung der maximalen Absorptionswellenlänge zu beeinflussen, so kann dies nicht über die

Positionen 5 und 8 erfolgen. Betrachtet man beispielsweise das 5-Monomethoxyderivat, wird durch den elektronenschiebenden Effekt der Methoxygruppe zwar ebenfalls eine erhöhte maximale Absorptionswellenlänge von 482 nm (MeOH) bzw. 485 nm (CH₂Cl₂) erreicht^[133,134], jedoch liegt sie damit unter der der Stammverbindung **12** (520 nm, MeOH^[113]). 5,8-Dimethoxynaphthazarin liegt mit 448 nm (MeOH^[115,133]) bzw. 445 nm (CHCl₃^[115]) dementsprechend noch weiter hypsochromverschoben vor als das 5-Methoxy-8-hydroxynaphthazarin. Auf Grundlage dieser photochemischen Eigenschaften wurden im Nachfolgenden ausschließlich Naphthochinone untersucht und synthetisiert, die an Positionen 5 und 8 jeweils eine Hydroxylsubstitution aufwiesen.

Das Verhalten des Naphthazarins bezüglich verschiedener Substitutionsmuster wurde ausführlich in einem groß angelegten Vergleich von SINGH *et al.* untersucht. Dabei konnten die Autoren auch die Absorptionen den jeweiligen Ringsystemen zuschreiben.

So kann eine Veränderung am chinoiden Teil (2/3-Position) des Naphthazarinkerns einen Einfluss auf die Absorptionswellenlänge haben, abhängig vom eingesetzten Rest und wie dieser räumlich angeordnet bzw. ausgedehnt ist. Handelt es sich beispielsweise um eine Hydroxyl- oder eine Methoxygruppe, so können die Orbitale am π -Elektronensystem des Chinons teilnehmen.^[115] Es findet eine Rotverschiebung der Absorptionswellenlänge statt. Auf den ersten Blick sorgt die gemessene maximale Absorptionswellenlänge für das in 2-Position substituierte Derivat jedoch für Verwirrung (2,5,8-Trihydroxy-1,4-naphthochinon, auch Naphthopurpurin (**25**): 474 nm (EtOH)^[135,136]), da sie niedriger scheint, als die des Grundgerüsts (vgl. Naphthazarin, Abschnitt 3.2). Da es sich bei dieser Zahl nur um das Absorptionsmaximum handelt und nicht die Umgebung darum beschrieben wird, scheinen die Aussagen von SINGH *et al.*^[115] und BURNS *et al.*^[135,136] gegenteilig. Betrachtet man jedoch das vollständige Spektrum des Naphthopurpurin (**25**, siehe Abschnitt A.6) ist zu erkennen, dass es sich um eine schwächere, aber breitere Absorptionsbande handelt, die wie andere Verbindungen mit Naphthazarinkern in Bereichen von über 500 nm absorbiert. Die zweifache Hydroxylierung am chinoiden Ring führt zu einer leichten Erhöhung der maximalen Absorptionswellenlänge von bis zu 525 nm (CHCl₃) wie im Falle des 2,3,5,8-Tetrahydroxy-1,4-naphthochinons (Spinazarin (**26**)) gezeigt.^[137] Wahrscheinlich führen hierbei sterische Hinderungen dazu, dass die p-Orbitale nicht mehr gänzlich überlappen können und daher ihren vollen elektronenschiebenden Effekt nicht in den Moleküllern einbringen können.^[115] Wird eine Alkylkette oder eine Acetylgruppe an diese Positionen substituiert, wird ein noch geringerer Einfluss auf die Absorption beobachtet. Begründet wird dies mit fehlenden bzw. falsch ausgerichteten p-Orbitalen der Substituentengruppen. Daher können diese Positionen vielfältig mit Alkylgruppen variiert werden, wohingegen die Position 5 und 8 nicht ohne weiteres verändert werden dürfen, da ansonsten die Absorptionswellenlänge stark sinkt. Die einzige Möglichkeit ist das Einführen einer Aminogruppe anstelle eines 5- oder 8-Hydroxyls. Hier steigt die Anregungswellenlänge auf bis über 600 nm (siehe Abschnitt 4.3.3). Substitutionen mit Hydroxylgruppen an den aromatischen Positionen 6 und 7 führen trotz elektronenschiebender Eigenschaften zu keinen weiteren Wellenlängenverschiebungen in höhere Bereiche. In der Literatur finden sich jedoch wenig Berichte oder Synthesevorschriften zu ausschließlich am Aromatenring hydroxylierten Verbindungen.

An Hand der Naturstoffklassen der Spinochrome und Echinochrome wird deutlich was geschieht, wenn eine Perhydroxylierung am Molekül vorherrscht, denn die Absorptionsmaxima werden nicht

weiter gesteigert. So besitzt das 2,3,5,6,7,8-Hexahydroxy-1,4-naphthochinon (Spinochrom E (27), natürlich vorkommend in der Schale des Seeigel) eine Absorption von maximal 477 nm (EtOH) und liegt damit ebenfalls unter dem des Naphthazarinringgerüsts.^[138] Wie leicht vorzustellen ist, gibt es neben diesen wenigen Beispielen eine Vielzahl weiterer Derivate, doch auch diese Naturstoffe gelangen nicht zu höheren Absorptionswellenlängen. Sie erhalten lediglich einen schwach hydrophileren Charakter und ein höheres Molekulargewicht.^[139] Für die sich anschließenden Untersuchungen wurden aus den genannten Gründen verstärkt die Derivate des Naphthazarins (12) als vorübergehende Hitstruktur deklariert, die in den Positionen 2 und 3 verändert waren. Durch den schwächeren Einfluss auf die Absorptionswellenlänge eignen sich die Substitutionen am chinoiden Ring in den Positionen 2 und 3, um vor allem die physiko-chemischen Eigenschaften des Naphthazarins den Bedürfnissen der nachstehenden Anwendungen anzupassen.

3.3. Initiales Wirksamkeitsscreening an *C. albicans* und *T. rubrum*

Die an Hand der literaturbekannten Eigenschaften als photoaktivierbare Substanzen ausgewählten Verbindungen (siehe Tab. 3.1) wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre biologische Wirksamkeit untersucht. Neben der Keratinophilie ist diese der entscheidende Faktor in der topischen Therapie gegen die Onychomykose. Um die Naphthochinone zunächst in einen Kontext mit anderen Substanzklassen setzen zu können, wurden in einem initialen Wirksamkeitsscreening auch alle zuvor UV/Vis-vermessenen Verbindungen verwendet.

Getestet wurde gegen die Human-Pathogene *C. albicans* (Ca) und *T. rubrum* (Tru) auf Basis eines Resazurin-Zellviabilitätsassay (siehe Kap. 9.3.1 und 9.3.1). Dieses Standardverfahren beruht darauf, dass lebende Zellen, in diesem Fall *T. rubrum* und *C. albicans*, das Resazurinmolekül (28) verstoffwechseln. Dieser Vorgang ist kolorimetrisch auswertbar, da das blaue, schwach fluoreszierende Resazurin (28) zum stark fluoreszierenden Resorufin (29) reduziert wird.^[140] Die Auswertung erfolgt dann über eine Fluoreszenzmessung der Emissionswellenlänge von 590 nm (Anregungswellenlänge 560 nm).

Durchgeführt wurden diese Untersuchungen¹ von ARLETTE WENZEL-STORJOHANN der Arbeitsgruppe von DENIZ TASDEMIR (FE Marine Naturstoffchemie, GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel). Als Wirkstoffkonzentrationen im initialen *screening* wurden 100 μM und 10 μM eingesetzt. In der nachfolgenden Tab. 3.3 sind die Ergebnisse dargestellt.

Zu erwähnen ist, dass die Testung unter Standardlaborbedingungen (Raumtemperatur, Beleuchtung, etc.) durchgeführt wurde. Ein Ausschluss des Umgebungslichtes, um ausschließlich die Dunkelaktivität der potenziell photoaktivierbaren Substanzen zu zeigen, fand hierbei zunächst nicht statt.

Unter den in Tab. 3.3 gezeigten Verbindungen war Psoralen (9) neben Phenazin (10) die einzige nicht-chinoiden Substanz und erwies sich bis auf eine Inhibition von 21 % bei 100 μM gegen *T. rubrum* nahezu wirkungslos. Eine Erklärung liegt in der fehlenden UVA-Strahlung, die zu

¹Sowie alle weiteren biochemischen Arbeiten der IC₅₀-Bestimmungen. Die Bestrahlungen der ersten drei Testdurchführungen wurden von LINDA HEINTZE aus dem AK PEIFER durchgeführt. Die restlichen Bestrahlungsexperimente, sowie die Testungen an den infizierten Membranen (siehe Abschnitt 6.4) wurden vom Autor durchgeführt.

Tab. 3.3.: In einem initialen *screening* wurde die Wirksamkeit verschiedener Substanzen und Substanzklassen untersucht. Die angegebenen Werte sind die prozentuale Inhibition der Erreger *C. albicans* (Ca) und *T. rubrum* (Tru).

#	Substanz	Ca		Tru	
		100 μM	10 μM	100 μM	10 μM
11	1,4-Naphthochinon	97	27	97	-
15	1,2-Naphthochinon	58	-	69	-
22	Menadion	96	37	98	87
23	2,3-Dichloro-1,4-naphthochinon	99	95	100	97
24	2-Bromo-1,4-naphthochinon	89	79	92	95
16	Lawson	-	-	-	-
18	Juglon	98	97	94	97
17	Plumbagin	97	36	95	89
21	Lapachol	45	-	75	34
30	β -Lapachon	72	49	95	57
12	Naphthazarin	85	98	81	85
19	Shikonin	80	20	95	28
20	Deoxyshikonin	100	58	70	75
9	Psoralen	-	-	21	-
10	Phenazin	27	23	27	-
	Positivkontrolle		94 ^a		98 ^b
	Lösungsmittelkontrolle ^c	-	-	-	-

^a: Nystatin (10 μM), ^b: Clotrimazol (10 μM), ^c: Lösungsmittelkontrolle (0.2 % DMSO), - : < 20 % Inhibition.

einer Interkalationsreaktion von **9** in DNA führt.^[94] Auch das Phenazin (**10**) zeigte, obwohl es als redoxaktiv beschrieben wird, nur schwache Inhibitionswerte gegen beide Pathogene (Ca: 100 μM : 27 %, 10 μM : 23 %, Tru: 100 μM : 27, 10 μM : -).^[92]

Das Grundgerüst der Naphthochinone **11** wies eine hohe Potenz gegenüber *C. albicans* und *T. rubrum* auf und eine vollständige Inhibition der Pilzzellen wurde mit Konzentrationen zwischen 100 und 10 μM erreicht. 1,2-Naphthochinon (**15**) zeigte hingegen eine fast halb so hohe Wirkung. Gesteigert wird die für **11** gezeigte Inhibition bereits durch das 2-Methyl- (Menadion **22**, Ca: 100 μM : 96 %, Tru: 10 μM : 87 %) und das 2-Bromoderivat (**24**, Ca: 10 μM : 79 %, Tru: 10 μM : 95 %). Das 2,3-Dichloronaphthochinon (**23**), ein nicht mehr eingesetztes Breitband-Fungizid, zeigte an beiden Pathogenen mit einer Hemmung von 95 % (Ca) und 97 % (Tru) bei einer Konzentration vom 10 μM , die stärkste Wirkung unter den getesteten Substanzen.^[141]

Lawson (**16**), das 2-Hydroxynaphthochinon, und Lapachol (**21**), das 2-Hydroxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)naphthochinon zeigten hingegen keine bzw. nur eine schwache Inhibition von 42 % bei 100 μM gegen *C. albicans*. Eine stärkere Wirkung von **21** ist gegen den Dermatophyten zu beobachten (100 μM : 75 %, 10 μM : 34 %). Das veretherte Derivat von Lapachol, das β -Lapachon zeigte im Vergleich höhere Inhibitionswerte vor allem gegen *T. rubrum* (10 μM : 57 %).

Die in der Natur allelopathisch wirkenden Stoffe Juglon (**18**, Ca: 10 μM : 97 %, Tru: 10 μM :

97 %) und Plumbagin (**17**, Ca: 100 μM : 97 %, Tru: 10 μM : 89 %) zeigten die in der Literatur beschriebenen potenten antimykotischen Eigenschaften gegen die Pathogene.^[105–107,142] Beide Derivate besitzen eine Hydroxygruppe in 5-Position des Moleküls und unterscheiden sich nur durch eine Methylgruppe in 2-Position (**17**).

Die 5,8-Dihydroxynaphthochinone zeigten neben ihren Absorptionswellenlängen von über 500 nm in der UV/Vis-Messung auch hohe Inhibitionswerte an den Pathogenen *C. albicans* und *T. rubrum*. In ihrem Grundgerüst Naphthazarin (**12**, Ca: 10 μM : 98 %, Tru: 10 μM : 85 %) zeigte sich der wirkungsvollste Kandidat dieser Gruppe gegen beide Erreger und lag damit dicht bei 2,3-Dichloronaphthochinon (**23**, Ca: 10 μM : 95 %, Tru: 10 μM : 97 %).

Shikonin (**19**, Ca: 100 μM : 80 %, 10 μM : 20 %, Tru: 100 μM : 95 %, 10 μM : 28 %) und Deoxyshikonin (**20**, Ca: 100 μM : 100 %, 10 μM : 58 %, Tru: 100 μM : 70 %, 10 μM : 75 %) zeigten in den eingesetzten Konzentrationen bei 100 μM ebenfalls hohe Inhibitionen von *C. albicans* und *T. rubrum*, lagen aber bei 10 μM Konzentration unter den Werten von **12**. Ihr struktureller Unterschied zum Naphthazarin (**12**) liegt in der sterisch anspruchsvollen Alkylseitenkette. Untereinander unterscheiden sie sich jedoch nur um eine Hydroxygruppe in dieser Seitenkette und zeigen dennoch einen Unterschied von mehr als 50 % Hemmung bei 10 μM an beiden Pathogenen.

In diesem Wirksamkeitsscreening konnten hohe Inhibitionswerte der Naphthochinonderivate gegenüber den Erregern der Onychomykose *C. albicans* und *T. rubrum* gezeigt werden. Da dies unter normalen Laborbedingungen stattfand, wurde im Anschluss die Wirkung nach Photoaktivierbarkeit getestet. Dies geschah im Rahmen einer IC_{50} -Bestimmung kombiniert mit einer gezielten Bestrahlung auf Photoaktivierung der Substanzen. Die Ergebnisse aus der UV/Vis-Messung und dem Wirksamkeitsscreening zusammengefasst, zeigten sich die 5,8-Dihydroxynaphthazarine **12**, **19** und **20** auf Grund ihrer hohen Absorptionswellenlänge (> 500 nm) und ihrer hohen Potenz ohne Bestrahlung als geeignete Kandidaten.

3.4. IC_{50} -Bestimmung der Naphthazarinderivate **12**, **19** und **20** an *C. albicans*

Um zu untersuchen, ob die Wirkung der 5,8-Dihydroxynaphthochinone nach Aktivierung durch Bestrahlung im Sinne einer photodynamischen Therapie gesteigert wird, wurde mit Hilfe des gleichen Assaytyps wie im Wirksamkeitsscreening zuvor gezielte IC_{50} -Werte zunächst gegen *C. albicans* ermittelt. Die genaue Durchführung ist in Abschnitt 9.3 aufgeführt. Für diesen Versuch wurden von den Verbindungen jeweils zwei identische Verdünnungsreihen auf Mikrotiterplatten angesetzt. Nach Versetzen mit *C. albicans*-Kultur wurde eine dieser Platten mit Licht der entsprechenden Wellenlänge (519 nm Peakwellenlänge) für 10 min bestrahlt. Die andere Mikrotiterplatte wurde nicht bestrahlt und diente als Dunkelkontrolle. Während der Handhabung der Substanzen und Platten wurde das Laborlicht ausgeschaltet, um eine unbeabsichtigte Aktivierung zu vermeiden. Als einzige Lichtquelle diente eine Rotlicht-LED, die Licht außerhalb der Absorptionsbanden der untersuchten Verbindungen emittierte.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven sind in Abb. 3.3 gezeigt und die dazugehörigen IC_{50} -Werte in Tab. 3.4

zusammengefasst.

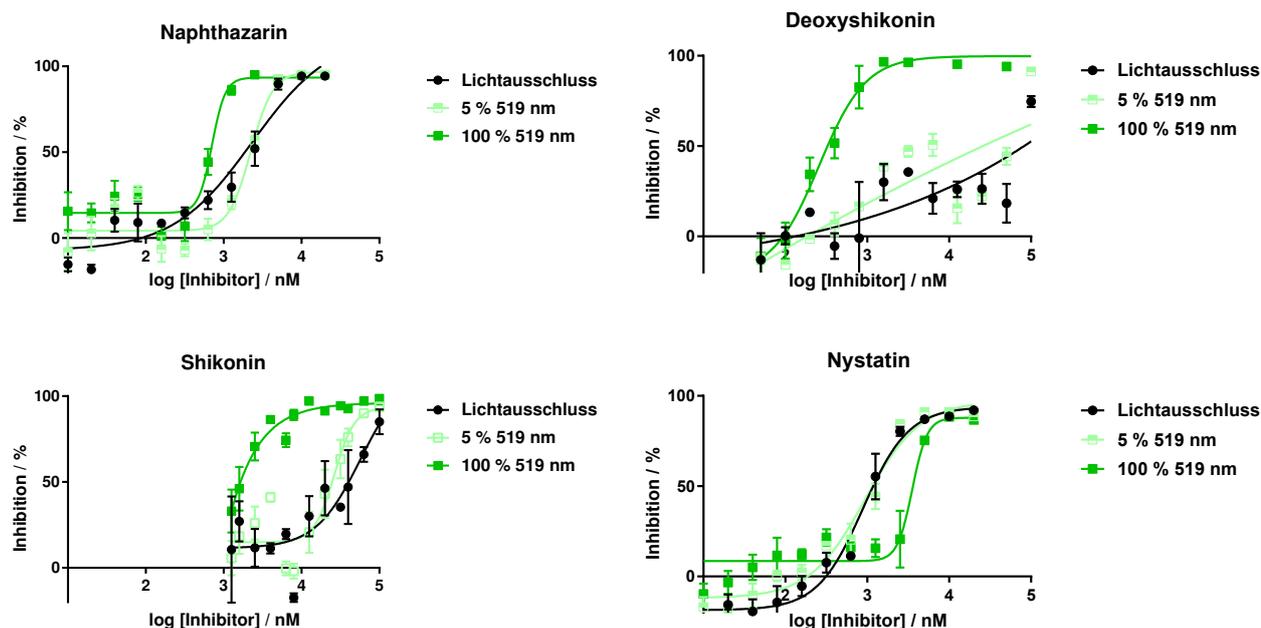


Abb. 3.3.: Dosis-Wirkungskurve der Testkandidaten Naphthazarin (**12**), Deoxyshikonin (**20**) und Shikonin (**19**) in einem IC₅₀-Resazurin-Zellviabilitätsassay (*C. albicans*). Die Ergebnisse der unbestrahlten Probe (schwarz) sind denen mit 5 % Lampenintensität bestrahlter (hellgrün) und mit 100 % Lampenintensität (dunkelgrün) bestrahlter Probe gegenübergestellt. Als Referenz diente Nystatin (**31**), ein potentes Antimykotikum gegen *C. albicans*.

Tab. 3.4.: Ergebnisse der ersten IC₅₀-Bestimmung an *C. albicans*. Der nicht-lineare *fit* wurde mit Prism 7 (GraphPad Software, siehe Abschnitt 9.3.1) durchgeführt. Einige Kurven ließen sich auf Grund des fehlenden sigmoidalen Verlaufs jedoch nicht *fit*ten, sodass dort keine Werte ermittelt werden konnten (-).

#	Substanz	IC ₅₀ [nM]		
		Unbestrahlt	5 % Intensität	100 % Intensität
12	Naphthazarin	2 328	2 234	708
20	Deoxyshikonin	-	-	258
19	Shikonin	57 187	26 396	-
31	Nystatin (Ref.)	887	941	3 548

Die Ergebnisse zeigten eindeutig die Wirkungen der durch Licht aktivierten Substanzen. Das NaphthazarinGrundgerüst ließ sich in den untersuchten Verbindungen erfolgreich mit einer Peakwellenlänge von 519 nm (100 % Intensität, 10 min Bestrahlungsdauer, 4600 mW, 6.5 mW/cm² Nennleistung, siehe Abschnitt 9.3.1) aktivieren. Der IC₅₀-Wert der aktivierten Substanz (708 nM) zeigte im Vergleich zum unbestrahlten Ergebnis (2 328 nM) eine um Faktor drei erhöhte Potenz. Betrachtet man das NaphthazarinGrundgerüst **12** im Vergleich zu den anderen beiden Verbindungen **19** und **20** dann fällt auf, dass sich die Dosis-Wirkungs-Kurven und die IC₅₀-Werte von den dreien unterscheiden. Das deutet daraufhin, dass nicht allein das NaphthazarinGrundgerüst **12** für die

Wirkung nach Photoaktivierung verantwortlich ist. Die Substituenten in der Position 2, bzw. 3 des chinoiden Rings besitzen zwar keinen starken Einfluss auf die Anregungswellenlänge zur Aktivierung der Substanz (siehe weiter oben, Abschnitt 3.2), wohl aber einen Einfluss auf die Gesamtwirkung am Pathogen. Zu beachten ist jedoch, dass einige der Messungreihen keinen *fit* zuließen (siehe Tab. 3.4). Anhand von Abb. 3.3 lassen sich dennoch die Tendenzen der Dosis-Wirkungs-Kurven deutlich ablesen. So liegt Naphthazarin (**12**) mit einer höheren Potenz von 708 nM über der Referenz Nystatin (**31**) mit einem Wert von 887 nM (unbestrahlt). Verglichen mit dem IC₅₀-Wert der unbestrahlten Probe verringert sich die Wirksamkeit des Nystatins (**31**) mit Bestrahlung jedoch (887 nM unbestrahlt vs. 3 548 nM bestrahlt). Dies lässt darauf schließen, dass das Molekül durch das Licht degradiert und an Wirkung verliert.ⁱⁱ

Für den Wirkstoff Shikonin (**19**) konnte kein IC₅₀-Wert nach Bestrahlung ermittelt werden. Durch den zu engen Konzentrationsbereich konnte die vollständige Dosis-Wirkungskurve nicht aufgezeichnet werden, sodass in Zukunft ein größerer Konzentrationsbereich für diese Derivate untersucht werden sollte. Die Photoaktivierung wird durch den Verlauf der Kurven aber dennoch bestätigt. Desweiteren fügt sich der IC₅₀-Wert der unbestrahlten Verdünnungsreihe mit etwa 57 µM in die Ergebnisse des initialen Wirksamkeitsscreenings ein (siehe Tab. 3.3).

Betrachtet man Deoxyshikonin (**20**), fällt eine deutliche Steigerung der Wirksamkeit nach Bestrahlung auf. Mit einem IC₅₀-Wert von 258 nM liegt es in seiner Potenz mit einem Faktor von 3 über dem Teststandard Nystatin (**31**). Der Einsatz der 5 %igen Strahlungsintensität (230 mW, 0.3 mW/cm² Nennleistungⁱⁱⁱ) zeigte, dass durch schwache Strahlung oder Umgebungsbeleuchtung wie Deckenlampen nur geringe bis keine Aktivierungen erhalten werden. Aus diesem Grund wurde diese Lampenintensität nicht weiter untersucht.

Durch diese Testergebnisse wurde der weitere Fokus auf die Untersuchung der Hitsubstanzen der Naphthazarinderivate gelegt. Um die in diesem Abschnitt angesprochenen Herausforderungen zu adressieren, unterteilte sich das Projekt in drei Kategorien, die parallel zueinander bearbeitet wurden:

I Kap. 4 - Synthese optimierter Naphthazarinderivate (S. 27)

Um optimierte Naphthazarinderivate in die Testungen mit einbringen zu können, wurden Synthesestrategien untersucht, Substitutionen in 2- bzw. 3-Position des chinoiden Molekülteils einzubringen.

I Kap. 5 - Permeationsverhalten der Naphthazarinderivate in Keratin (S. 51)

Für die Untersuchung der Keratinophilie wurden Permeationsuntersuchungen angestellt, in denen die Naphthazarine mit kommerziell erhältlichen Antimykotika verglichen wurden.

I Kap. 6 - Wirksamkeitsuntersuchungen an den Pathogenen (S. 65)

Neben weiteren IC₅₀-Bestimmungen wurde ein Nagelmodell angewendet, um die Photoaktivierbarkeit im Keratin nachzuweisen.

ⁱⁱDaher wird im Nachfolgenden der IC₅₀-Wert des unbestrahlten Nystatins (**31**) als Referenz angesehen und im Text verwendet.

ⁱⁱⁱAuf Grund der nicht-linear verlaufenden Leistung der Lampe, ist eine genaue Angabe dieses Wertes ohne Weiteres nicht möglich.

Kapitel 4.

Synthese

“ Few methods exist for the formation of naphthazarins and none of these are very satisfactory. The syntheses of substituted compounds of this type (whether natural or otherwise), in spite of their apparent simplicity, are therefore usually quite tedious processes. ”

R. Huot und P. Brassard, 1973

Naphthazarin (**12**) selbst ist bereits seit über 100 Jahren bekannt und industriell im Einsatz.^[143] Es wurde 1861 von ROUSSIN irrtümlicherweise synthetisiert und mit dem Naturfarbstoff Alizarin (**32**) (siehe Abb. 4.1) verwechselt. Noch im selben Jahr wurde dieser Fehler aufgeklärt und der Substanz wahrscheinlich deshalb der Name Naphthazarin verliehen.^[144] Erst 65 Jahre später wurde von DIMROTH und RUCK die korrekte Struktur aufgezeigt, die im nachfolgenden zu sehen ist.

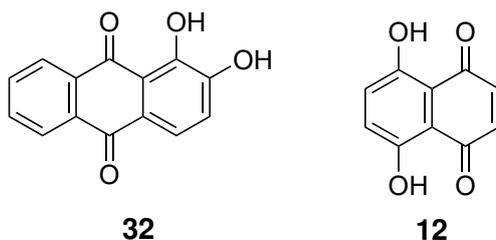


Abb. 4.1.: Abgebildet sind die Strukturen von Alizarin (**32**) und Naphthazarin (**12**), welches ursprünglich mit dem ersten verwechselt wurde. Erst 1926, 65 Jahre später, wurde von DIMROTH und RUCK die korrekte Struktur aufgeklärt.

Vor dem Aufkommen modernerer Farbstoffe waren Naphthazarinderivate die wichtigsten Chrombeizenfarbstoffe zur Färbung von Wolle.^[145] Neben anderen wurden sie als Teerfarbstoffe bezeichnet. Bereits Mitte der 40er Jahre nahm das Interesse an den Naphthochinonfarbstoffen jedoch schnell ab. Ein Grund hierfür war die unergiebigkeit und damit kostenintensive Synthese und das Fehlen einer ausdauernden Farbechtheit. Daher haben sich die Synthesevorschriften für Naphthochinone und Naphthazarinderivate seit damals nicht verändert. Dennoch wurden sie in einigen Teilen optimiert, in der Hoffnung die Ausbeute zu erhöhen, da sie in jüngster Vergangenheit wieder Aufmerksamkeit als potenzielle Arzneistoffklasse erhielten.^[146-149]

4.1. Retrosynthetischer Ansatz

Um neue Derivate des Naphthazarins zu synthetisieren, wurde zunächst eine retrosynthetische Betrachtung durchgeführt. Die reaktivsten Positionen sind die Positionen 2 und 3 im chinoiden Teil des Moleküls. Durch die elektronenziehenden Effekte der Ketogruppen sind diese Stellen für Reaktionen aktiviert. Der aromatische Ring ist dagegen der unreaktivere Teil im Molekül und

bedarf einer vorherigen Aktivierung durch beispielsweise eine Lewissäure, um eine Substitution am Ring durchführen zu können. Hierbei würden jedoch viele Nebenreaktionen durch den chinoiden Teil hervorgerufen. Außerdem zeigten Untersuchungen von MOORE *et al.*, dass durch einfache Tautomerisierung die elektronischen Verhältnisse in den Ringsystemen umgekehrt werden können.^[150,151] Eine Substitution mit einer elektronenschiebenden Gruppe wie einer Alkylgruppe würde die Bildung des 2/3-substituierten Tautomers bevorzugen.

Für das Einführen neuer Reste in diese Positionen des Moleküls können prinzipiell zwei verschiedene Syntheserouten verfolgt werden. Zum einen kann eine postsynthetische Modifikation des *scaffolds* (blauer Pfad) vorgenommen werden, zum anderen kann während des Aufbaus des Naphthazarinkerns eine Eduktvariation durchgeführt werden (roter Pfad). In dem nachfolgenden Abb. 4.2 sind diese beiden Varianten dargestellt.

Wie in der Totalsynthese der Naturstoffe Alkannin **33** bzw. Shikonin **19** nach NICOLAOU *et al.* könnte für die Synthese neuer Derivate ein Ansatz auf Basis des fertigen Naphthazaringrundgerüsts **12** gewählt werden (blaue Route).^[151] Hier wird nach erfolgter Synthese des *scaffolds* unter Einführen einer Schutzgruppe die Darstellung des gewünschten Produkts durchgeführt. Vorteil dieser Variante ist, dass mit Hilfe von Substitutions- oder Kupplungsreaktionen Reste eingebracht werden können. Das Edukt variiert dagegen nicht, sodass es in großer Menge hergestellt werden kann, um dann in Synthesen eingesetzt zu werden. Desweiteren sind bedingt durch die Schutzgruppen, bis auf Mehrfachsubstitutionen, keine Nebenreaktionen zu erwarten.

Die zweite Variante neue Reste einzuführen (rote Route), ist an die eigentliche Synthese zur Darstellung des Naphthazaringrundgerüsts angelehnt. Mit ihr umgeht man das Problem der synthetischen Linearität wie in Abb. 4.2 gezeigt. Durch die Reaktion zweier einfacher *building-blocks* kann die Darstellung der Derivate realisiert werden. Durch die Variation des zweiten *building-blocks*, dem Fumarsäure- bzw. Maleinsäurederivat, kann das Produkt entsprechend an das Vorhaben angepasst werden.

Im Rahmen dieses Projekts wurde zunächst der erste Ansatz (blauer Pfad) verfolgt, um möglicherweise eine Totalsynthese der Hitsubstanz Deoxyshikonins (**20**) zu erhalten. Parallel wurde auch der zweite Ansatz gefahren (blauer Pfad), um eine Bandbreite an neuen Derivaten für die biologischen und physiko-chemischen Testungen zu generieren.

4.2. Synthesen des Naphthazaringrundgerüsts (Retrosynthetischer Ansatz 1)

Um die erste Variante der retrosynthetischen Ansätze zu verfolgen, musste zunächst das Naphthazarin (**12**) selbst hergestellt werden. Im Anschluss wurde versucht die Reste in das Grundgerüst einzuführen. Wie bereits erwähnt wurden die Synthesen seit jeher nur wenig verändert und **12** ist

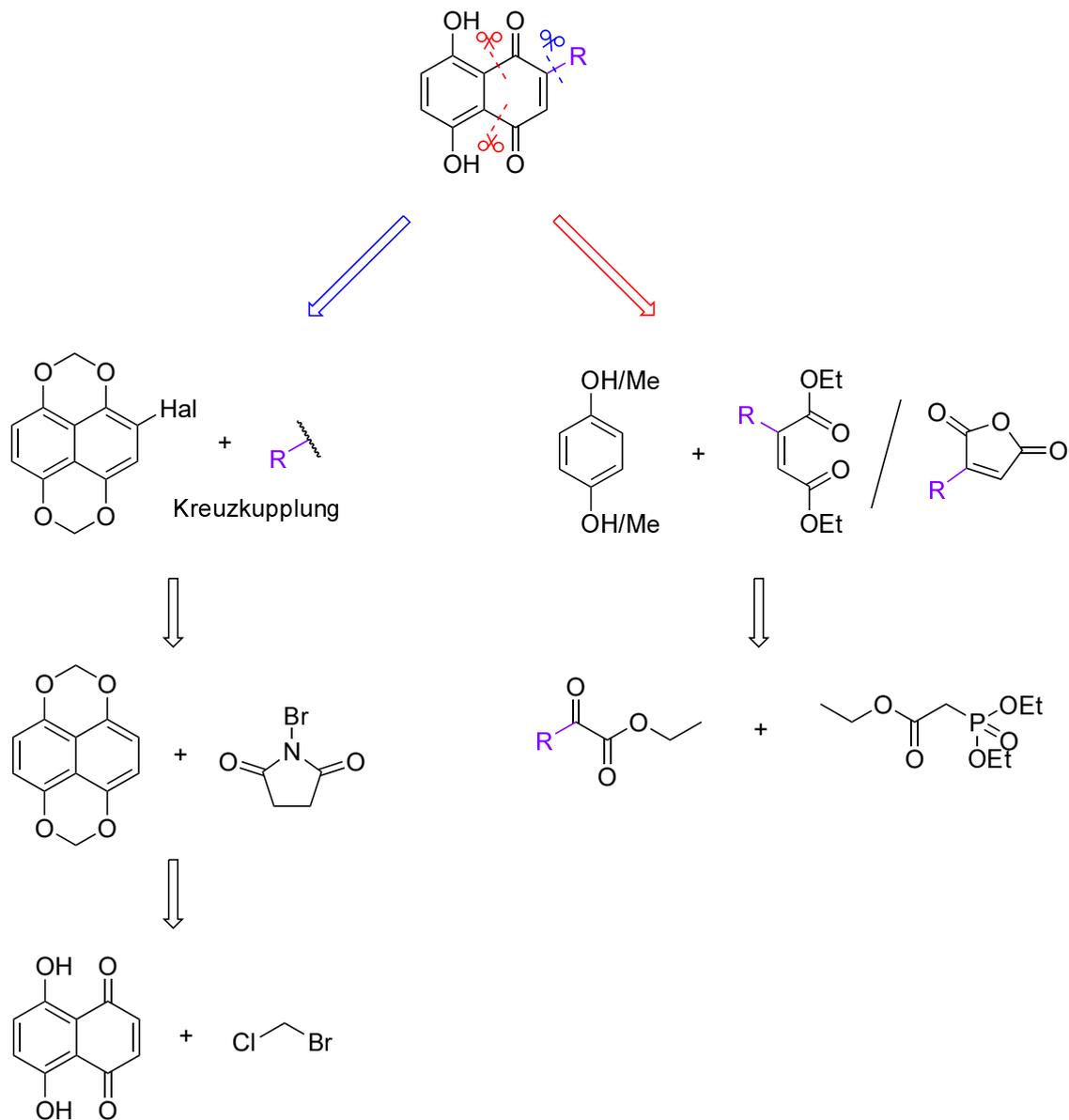


Abb. 4.2.: Abgebildet sind die retrosynthetischen Reaktionsschemata der beiden denkbaren Syntheserouten für substituierte Naphthazarine. Zum einen kann eine postsynthetische Modifikation stattfinden (blauer Pfad) und zum anderen kann beim Aufbau des Naphthazarinringgrundgerüsts **12** ein Rest mit eingebracht werden (roter Pfad).

prinzipiell über zwei Syntheseansätze zugänglich:

1. Das Umsetzen eines dinitrosubstituierten Naphthalens
2. Die Durchführung einer doppelten FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung

4.2.1. Aus 1,5-Dinitronaphthalin

Die erste der beiden Varianten wurde in der Originalvorschrift von Naphthazarin (**12**) 1861 von ROUSSIN berichtet.^[143] Sie basiert auf der Oxidation von 1,5-Dinitronaphthalin (**34**) unter Einsatz von elementarem Schwefel, konz. Schwefelsäure und 66-%igen Oleum (rauchende, konz. Schwefelsäure mit einem SO₃-Anteil von 66 Gew.-%) (siehe Abb. 4.3).

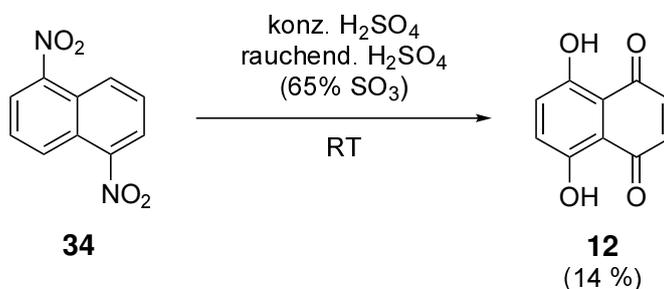


Abb. 4.3.: Unter Verwendung von elementarem Schwefel, konz. Schwefelsäure und rauchender Schwefelsäure wird 1,5-Dinitronaphthalin (**34**) ins Naphthazarin (**12**) überführt.

Zunächst erfolgt die Bildung einer 1,5-Diaminozwischenstufe **35**, die unter sauren Bedingungen weiterreagiert.^[152] Geschieht dies unter Raumtemperatur oder schwachem Erhitzen, bildet sich 5-Amino-8-hydroxy-1,4-naphthochinon (**36**), welches ohne Weiteres isoliert und aufgereinigt werden kann. In Lösung (z.B. Aceton) ist es stark violett gefärbt und besitzt Absorptionsbanden von bis zu über 600 nm (siehe Abschnitt 4.3.3). Durch Erhitzen unter Rückfluss wird **35** bzw. **36** zu Naphthazarin (**12**) hydrolysiert (siehe Abb. 4.4).

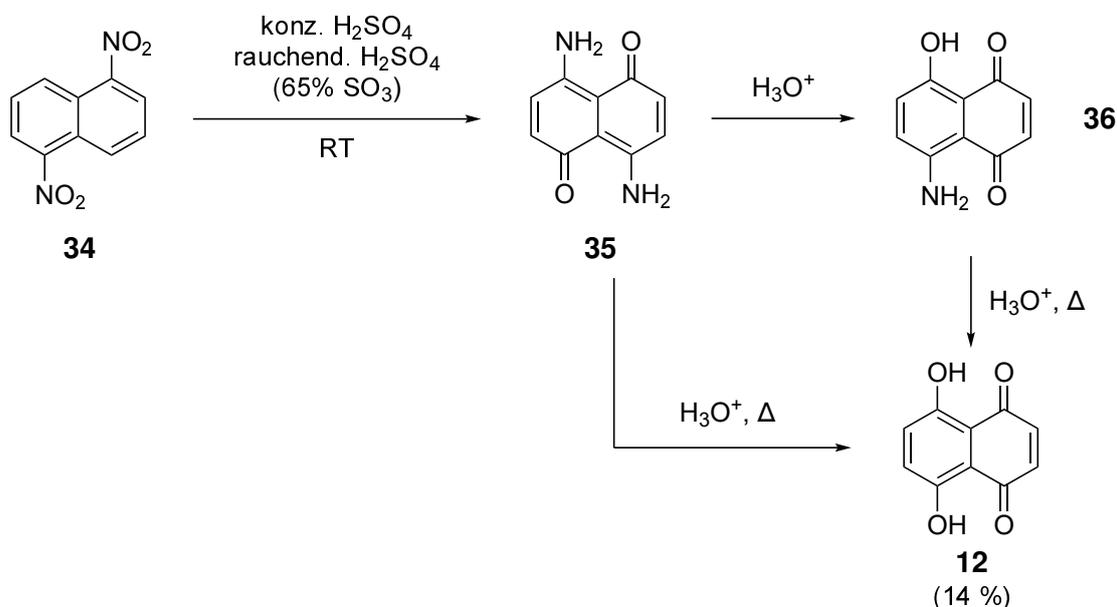


Abb. 4.4.: Der von ROUSSIN berichtete Mechanismus verläuft über eine 1,5-Diaminozwischenstufe **35**, die entweder unter sauren milden Bedingungen zum 5-Amino-8-hydroxy-1,4-naphthochinon (**36**) oder unter Erhitzen zum Naphthazarin (**12**) umgesetzt werden kann.^[152]

Die Synthese wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer Vorschrift von GREADY *et al.* durchgeführt und verlief mit einer Ausbeute von rund 14 % mit einer niedrigen Effizienz. Die Literatursausbeute von 50 % konnte hier auch bei wiederholter Durchführung nicht erhalten werden. Bereits zu Beginn der Reaktion konnte ein Grund für die Beeinträchtigung der Ausbeute entstanden sein. Das Edukt **34** wurde in konz. Schwefelsäure suspendiert, woraufhin der Schwefel in rauchender Schwefelsäure (Oleum, 65 %ig) gelöst hinzugegeben wurde. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Temperatur, die bei dieser exothermen Reaktion zeitweilig sehr schnell anstieg, nicht über 50 °C gelangte. Durch die hohe Viskosität der blau gefärbten Oleum-Lösung, war dieser Vorgang schwer steuerbar. Vom Schwefel in Oleum konnten daher nur ungenaue Mengen eingesetzt werden, auch weil das gelöste SO₃ stetig als Rauch entwich. Ein weiteres Problem war die Aufarbeitung des Rohprodukts, welches mit heißem Toluol extrahiert und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt werden musste. Das Produkt **12** interagierte mit dem Kieselgel der Säule, sodass es vermutlich deprotoniert vorlag und ein Teil der Ausbeute nicht weiter eluiert werden konnte (siehe Abb. 4.5). Durch Zugabe einer Säure (Essigsäure) färbte sich das nun blau/violette Kieselgel wieder rötlich. Vermutlich würde eine Trennung mit einem *reversed-phase*-Kieselgel (z.B. C8-C18) mit weniger Verlust ablaufen. Auch bei den Aufreinigungen der synthetisierten Naphthazarinderivate (siehe Abschnitt 4.3.2) wurden Ausbeuten auf diese Art verloren.

Neben den klassischen Aufarbeitungsmethoden wurde versucht, mittels Wasserdampfdestillation direkt nach erfolgter Reaktion das Produkt aus der wässr. Lösung herauszutreiben. Dieser Prozess gestaltete sich jedoch als sehr langwierig und lieferte kein sauberes Produkt. Eine Extraktion gefolgt von einer Sublimation hingegen führte zu einem sauberen Produkt in kristalliner Form mit dem für Naphthazarin (**12**) typischen grün-metallischem Glanz. Für große Ansätze eignet sich diese Methode der Aufreinigung jedoch nicht.

Auch in diesem Reaktionspfad wäre es denkbar, anderweitig substituierte 1,5-Dinitronaphthalinderivate einzusetzen, um direkt bei Bildung des Naphthazarins (**12**) die neue Funktion am Molekül einzuführen. Leider sind die Derivate des Nitronaphthalins auf Grund ihrer desaktivierenden Substituenten synthetisch schlecht zugänglich. Auch der Einsatz des 1,8-Dinitronaphthalins, welches dem 1,5-Dinitronaphthalin (**34**) sehr ähnlich ist, führte in bisherigen Veröffentlichungen zu geringen bis keinen Ausbeuten und wurde nicht weiter verfolgt.^[144]

4.2.2. Aus Hydrochinon/1,4-Dimethoxybenzen

Etwa um 1928 zeigten ZAHN und OCHWAT eine praktikablere Syntheseroute.^[153] Diese besteht aus einer doppelten FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung (FCA) eines Hydrochinons **37** durch Maleinsäureanhydrid (**38**). Noch heute zählt dieses Vorgehen in der Synthese von Naphthazarinderivaten zu dem am meisten verwendeten.^[151,154–156] Sie findet unter Verwendung einer Natriumchlorid/Aluminiumchlorid-Schmelze statt. Zwar sind auch hier die Ausbeuten mit oft unter 50 % geringer als erwünscht, jedoch kann das Maleinsäureanhydrid (**38**) durch Substitution der 2-Position verwendet werden, um neue Seitenketten in das entstehende 5,8-Dihydronaphthochinon **12** einzutragen. In Abb. 4.6 ist das allgemeine Reaktionsschema der Synthese abgebildet.



Abb. 4.5.: **Links:** Nach erfolgter säulenchromatographischer Trennung verblieb vermutlich ein Teil des Naphthazarins auf dem Kieselgel der Säule, was an der starken Violettfärbung erkennbar ist. **Rechts:** Nach Versetzen des Fließmittels mit wenigen Millilitern Ameisensäure verfärbte sich das violette Kieselgel wieder rötlich und es wurde eine weitere unsaubere Fraktion erhalten.

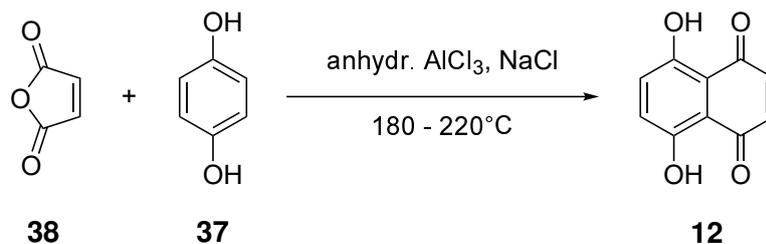


Abb. 4.6.: Darstellung von Naphthazarin (**12**) aus Maleinsäureanhydrid (**38**) und Hydrochinon (**37**) nach einer Vorschrift von ZAHN und OCHWAT.^[153]

Die Reaktion findet lösungsmittelfrei unter Verwendung einer Schmelze aus Natriumchlorid (NaCl) und Aluminiumchlorid (AlCl₃) bei Temperaturen von 140-220 °C statt. Zusammen bilden die beiden Salze ein eutektisches Gemisch, welches bereits bei einer Temperatur von etwa 108 °C zu schmelzen beginnt.^[157] Nach Zugabe der miteinander vermengten Edukte kann rasch eine Farbänderung beobachtet werden. Zu Beginn färbt sich das Reaktionsgemisch gelblich, was schnell in eine rötlich-violette Farbe übergeht. Wie im Abschnitt 4.3.4 beschrieben handelt es sich bei dieser gelblichen Verfärbung sehr wahrscheinlich um das Zwischenprodukt **39** oder **41** (siehe Abb. 4.7), welches nach einmalig erfolgter FCA entsteht. Sobald die zweite erfolgt ist, kann die rötliche Farbe des chinoiden Systems beobachtet werden. In diesem Zustand beginnt die Schmelze zu erstarren und lässt sich mit einem herkömmlichen Magnetrührstab nicht mehr bewegen.

Mit Erhitzen des AlCl₃ und des NaCl formt sich die Schmelze bestehend aus AlCl₂⁺- und AlCl₄⁻-Ionen, die in Reaktion mit Maleinsäureanhydrid (**38**) das Elektrophil **40** der FCA bilden. Während dieser Reaktion kann es zu Isomerisierungen kommen, sodass entweder das *Z*- oder das *E*-Isomer vorliegen. Beide gehen die Acylierung des Hydrochinons (**37**) ein und bilden das einfache FCA-Produkt **39**. Durch die günstige Stellung des Aluminiumatoms wird die neu entstandene Seitenkette zum Ring koordiniert, sodass sterisch betrachtet eine weitere FCA ermöglicht wird. Nach erneuter Acylierungsreaktion zu Verbindung **42**, wird in einem letzten Schritt mit Hilfe von Salzsäure der zweifache Aluminiumkomplex hydrolysiert, um das gewünschte Produkt **109** zu erhalten. Möglicherweise könnte durch den Einsatz von *Z*-Isomeren die Ausbeute der Reaktion steigern. Denkbar wäre eine Anreicherung, die mittels strahlungsinduzierter Isomerisierung (*E* → *Z*) stattfindet.

Das beschriebene Erstarren der Aluminium-/Natriumchloridschmelze zeigt, dass die Reaktion wie gewünscht abläuft, führt aber auch dazu, dass die Edukte nicht weiter vermengt werden. Dies kann zur Ausbeutenreduktion beitragen. Auch der Einsatz eines KPG-Rührers führte zu keiner Verbesserung der Ausbeuten. Hierbei ist auch zu erwähnen, dass der Aufbau, bei dem der KPG-Rührer in die Mitte eines Dreihalskolbens gesetzt werden muss, dazu führt, dass die Edukte nur unter Verlust zur Schmelze hinzugegeben werden können. Ein Teil verbleibt am Rand des Kolbens.

Ein weiterer Grund für Ausbeutenverlust kann die unkontrollierte Sublimation des AlCl₃ sein. Ab einer Temperatur von etwa 180 °C beginnt sich ein farbloser Rauch zu bilden, der sich am Rückflusskühler und anderen höhergelegenen Teilen der Apparatur abzusetzen beginnt.^[159] Außer zu Beginn eine größere Mengen AlCl₃ hinzuzugeben, gibt es keine Möglichkeit diese Sublimation

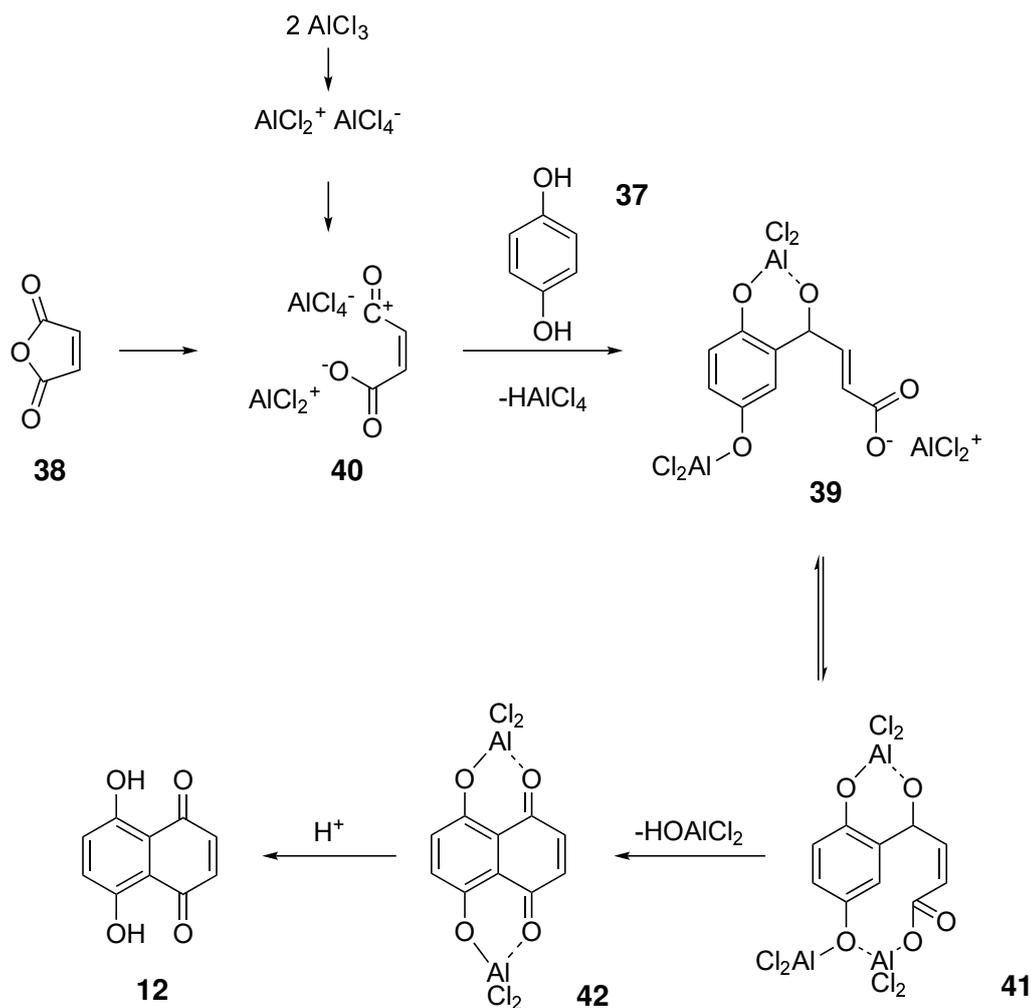


Abb. 4.7.: Dargestellt ist der Reaktionsmechanismus für die Synthese des Naphthazarins (12). Über eine doppelte FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung des Maleinsäureanhydrids (38) mit einem Hydrochinonmolekül (37).^[153,158]

unter Standardsynthesebedingungen zu unterbinden oder auszugleichen.

Eine Ausbeutensteigerung wurde hingegen erzielt, indem das Maleinsäureanhydrid (38) in der 2 und 3 Position mit je einem Chloratom substituiert wurde. Diese Syntheseoptimierung nach HUOT und BRASSARD ist die wohl am häufigsten verwendete Variante.^[151,154,155] In Abb. 4.8 ist die Reaktion zum dichlorierten Anhydrid 43 dargestellt.

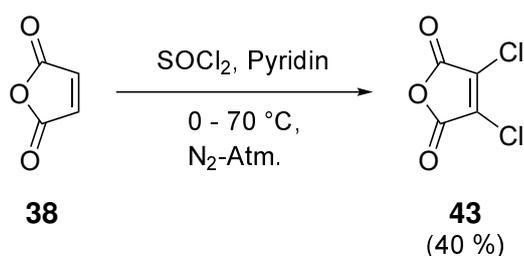


Abb. 4.8.: Die Darstellung des doppelt chloresubstituierten Maleinsäureanhydrids 43 gelingt über Deprotonierung mittels Pyridin mit anschließender Chlorierung durch Thionylchlorid.

Durch die Zugabe von Pyridin wird Maleinsäureanhydrid (**38**) an der 2 oder 3 Position deprotoniert und für eine Substitution durch Chloratome aktiviert. nachdem die Chlorierung mit Hilfe von Thionylchlorid (SOCl_2) erfolgt ist, wiederholt sich die Reaktion an der noch freien Position. Die Ausbeuten der Reaktion lagen mit bis zu 40 % in einem annehmbaren Bereich. Der einzige negative Punkt an der Synthese ist das in großem Überschuss eingesetzte Thionylchlorid. Da es zusätzlich als Lösungsmittel in der Synthese fungiert, wird es in großem Überschuss eingesetzt und muss nach der Reaktion wieder entfernt werden. Das geschieht mittels Vakuumrotationsdestillation und muss unbedingt unter erhöhten Sicherheitsvorkehrungen geschehen. Die Abluft der Pumpe enthält gasförmiges Thionylchlorid sowie HCl und SO_2 .

Um das aktivierte Derivat **43** zum Naphthazarin (**12**) umzusetzen, wurde abermals die doppelte FCA durchgeführt. Daraus resultiert zunächst nicht das gewünschte Naphthazarin (**12**), sondern das 2,3-dichlorierte Derivat **44** (siehe Abb. 4.9).

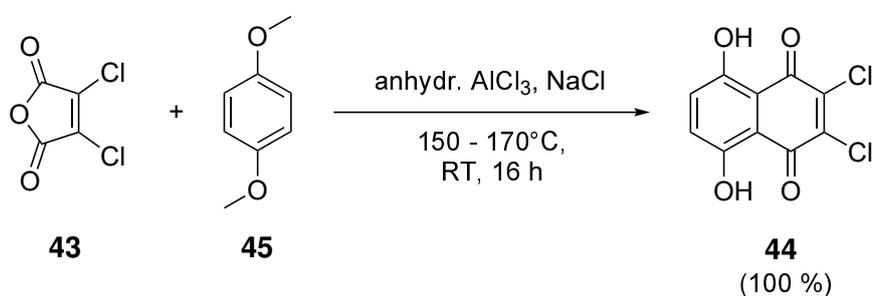


Abb. 4.9.: Darstellung von 2,3-Dichlornaphthazarin (**44**) mittels doppelter FCA aus 2,3-Dichlormaleinsäureanhydrid (**43**) und 1,4-Dimethoxybenzen (**45**).

Der Verlauf der Reaktion war mit 100 % für das Rohprodukt höher als bei den bisherigen Durchführungen. Der starke elektronenziehende Effekt der Chloratome führte zu einer erhöhten Reaktivität. Eine weitere Optimierung war der Einsatz des 1,4-Dimethoxybenzens (**45**), der unerwünschte Nebenreaktionen an den vormals vorhandenen Hydroxygruppen des Hydrochinons (**37**) verhindert. Die Durchführung unterschied sich bis auf die eingesetzten Edukte ansonsten nicht zu der vorherigen Variante nach ZAHN und OCHWAT. Für die weitere Durchführung wurde jedoch wie in der Vorschrift beschrieben, keine Aufarbeitung durchgeführt.^[155]

4.2.3. Einführen der Seitenkette in das Naphthazarinringgerüst (**108**)

Nach erfolgter Synthese des Naphthazarinringgrundgerüsts, mit (**44**) oder ohne (**12**) Chlorierung in 2- und 3-Position, sollte dieses in einer Reaktion mit einer Schutzgruppe umgesetzt werden. Um neue Reste einführen zu können, mussten zunächst die funktionellen Gruppen in den Positionen 1, 4, 5 und 8 geschützt werden. Hierfür standen primär zwei verschiedene Methoden zur Auswahl. Nach einer Vorschrift von KAWASAKI *et al.* hätte mit Hilfe von Dimethylsulfat vier Methoxygruppen in das Molekül eingeführt werden können.^[160] Auf Grund der hohen Toxizität des Dimethylsulfats, welche in den Alkylierungseigenschaften begründet liegen, wurde zunächst eine andere Schutzgruppe gewählt. DALLACKER *et al.* beschreiben eine doppelte Acetalschutzgruppe für jeweils die Positionen 1 und 8 und die Positionen 4 und 5.^[161] Um diese Reaktion durchführen zu können, musste zunächst

das chinoide System entfernt werden, was mittels Reduktion zum Leukonaphthazarin (**46**) unter Verwendung von Zinnchlorid (SnCl_2) in 4 M HCl durchgeführt wurde (siehe Abb. 4.10).^[155,162] Hierbei war es nicht von Bedeutung, ob es sich um das dichlorierte Derivat **44** oder das Grundgerüst **12** handelte, da die Chloratome bei der Reduktion abgespalten wurden.

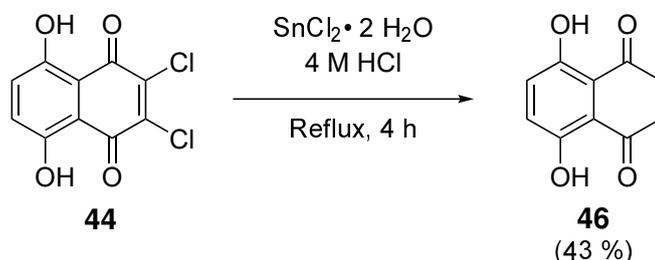


Abb. 4.10.: Unter Verwendung von SnCl_2 in 4 M HCl wurde Naphthazarin (**12**) oder das hier abgebildete doppelt chlorierte Derivat **44** zum Leukonaphthazarin (**46**) reduziert.

Die Vorschrift für den Versuch wurde aus der Arbeit von NEUMEYER *et al.* entnommen, ist aber auch in weiteren Veröffentlichungen verwendet worden.^[148,155,163,164] Das Produkt dieser Reaktion, das Leukonaphthazarin (**46**), ist ein gelber Feststoff, der auf dem Kieselgel der DC-Platte und in Lösung unter UV-Licht eine bläuliche Fluoreszenz aufzeigte. Diese verschwand jedoch nach Stunden wieder, was vermutlich durch Autoxidation von **46**, bei der es wieder in die chinoide Form überführt wird, erklärt werden kann. NICOLAOU *et al.* beschrieben es als "mäßig luftempfindlich".^[151] Während der Lagerung und Handhabung zeigte sich **46** als Feststoff jedoch stabil. Die Ausbeute der Reaktion, die in der Literatur mit rund 70 - 100 % angegeben wird, konnte in den 6 Wiederholungen der Synthese nicht erreicht werden.^[155,161,162] Die höchste Ausbeute lag unter Verwendung des 2,3-Dichlor-naphthazarins **44** bei 43 %. Naphthazarin (**12**) als Edukt ergab eine niedrigere Ausbeute von 32 %. Oftmals wurden aber die Edukte **12** und **44** ohne weitere Aufreinigung verwendet, um Zeit zu sparen, sodass nur eine HPLC-bestimmte Reinheit vorlag und zum Berechnen der Ausbeute verwendet wurde.

Um die beschriebene Schutzgruppe in das NaphthazarinGrundgerüst **12** einführen zu können, wurde die nachfolgende ebenfalls von NEUMEYER *et al.* beschriebene Reaktion eingesetzt (siehe Abb. 4.11).

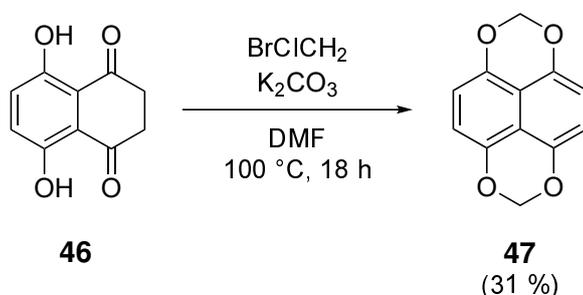


Abb. 4.11.: Unter Zuhilfenahme der Base Kaliumcarbonat (K_2CO_3) wurde Leukonaphthazarin (**46**) mit einer Methylenacetalschutzgruppe versehen. Es wurde Naphtho[1.8-de]-1,3-dioxin (**47**) gebildet.

Unter Verwendung von Bromchlormethan zusammen mit einer Base, hier K_2CO_3 , konnten zwei Methylenacetale gebildet werden. Da es sich bei Bromchlormethan um eine Ozon gefährdende Substanz handelt, wird eine sorgfältige Handhabung benötigt, sodass kein Entweichen in die Umwelt auftreten kann. Verbindung **47** wurde säulenchromatographisch aufgereinigt, um eine Ausbeute von 31 % zu erhalten. Durch das Schützen der funktionellen Gruppen, verlor **47** ihre starke Rotfärbung und lag als farbloser bis schwach gelblicher Feststoff vor. Der *spot* auf dem Kieselgel der DC-Platte wies durch eine erneute Rotfärbung nach etwa zwei Tagen eine Zersetzungsreaktion zurück zum Edukt **12** auf. Auch das Lagern bei RT über mehrere Wochen war nicht ohne Zersetzung möglich.

Für den nächsten Schritt im Synthesepfad wurde Naphtho[1.8-de]-1.3-dioxin (**47**) zusammen mit frisch aus H_2O umkristallisierten *N*-Bromsuccinimid (NBS) bei Raumtemperatur und unter N_2 -Atm. gerührt. Die nachfolgende Abb. 4.12 zeigt das Reaktionsschema.

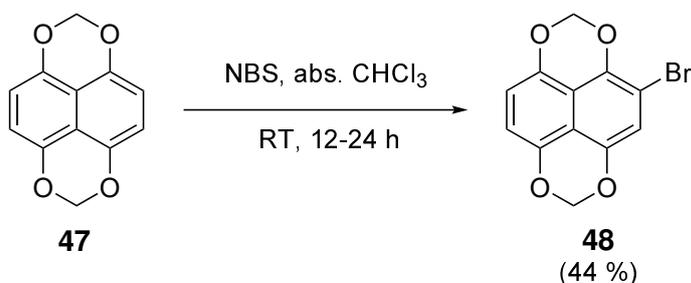


Abb. 4.12.: Das acetalgeschützte Naphthazarin **47** wurde unter Verwendung von NBS in 2-Position bromiert, um **48** zu erhalten.

Die niedrige Ausbeute von etwa 44 % liegt in der Möglichkeit begründet, die acetalgeschützte Verbindung **47** mehrfach zu bromieren. Neben dem Produkt **48** sind das 2,3-, das 2,6-, das 2,7-, und das 2,3,6-Bromoderivat als Nebenprodukte denkbar. Auch war die Aufreinigung des Produktgemisches nicht ohne weiteres möglich, sodass für den nachfolgenden Schritt keine hohe Reinheit für **48** eingesetzt werden konnte.

Für den finalen Schritt wurde die Synthese des kommerziell erworbenen Deoxyshikonins (**20**) als Prototypreaktion angestrebt. Für diese Verbindung ist bisher kein Syntheseweg berichtet worden. Zur Zeit wird es aus Pflanzen extrahiert und ist daher teuer in Produktion und Anschaffung.

MALAKHOV *et al.* berichteten von einer "Eintopfsynthese", in der zunächst *in situ* zinkorganische Verbindungen erstellt werden, die im Anschluss im Sinne einer NEGISHI-Kreuzkupplung weiterregieren.

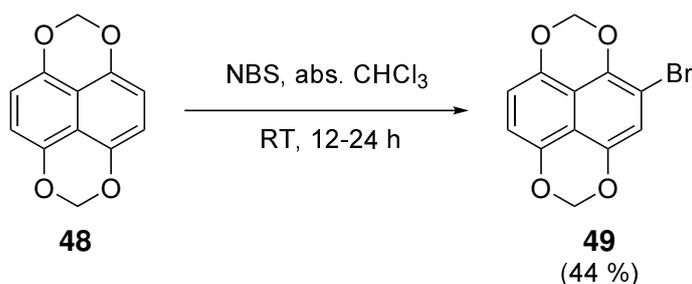


Abb. 4.13.: Verbindung **48** sollte in einer "Eintopfsynthese" mit einem *in situ* erzeugtem Zinkalkyl **49** zum noch geschützten Deoxyshikonin **50** umgesetzt werden.

Das erhaltene Rohprodukt war mit einer berechneten Ausbeute von über 200 % stark verunreinigt, wurde für die Entschützung durch Erhitzen in 4 M HCl aber ohne weitere Aufreinigung verwendet. Hier konnte nach Beenden der Reaktion kein Produkt isoliert werden. Es folgte während des Erhitzens zwar ein Farbwechsel (farblos → rötlich), jedoch handelte es sich nicht um das gewünschte Produkt **20**. Aus zeitlichen Gründen wurde dieser retrosynthetische Pfad im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, obwohl er großes Potenzial für die Darstellung komplizierter Naphthazarinderivate bietet.

4.3. Synthese der Zielverbindungen (Retrosynthetischer Ansatz 2)

Zeitgleich zu den bisher beschriebenen Synthesen zeichnete sich ab, dass mit dem zweiten Syntheseweg (rot, siehe Abb. 4.2) schnellere und ergiebigere Erfolge erzielt wurden. Kernpunkt dieser Synthese ist die eingangs beschriebene doppelte FCA nach ZAHN und OCHWAT, um die Zielverbindungen zu erhalten. Durch den Einsatz verschieden substituierter Edukte lassen sich mit nur wenigen Syntheseschritten neue Naphthazarinderivate aufbauen. Da in dieser Reaktion hauptsächlich das Malein- bzw. Fumarsäurederivat ausgetauscht wird und das 1,4-Dimethoxybenzen (**45**) verwendet wird, mussten zunächst die Säurederivate dargestellt werden.

4.3.1. Synthese der Fumar-/Maleinsäurederivate

Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von SHARMA *et al.* durchgeführt (siehe Tab. 4.1) und basiert auf einem Mechanismus postuliert von HORNER, WADSWORTH und EMMONS.^[165] Das nachfolgende Reaktionschema 4.14 zeigt diesen.^[166–168]

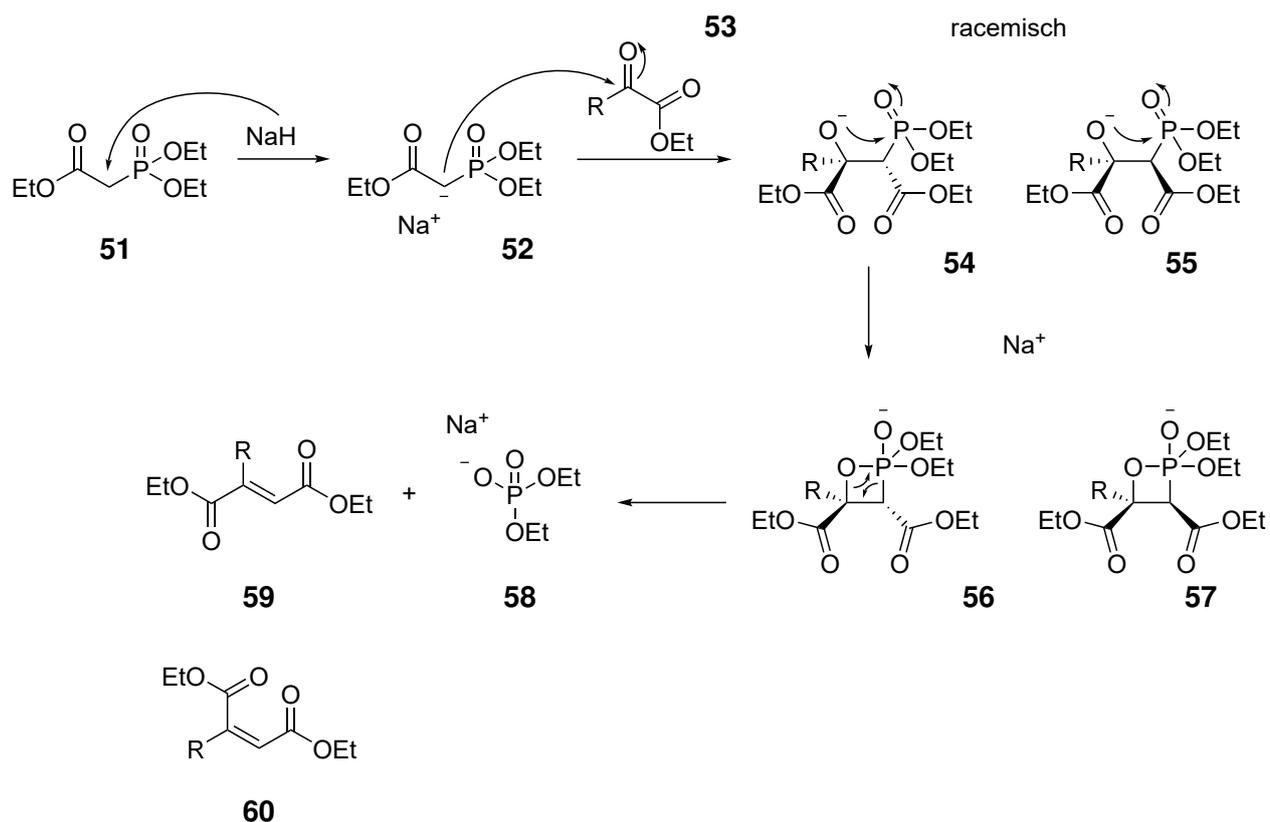


Abb. 4.14.: Darstellung verschiedener Maleinsäure- bzw. Fumarsäurederivate mit Hilfe einer HORNER-WADSWORTH-EMMONS-Reaktion. Bereits die Wahl der Oxoalkylsäure **53** kann die sterische Selektivität beeinflussen. Durch den Rest R kann eine Vielzahl von Alkyl- oder Arylfunktionen eingebracht werden.

Der erste Schritt ist die Deprotonierung des Phosphonoessigsäure-triethylester (**51**) an der α -aciden Position. Gefolgt vom Angriff am carbonylen Kohlenstoffatom der 2-Oxoalkylsäure **53**, bei dem die Intermediate **54** und **55** racemisch entstehen können. Der derzeit angenommene Mechanismus beschreibt, dass die HORNER-WADSWORTH-EMMONS-Reaktion stereoselektiv in Richtung des *E/trans*-Isomers **59** verläuft.^[168] In diesem Fall bildet sich hauptsächlich das Alkoholat **54**, welches anschließend zum Oxaphosphetan **56** weiterreagiert und dabei ein Ringsystem bildet. Entstehendes Alkoholat **55** zerfällt wieder in seine Edukte und kann nicht zum Oxaphosphetan **57** weiterreagieren. Zu berücksichtigen ist hierbei jedoch, dass der angenommene Mechanismus einen Aldehyden als Edukt voraussetzt. Wird wie hier ein Keton verwendet, welches durch seinen zweiten Alkylrest eine anspruchsvollere Sterik besitzt, kann sich die Stereoselektivität entsprechend umkehren und die Ausbeuten beeinflussen. Es würde sich dann das Oxaphosphetan **57** bilden.

Nach Entstehen des Oxaphosphetans zerfällt dieses in die Produkte Fumarsäure **59**, bzw. Maleinsäure **60** und Diethylphosphat **58**. Letzteres fällt direkt als Natriumsalz aus und verursacht in der nachfolgenden Aufarbeitung keine weiteren Verunreinigungen. In den durchgeführten Reaktionen (siehe Tab. 4.1) wurden jeweils moderate Ausbeuten zwischen 52 und 94 % des *E*-, aber keine des *Z*-Isomers isoliert, was vermuten lässt, dass die sterischen Einflüsse die Selektivität nicht veränderten.

Tab. 4.1.: Abgebildet ist das allgemeine Reaktionsschema, nach dem die Produkte **61**, **62**, **63** und **64** dargestellt wurden. Als Edukte dienten die 2-Oxoalkylsäuren auf der linken Seite.

#	Edukt	#	Produkt	Ausbeute (%)
65		61		64
66		63		58
67		62		94
68		64		71

Unter Verwendung dieser Reaktion, ließen sich die in Tab. 4.1 gezeigten Fumarsäurederivate unter akzeptablen Ausbeuten von 52 - 71 % herstellen. Das NaH (60 %ig in Mineralöl) wurde anders als in der Vorschrift von SHARMA *et al.* erwähnt, vorher nicht unter N₂-Strom mit abs. THF vom Mineralöl befreit, sondern direkt eingesetzt, da als LM für die Synthese ebenfalls THF eingesetzt wurde.

Auffällig war, dass direkt nach Zutropfen des Ketons eine starke Steigerung der Viskosität beobachtet werden konnte. Der Magnetrührstab war nicht mehr in der Lage die Lösung zu durchmischen. Das darauffolgendes Erwärmen führte wieder zur Verflüssigung. Vermutlich wurde deshalb laut Vorschrift nach Zugabe nur 5 min weiter unter Kühlung gerührt und dann auf 50 °C erwärmt. Die Aufreinigung mittels Flashchromatographie (> 10 % Ethylacetat und Petrolether) wurde bei den Derivaten durchgeführt und zeigte ähnliche Verläufe in den Chromatogrammen. Möglicherweise befanden sich unter den Nebenprodukten, die zuerst detektiert wurden, auch die Z-Isomere, jedoch war der Anteil dieser Nebenproduktfraktionen gering, wie in Abb. 4.15 zu sehen ist. Eine weitere Aufklärung der verunreinigten ersten Fraktion erfolgte nicht.

Um die Reaktivität der Derivate zu steigern, wird üblicherweise das Anhydrid aus ihnen dargestellt. Für Verbindung **62** wurde diese Syntheseroute wie von AIWALE *et al.* beschrieben durchgeführt und

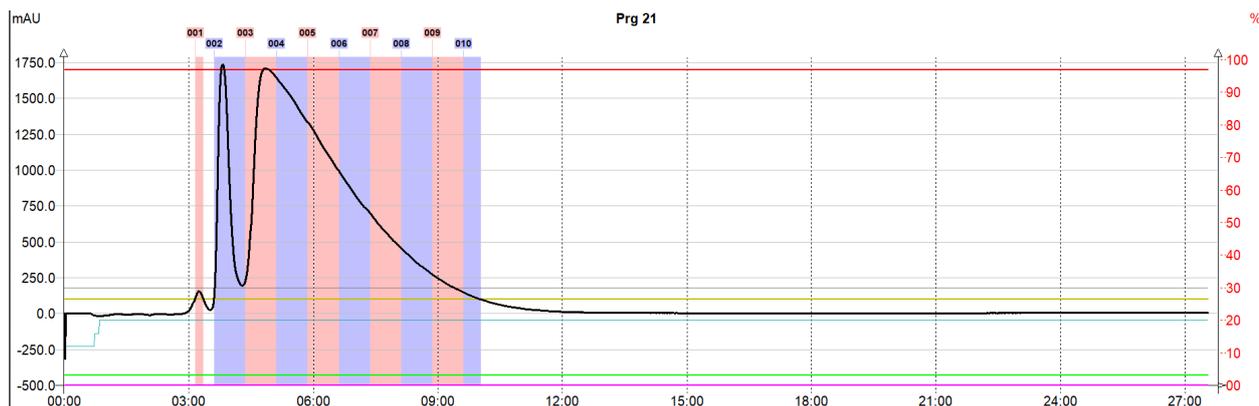


Abb. 4.15.: Abgebildet ist das Chromatogramm der Aufreinigung von **63** mittels Flashchromatographie. Das Fließmittelgemisch bestand aus 10 % Ethylacetat und 90 % Petrolether.

ist in Abb. 4.16 zu sehen.^[169]

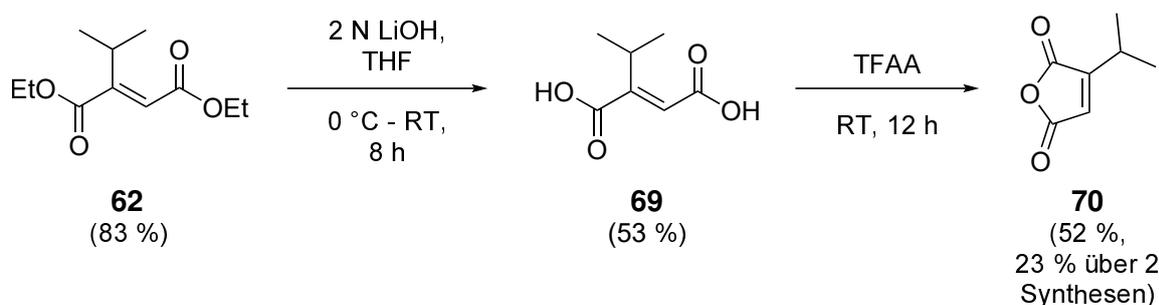


Abb. 4.16.: Syntheseroute für die Darstellung des Maleinsäureanhydridderivats **70** aus **62**. Über eine zwei-stufige Synthese wurde viel Ausbeute verloren, sodass die anderen Fumarsäureester direkt verwendet wurden.

Nach erfolgreicher Synthese von Verbindung **62** mit einer Ausbeute von 83 % wurde mit Hilfe von 2 N LiOH-Lösung eine basische Esterspaltung durchgeführt. Die 2-Isopropylfumarsäure (**69**) wurde im Anschluss mittels Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) in 2-Isopropylmaleinsäureanhydrid **70** überführt. Die Ausbeute lag, die Synthese von **62** mit eingerechnet, nach allen Synthesestufen bei insgesamt 23 %. Diese geringe Ausbeute und der zusätzliche zeitliche Aufwand der beiden extra Synthesestufen, führten dazu, dass die Fumarsäurederivate direkt in der Schmelze verwendet wurden.

Neben den in Tab. 4.1 gezeigten Verbindungen wurde versucht, mit Hilfe verschiedener Methoden das Molekül der Diethylfumarsäure (**71**) zu modifizieren. Hierfür wurde zunächst nach EYJÓLFSSON das 1,2-Bis(ethoxycarbonyl)ethylidetriphenylphosphoran **74** hergestellt (siehe Abb. 4.17).^[170] Diethylfumarsäureester (**72**) und Triphenylphosphin-Hydrobromid (**73**) wurden in ACN gelöst und nach 15 min unter Rückfluss erhitzt. Das Produkt konnte nach Zugabe von 2 N NaOH-Lösung mit Diethylether (Et₂O) in bereits hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 77 % extrahiert werden.

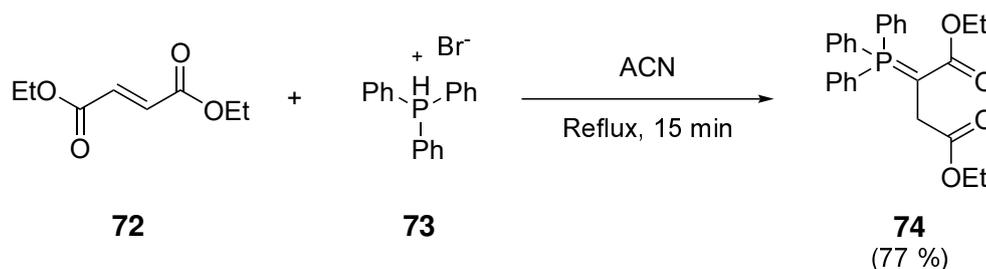


Abb. 4.17.: Dargestellt ist die Syntheseroute für **74** aus Diethylfumarsäureester (**72**) und dem Hydrobromid des Triphenylphosphins (**73**)

Im Anschluss wurde nach einer Vorschrift von COOKE **74** zusammen mit Lithiumdiisopropylamid (LDA) bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ umgesetzt.^[171] Wie beschrieben bildete sich nach Zugabe von **74** zum LDA eine stark orange gefärbte Lösung, welche die Bildung eines Ylidanions beschreibt (siehe Abb. 4.18). Durch die kinetisch kontrollierte Deprotonierung (starke Base, $-78\text{ }^\circ\text{C}$) von **74** konnte die Alkylierung durchgeführt werden. Es wurden primäre Alkyljodide verwendet.^[168] Nach erfolgreicher Reaktion entfärbte sich die Lösung wieder und es musste die Phosphorgruppe abgespalten werden. Zur Aufarbeitung wurde das Rohprodukt zusammen mit Benzoesäure in katalytischen Mengen erhitzt. Der Mechanismus der Abspaltung verläuft im Sinne einer Substitutionsreaktion.^[171] Nach weiterer Aufarbeitung, konnte das Produkt **75** isoliert und charakterisiert werden. Die Synthese ist in Abb. 4.19 zu sehen.



Abb. 4.18.: Nach Zugabe von LDA zu **74** konnte eine starke orange Färbung beobachtet werden, die durch das entstandene Ylidanion auftaucht.

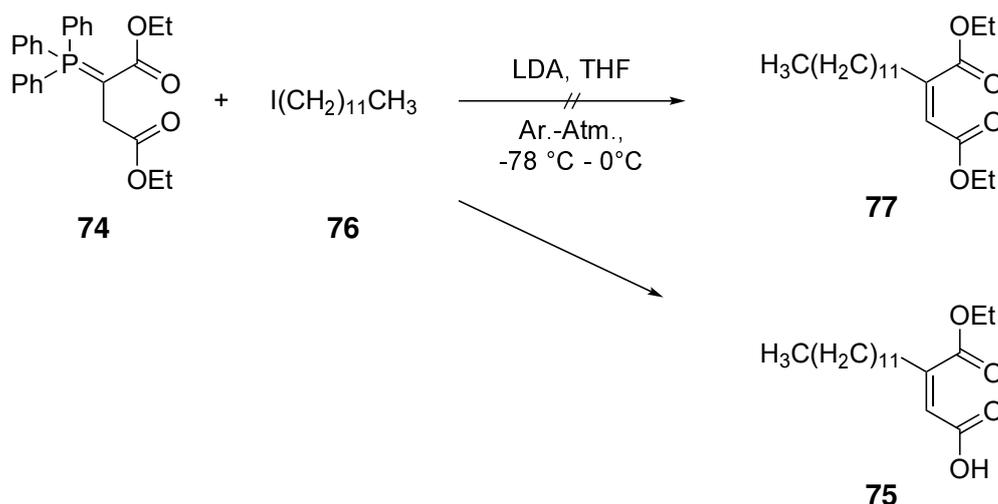


Abb. 4.19.: Die Umsetzung von **74** mit LDA und Dodecyljodid (**76**) ergab nicht das erwartete Produkt **77**, sondern das einfach entschützte Produkt **75**.

Laut Vorschrift sollte der doppelte Ester **77** erhalten werden, konnte aber im NMR nicht nachgewiesen werden. Auch das Proton an der Doppelbindung des Fumarsäurederivats war im NMR nicht vorhanden.

Neben der Methode nach COOKE wurde eine weitere nach MAURY *et al.* untersucht.^[172] Der Ansatz beruht darauf, Diethylacetylendicarboxylat (**78**) mit einem Alkyljodid und Diethylzink umzusetzen. Wie zuvor wurde die Synthese mit Dodecyljodid (**76**) durchgeführt, um eine lange Alkylkette in die Fumar- bzw. Maleinsäure einzuführen (siehe Abb. 4.20).

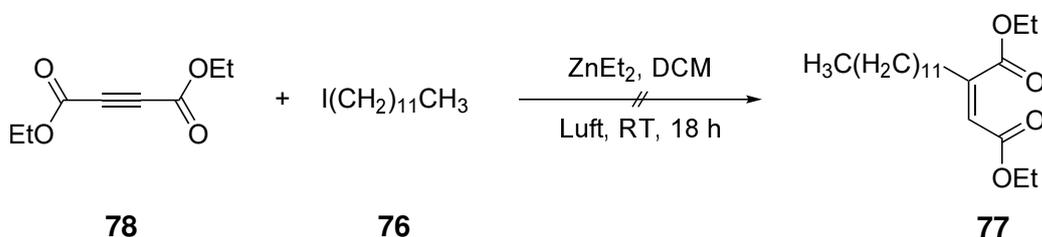


Abb. 4.20.: Die Umsetzung von **78** mit ZnEt_2 und Dodecyljodid (**76**) unter vorsichtigem Einleiten von Luft ergab ebenfalls nicht das erwartete Produkt **77**.

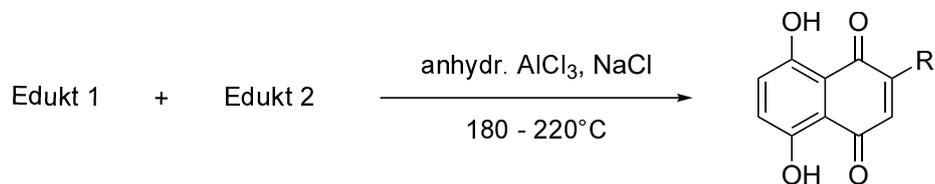
Der postulierte Mechanismus besagt, dass die Reaktion über einen Radikalmechanismus verläuft. Gestartet von Luftsauerstoff in Verbindung mit Diethylzink (ZnEt_2), wird der Alkylrest des Alkyljodids an die Dreifachbindung addiert.^[172] Das resultierende Produkt nach Durchführung war ebenfalls nicht das erwünschte **77**, sondern das Ethyladdukt **61**. Anstelle des Iodalkyls addierte sich eine Ethylgruppe der Organozinkverbindung.

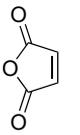
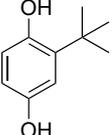
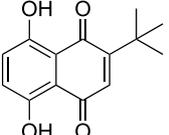
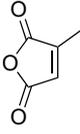
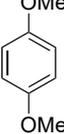
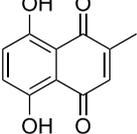
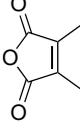
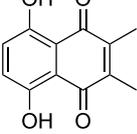
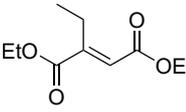
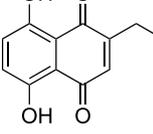
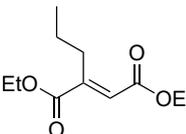
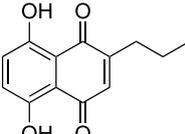
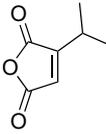
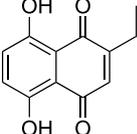
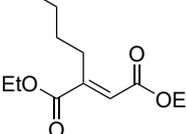
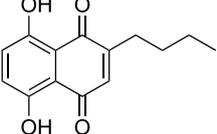
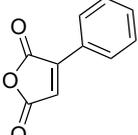
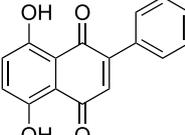
4.3.2. Synthese der Zielverbindungen

Um die gewünschten Naphthazarinderivate zu erhalten, wurde für die doppelte FCA eine Vorschrift von ELÖVE *et al.* verwendet, die eine modifizierte Version der ursprünglichen Variante darstellt.^[173] Variiert wurden jeweils die eingesetzten Edukte, da diese mitunter kommerziell erhältlich waren.

In Tab. 4.2 sind die synthetisierten Endverbindungen aufgelistet.

Tab. 4.2.: Die Bildung der Naphthazarinderivate geschah nach einer Vorschrift von ELÖVE *et al.*.



#	Edukt 1	#	Edukt 2	#	Produkt	Ausbeute (%)
38		79		80		2
81		45		82		15
83				84		7
61				85		8
63				86		11
87				88		4
64				89		13
90				91		21

Die Ausbeute zeigte sich in allen durchgeführten Reaktionen als sehr gering. Die Vorschriften wurden hauptsächlich aber nur einmal durchgeführt, da immer genug Menge an Substanz für eine biologische bzw. physiko-chemische Testung erhalten werden konnte. Mit Anpassungen der Synthesebedingungen ließen sich die Ausbeuten steigern. Neben den hier gezeigten Derivaten wurden auch drei aminosubstituierte Naphthazarine hergestellt. Die Reaktionen und ihre Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt 4.3.3 dargestellt.

Auch das langkettige Maleinsäurederivat **75** wurde versucht, zum Zielprodukt umzusetzen. Bisher wurde jedoch kein Produkt erhalten. Möglicherweise behindert die große sterische anspruchsvolle Alkylkette die Acylierung am Aromaten, sodass diese nicht vollständig oder gar nicht ablaufen kann. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen und möglicherweise Anpassungen der Reaktionsbedingungen der Zielsynthese.

4.3.3. Aminierung des Naphthazaringerüsts **12**

Nach erfolgreicher Synthese des 2-Dimethylamino-naphthazarin (**92**), durchgeführt von Sascha Koller im Rahmen seines Forschungspraktikums (siehe Abschnitt 4.3.4), wurden zwei weitere Aminoderivate nach dieser Vorschrift synthetisiert (siehe Abb. 4.21).

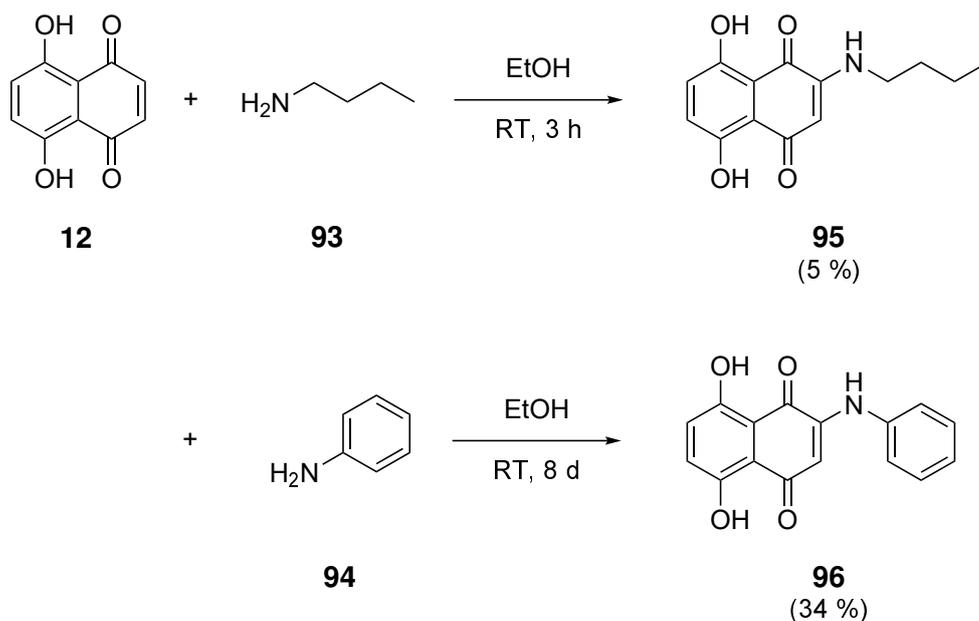


Abb. 4.21.: Aus Naphthazarin (**12**) wurden unter Zugabe der primären Amine Butylamin (**93**) und Anilin (**94**) die an 2-Position substituierten Derivate **95** und **96** erhalten.

Unter einfachem Rühren bei RT konnten aus Naphthazarin (**12**) und den primären Aminen Butylamin (**93**) und Anilin (**94**) die Derivate **95** und **96** dargestellt werden.^[156] Lediglich die Aufarbeitung war mit einem Ausbeuteverlust behaftet, da bei der säulenchromatografischen Trennung der Fraktionen ein starkes *tailing* beobachtet wurde. Das nicht reagierte Edukt Naphthazarin (**12**) war dadurch schwer zu entfernen. Auch kommt es bei der Aminierungsreaktion zur Bildung von Nebenprodukten, die zum Teil auch die Substitution einer Hydroxylgruppe in Position 5 oder 8

beinhalten.^[174] Für zukünftige Testungen könnten die Aminoderivate interessante Verbindungen darstellen, da durch sie eine erhöhte Hydrophilie in das Molekül eingeführt wird. Desweiteren bestünde die Möglichkeit das Salz der Amine zu bilden, um die Wasserlöslichkeit, falls erforderlich, noch weiter zu steigern.

UV/Vis-Messung der Zielverbindungen

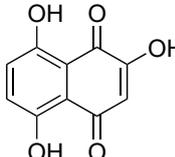
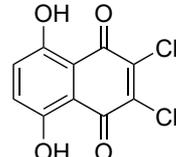
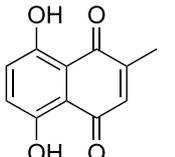
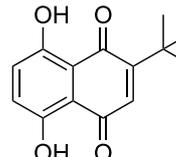
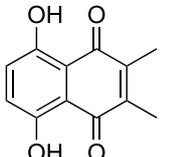
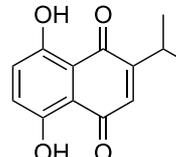
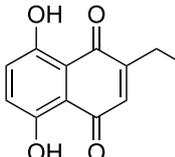
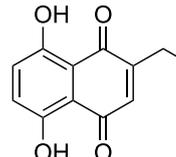
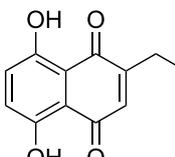
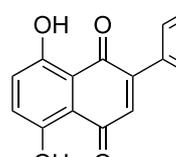
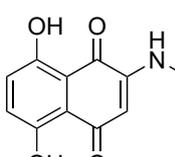
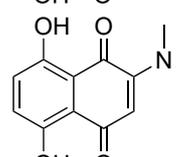
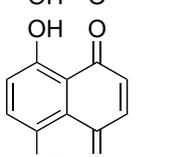
Auch die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Naphthazarinderivate (Zielverbindungen) wurden in einer UV/Vis-Messung untersucht, um die benötigte Anregungswellenlänge von über 500 nm zu bestätigen. Bis auf geringe Abweichungen lagen fast alle untersuchten Verbindungen im erwarteten Bereich. Die ermittelten Absorptionen λ_{ex} sind in der nachfolgenden Tab. 4.3 abgebildet. Am auffälligsten war 5-Amino-8-hydroxy-1,4-naphthochinon (**97**), das als Nebenprodukt in der Naphthazarinsynthese (siehe Abschnitt 4.2.1^[152]) isolierbar war oder direkt aus Naphthazarin dargestellt werden kann^[175]. Es besitzt ein Absorptionsmaximum von 571 nm (DMSO/H₂O, siehe Abschnitt 9.2.2). Zu erklären ist dies vermutlich dadurch, dass die Aminogruppe einen größeren elektronenschiebenden Effekt aufweist als die in dieser Position sonst vorhandene Hydroxylgruppe. Zeitgleich besitzt die Gruppe die Möglichkeit, ähnlich zum Naphthazaringerüst **12**, eine Wasserstoffbrückenbindungen zur Ketogruppe des chinoiden Rings auszubilden. Die Ausdehnung der Absorptionsbande erstreckt sich bis in den Bereich von über 600 nm und liegt damit bereits in dem Bereich des bio-optischen Fensters (600-900 nm).^[80]

Zusätzlich zur Bestimmung der maximalen Absorptionen wurden die Verbindungen anschließend wie in den IC₅₀-Bestimmungen gegen die Pathogene *C. albicans* und *T. rubrum* (siehe Abschnitt 3.3) für 10 min mit Licht einer Wellenlänge von 519 nm (siehe Experimenteller Teil, Abschnitt 9.3) bestrahlt. Die deutlichsten Änderungen erfuhren die Spektren der alkylsubstituierten Derivate (**82**, **88**, **85**, **86**, **89**, **20**). Hier ist eine deutliche Abnahme der Absorptionsbande im sichtbaren Bereich zu vermerken. Die Verbindungen scheinen durch die Bestrahlungen chemisch verändert zu werden. Denkbar sind hier intermolekulare [2,2]-Photoadditionen. Eine weitere Möglichkeit ist die Reaktion der angeregten Moleküle mit dem eingesetzten Lösungsmittel DMSO oder H₂O. Durch die Abnahme der Absorptionsbanden wird eine mehrmalige Aktivierung der Substanzen in Hinsicht auf die spätere Anwendung nicht möglich sein.

4.3.4. Optimierungsversuche der FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung

In der Literatur wurde bisher wenig über Optimierungsversuche der Naphthazarinsynthese veröffentlicht. Wahrscheinlich wurde zu Gründen der Geheimhaltung das meiste Material zurückgehalten, denn fast alle Vorschriften standen unter Patentschutz. Die damals führenden Firmen sicherten sich auf diese Weise ihre Vorteile.^[144] Durch schwindendes Interesse an Naphthochinonverbindungen wurde auch nach Ablauf der Patentrechte diese Optimierungsschritte nicht nachgeholt. In modernen Forschungen werden für die Synthese des Grundgerüsts die Vorschriften von HUOT und BRASSARD bzw. ZAHN und OCHWAT verwendet. Optimierungsversuche wie beispielsweise den Austausch der eingesetzten Schmelze und damit auch der verwendeten Lewissäure,

Tab. 4.3.: Absorptionsmaxima λ_{ex} der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Naphthazarinderivate gemessen in DMSO. Die Werte sind in nm angegeben.

#	Struktur	λ_{ex}	#	Struktur	λ_{ex}
25		483	44		504
82		524 561 sh	80		526
84		491 556 sh	88		481
85		508 561 sh	86		498 sh 523 556 sh
89		484 sh 523 562 sh	91		534
95		504	92		492
36		571			

sind nicht zu finden. Daher wurde dieses Thema Gegenstand für Untersuchungen im Rahmen des Fortgeschrittenen Praktikums des Studiengangs Master-Chemie (F3).

Fortgeschrittenen Praktikum (F3) von Sascha Koller

Von Sascha Koller wurde zeitgleich zu dieser Arbeit im Rahmen des Praktikums die Syntheseroute zum geschützten Grundgerüst des Naphthazarins **48** (siehe Abb. 4.12) durchgeführt. Es sollte

ebenfalls in anschließenden Reaktionen zu einem an Position 2 substituierten Produkt umgesetzt werden. Die Synthese zum 2-Bromnaphtho[1,8-de;4,5-d,e]bis-1,3-dioxin (**48**) wurde erfolgreich beendet, konnte jedoch anschließend aus zeitlichen Gründen nicht weiter umgesetzt werden.

Desweiteren testete Sascha Koller im zweiten Teil des Praktikums die von ZHANG *et al.* veröffentlichte Vorschrift zur Synthese von 2-aminosubstituierten Naphthazarinen.^[156] In Abb. 4.22 ist das Reaktionsschema gezeigt.

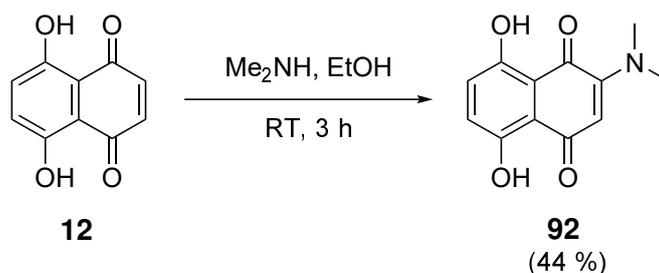


Abb. 4.22.: Naphthazarin (**12**) lässt sich durch Zugabe von Aminen in 2-Aminoderivate überführen. Gezeigt ist das Beispiel unter Verwendung von Dimethylamin.

Hierfür wurde Naphthazarin (**12**) zusammen mit Dimethylamin in Ethanol bei RT gerührt. Das im Anschluss aufgereinigte Produkt wurde mit einer Ausbeute von 44 % erhalten. Das Produkt wurde später in biologischen Testungen untersucht.

Fortgeschrittenen Praktikum (F3) von Joana Baier

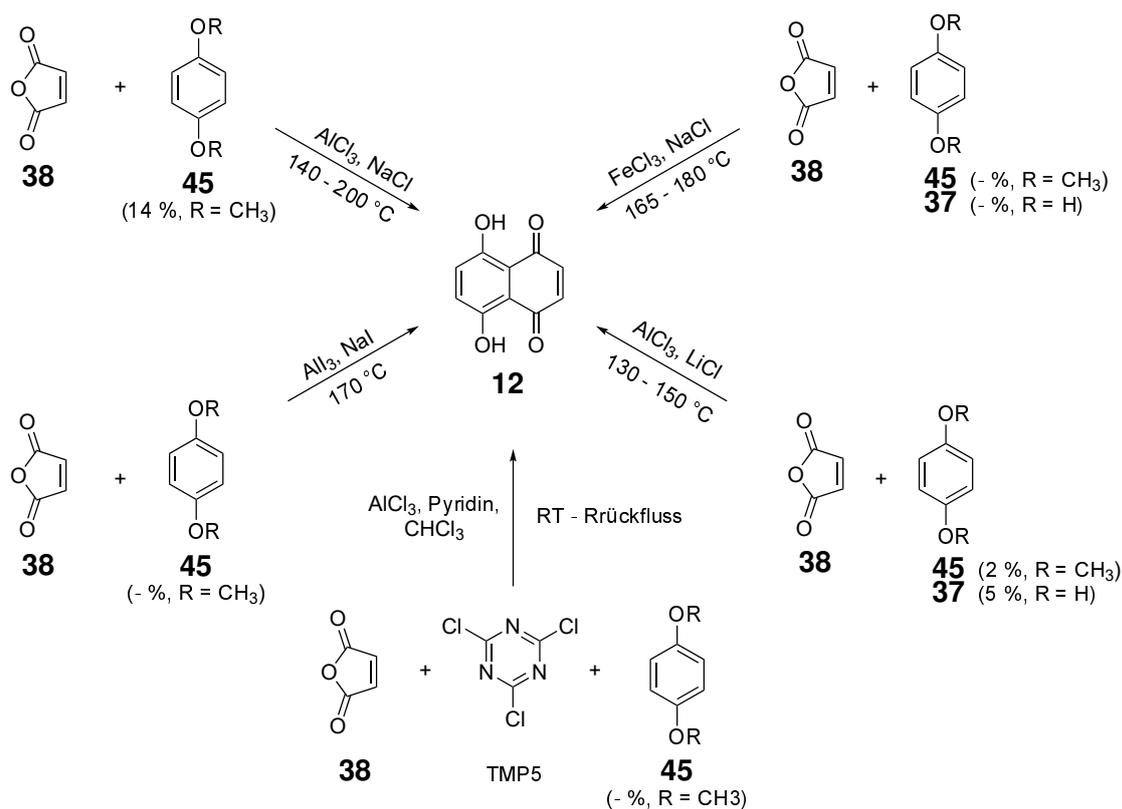
Um die zuvor beschriebenen schlechten Ausbeuten zu adressieren, wurden Optimierungen der Synthesen getestet. Als Ausgangspunkt diente die Methode basierend auf der doppelten FCA, die typischerweise bei hohen Temperaturen durchgeführt wird. Mit Hilfe von Anpassungen sollten mildere Bedingungen für die Schmelze gefunden werden. In bisherigen Veröffentlichungen wurden keine anderen eutektischen Gemischen als Varianten genannt. Denkbar wären weitere Gemische aus sowohl Aluminiumchlorid als auch anderen vergleichbaren Lewis-Säuren mit Salzen.^[176]

Neben dem bereits bekannten $\text{AlCl}_3/\text{NaCl}$ -Gemisch wurden $\text{AlCl}_3/\text{LiCl}$, AlI_3/NaI und $\text{FeCl}_3/\text{NaCl}$ in der Synthese nach ZAHN und OCHWAT eingesetzt. Das Ziel war es, zu untersuchen, ob die Reaktion bei milderen Bedingungen ebenfalls stattfindet oder sogar eine höhere Ausbeute liefern kann. Die Gemische sind in der nachfolgenden Tab. 4.4 mit ihren Verhältnissen und ihren Schmelztemperaturen angegeben.

Tab. 4.4.: Die Schmelztemperaturen der eingesetzten Lewissäuren mit verschiedenen Alkalisalzen als eutektische Gemische.

Gemisch	Zusammensetzung [%]	Schmelztemperatur [°C]
AlCl ₃ /NaCl	61 : 39	108 ^[157]
AlCl ₃ /LiCl	58 : 42	105 ^[176]
FeCl ₃ /NaCl	53 : 46	158 ^[177]
AlI ₃ /NaI	70 : 30	123 ^[176]

Die durchgeführten Reaktionen und ihre Ausbeuten sind in der nachfolgenden Syntheseübersicht 4.23 abgebildet. In allen Synthesen wurde die Vorschrift nach ZAHN und OCHWAT eingesetzt. Nur Reaktion 3 wurde nach einer Arbeit von KANGANI *et. al* vorgenommen.^[178] Der Mechanismus beruht darauf, dass durch Cyanurchlorid (**98**) aus dem Maleinsäurederivat **60** *in situ* ein Carbonsäurechlorid erzeugt wird, das direkt mit AlCl₃ für die doppelte FCA aktiviert wird.

**Abb. 4.23.:** Übersicht über die verschiedenen Ansätze zur Synthese von Naphthazarin (**12**). Auch die verschiedenen eutektischen Gemische führten zu keiner Optimierung der Synthese.

Leider führten die oben erwähnten eutektischen Gemische verschiedener Lewissäuren und Al-

kalisalze zu keiner Ausbeutensteigerung. In vielen Fällen wurde keine Reaktion zum Produkt beobachtet. Die Aufarbeitung und Charakterisierung des Produkts von Reaktionen 2 führte zum Produkt einer einfachen FCA mit einer Ausbeute von 42 % (vgl. Verbindung **39** bzw. **41**, Abb. 4.7). Da es sich bei der Lewissäure wie in der Originalsynthese um AlCl_3 handelt, ist es nicht verwunderlich, dass die Reaktion im Sinne der FCA abläuft und zumindest das Zwischenprodukt **39** bzw. **41** bildet.^[153] Das Fehlen der zweiten Acylierung ist möglicherweise auf die geringe Temperatur von nur maximal 150 °C zurückzuführen, sodass eine Reaktion unter milden Bedingungen nicht vollständig ablaufen kann.

Kapitel 5.

Permeationsverhalten der Naphthazarinderivate in Keratin

Die für den Erfolg eines topischen Antimykotikums in der Behandlung der Onychomykose essentielle Keratinophilie ist wie eingangs unter Abschnitt 1.2 beschrieben die primäre Eigenschaft eines Moleküls. Die biologische Wirksamkeit hängt von verschiedenen Faktoren wie Darreichungsform, Temperatur und Zusammensetzung des für die Untersuchung verwendeten Keratins ab. Bisher wurde keine universelle Methodik entwickelt, um die Keratinophilie einheitlich und nach festgelegten Standards zu bestimmen. Die 1997 von MERTIN und LIPPOLD eingeführte FRANZ-Zellen-Diffusion ist zwar kein offizieller Standard (siehe Abschnitt 1.3), jedoch setzte sie sich rasch als das am weitesten verbreitete Nagelmodell durch. So können Informationen über einen potenziellen Wirkstoff zur Permeation durch Keratin erhalten werden.^[52,59,179,180]

5.1. Permeationsmodell: FRANZ-Diffusionszellen

Um die Naphthazarine im Nagelmodell der FRANZ-Diffusionszelle mit den von MERTIN und LIPPOLD in der Originalvorschrift verwendeten Antimykotika vergleichen zu können, wurden die dort eingesetzten Versuchsp Parameter weitestgehend übernommen.^[52] So auch die Verwendung des PBS-Puffer/Ethanol-Gemisches als Donor- und Akzeptormedium und die Verwendung der Membranen aus Rinderhufkeratin. Da die kommerzielle Bedeutung dieser Membranen nicht hoch ist, können sie nicht über den Handel bezogen werden und wurden selbst angefertigt. Für die Herstellung wurden die Sohlen schlachtfrischer Rinderhufe in Blöcke gesägt (siehe 9.2.3). Durch die Größe und den daraus resultierenden Aufbau der FRANZ-Zellen (ca. 8 mL Volumen) ergab sich für die Membranen ein Durchmesser von 25 mm, sodass die Keratinblöcke eine Kantenlängen von über 30 mm aufweisen mussten. Durch Einlegen in ddH₂O wurde das Keratin für die Weiterverarbeitung bearbeitbar gemacht. Anschließend wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms 100 µm starke Schnitte am hydrierten Keratin angefertigt, um die Membranrohlinge zu erhalten, die zuletzt durch Ausstanzen mit einem Locheisen in die runde Membranform überführt wurden.

Zur Etablierung der Methode, wurde der Vorschrift von MERTIN und LIPPOLD folgend der Permeabilitätskoeffizient P_H^i von Ciclopirox (**99**) bestimmt. Mit einem aus neun einzelnen FRANZ-

ⁱ P_H steht für *horn membrane*, also der Permeabilitätskoeffizient für die Rinderhufmembranen.

Zell-Messungen gemittelten Wert von $2.15 \pm 0.26 \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ konnte der Literaturwert von $2.13 \pm 0.65 \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ reproduziert werden.^[52]

Um P_H für Naphthazarin (**12**), dem unsubstituierten Naphthazarinringgerüst als Referenzstandard für diese Substanzgruppe, zu ermitteln, wurden für den Start der Diffusionstestung fünf FRANZ-Zellen, wie in Abb. 1.3 (siehe Abschnitt 1.2) dargestellt, zusammgebaut. Im ersten Schritt erfolgte das Einfüllen des Akzeptormediums (PBS-Puffer/Ethanol-Gemisch, 42 %-v/v, pH 8.1). Die Membranen wurden danach so auf den geschliffenen Glasrand des Akzeptorkompartments gelegt, dass sich in der Öffnung zum Akzeptormedium keine Luftblasen bildeten. Nach Auflegen und Festklemmen des Donorkompartments wurde die Apparatur bei einer Temperatur von 32 °C für etwa 15 min equilibriert und die Donorlösung eingefüllt. Diese bestand aus Naphthazarin (**12**) gelöst im Akzeptormedium.

Trotz Abdichten des Donorkompartments und des Glasrohrs (Probenentnahme) mit Parafilm[®], kam es durch Verdunstung des Mediums zu Luftblasenbildung unter den Membranen. Ein Beispiel dafür ist in der nachfolgenden Abb. 5.1 an Hand einer zuvor durchgeführten Diffusionstestung (Ciclopirox (**99**), siehe Anhang Abschnitt A.2) zu sehen.



Abb. 5.1.: Abgebildet ist eine FRANZ-Zelle während eines Diffusionsexperiments. Durch Verdunsten des Akzeptormediums kam es zur Bildung von Luftblasen unter der Membran, die die Diffusionsfläche verringerten.

Um die daraus resultierende verkleinerte Diffusionsfläche wieder zu vergrößern, wurden die Zellen vorsichtig gedreht, damit die Blasen über das Glasrohr (Probenentnahme) entweichen konnten.^[181] Für die Probenentnahme wurden 100 μL mit Hilfe einer langen Kanüle und Spritze entnommen und per HPLC vermessen. Neben der HPLC-Analytik erwies sich auch die visuelle Kontrolle auf Färbung des Akzeptormediums (vgl. Ph. Eur. 10.3/2.2.2) als zuverlässiger Indikator für eine erfolgte Diffusion der stark färbenden Testsubstanz **12** durch die Keratinmembranen.

Da auch nach über 20 h Experimentzeit und durch visuelle Kontrolle keine Färbung des jeweiligen Akzeptormediums festgestellt wurde und auch in den Chromatogrammen der HPLC keine Substanz nachgewiesen wurde, wurde die Messung beendet. Die eingesetzten Keratinmembranen zeigten durch das applizierte Naphthazarin eine durchgängig intensive Färbung auf. Eine beispielhafte Membran ist in Abb. 5.2 dargestellt.

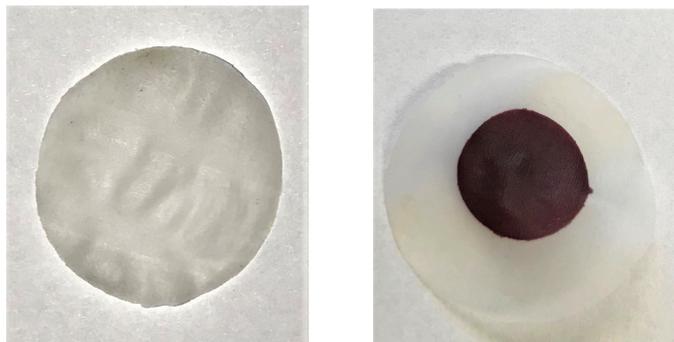


Abb. 5.2.: **Links:** Abgebildet ist eine unhydrierte Keratinmembran vor der FRANZ-Zellen-Testung. **Rechts:** Eine Keratinmembran nach der FRANZ-Zellen-Testung unter Verwendung des Wirkstoffs Naphthazarin (**12**) als Modellsubstanz. Die Membran wurde mit diversen Lösungsmitteln gewaschen und gerührt (> 1 h). In der Mitte ist die Färbung zu sehen, die auch durch verschiedene Lösungsmittel nicht entfernt werden konnte.

Auch durch das Waschen und Rühren mit verschiedenen Lösungsmitteln (Aceton, Methanol, DCM und Ethylacetat) für längere Zeit (> 1 h), wie es von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Extraktion durchgeführt wurde, wurde die Färbung aus den Membranen nicht entfernt.^[57,182] Die für die Extraktion verwendeten Lösungsmittel wiesen im Anschluss keine Verfärbung auf. Auffällig war die violette Farbe des Wirkstoffs **12** im Keratin. Diese farbliche Veränderung wird in Abschnitt 5.3 näher diskutiert.

Die durch dieses Experiment nachgewiesene Keratinophilie des NaphthazarinGrundgerüsts **12** entspricht dem beschriebenen Verhalten des Henna-Farbstoffs (Lawson (**16**)) in der Haut bzw. in den Haaren.^[183] Die Anreicherung im Keratin und die Tatsache, dass die Naphthochinone in Wasser weitgehend unlöslich sind, lässt den Rückschluss zu, dass unter den verwendeten Diffusionsbedingungen das Naphthazarin in das Keratin eindrang, sich dort anreicherte und auch im Keratin verblieb. Es diffundierte nicht in das unter der Keratinschicht befindliche Akzeptormedium. Daher ist davon auszugehen, dass bei einer Applikation der Testsubstanzen wie Naphthazarin (Naphthazarin) oder Deoxyshikonin (**20**) am humanen Nagel eine Sättigung des Keratins bzw. des Nagels stattfindet, die Substanzen jedoch nicht in nennenswertem Ausmaß in das darunterliegende Nagelbett gelangen. Das führt den Vorteil mit sich, dass die Auswahl der Hitsubstanz nicht von der generellen Toxizität abhängig ist, sondern die Substanz gewählt werden kann, die unter Kap. 6 die beste antimykotische Wirkung nach Photoaktivierung zeigt.

5.1.1. Miniatur-FRANZ-Zellen

Neben der in der Literatur verbreiteten Bauform der FRANZ-Diffusionszellen (siehe Abschnitt 1.3), wurden auf Grund der bereits genannten fehlenden Standards diverse Anpassungen vorgenommen.^[50,181,184]

An Stelle des handgefertigten Glasgeräts bestehend aus Donor- und Akzeptorkompartiment wurden HPLC-Vials verwendet. Angelehnt an eine Vorschrift von ELEZOVIC *et al.* wurden die Vials an sich als Akzeptorkompartiment eingesetzt und mit Puffer-Lösung befüllt (DPBS-Puffer) und der Deckel, der eine Öffnung für die Probenadel der HPLC besitzt, als Donorkompartiment.^[50,185] Statt eines Septums wurden die Rinderhufmembranen (300 μm Dicke) vor dem Zudrehen zwischen Glas und

Deckel gelegt und eingeklemmt. In der nachfolgenden Abb. 5.3 ist ein Beispiel abgebildet.

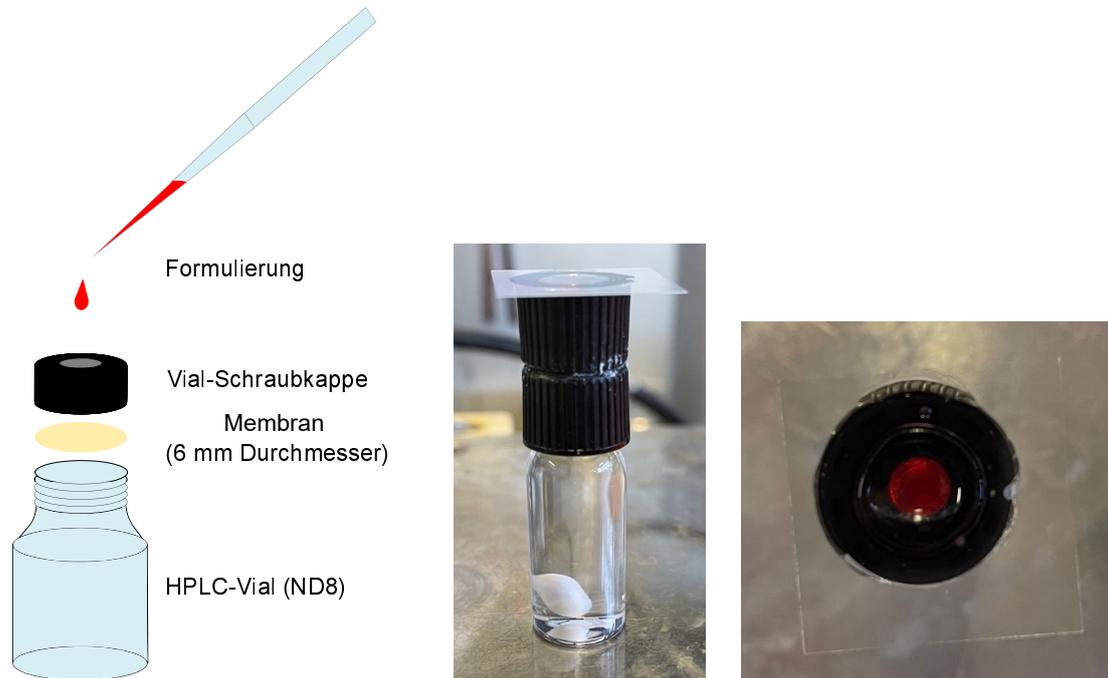


Abb. 5.3.: Links: Schematische Darstellung einer Miniatur-FRANZ-Zelle (MiniFZ). Mitte: Abbildung einer zusammengebauten MiniFZ mit einem zusätzlichen Deckelaufbau für flüssige Formulierungen. Rechts: Draufsicht der zusammengebauten MiniFZ mit eingefüllter Wirkstoffformulierung (Deoxyshikonin (20)) und mit einem Deckplättchen.

Nach dem Zusammensetzen wurde oben in die Öffnung des Deckels die Formulierung auf die Membran gegeben und nach Trocknungszeit wurde die Zelle kopfüber bei 32 °C inkubiert. Die beiden Fotos in der Mitte und auf der rechten Seite zeigen eine modifizierte Varianten, in der auf den Deckel ein weiteres geklebt wurde, um auch Lösungen testen zu können. Gegen die Verdunstung wurde die Miniaturzelle mit einem Deckgläschen abgedichtet.

Die Ergebnisse der Messung am Keratinmodell zeigten wie im vorherigen Abschnitt 5.1 keine Permeation des Wirkstoffes in den Puffer. Die Kontrolle im Akzeptormedium wurde neben der HPLC-Analytik erneut visuell durchgeführt.

Der größte Vorteil an den Miniatur-FRANZ-Zellen (MiniFZ) ist, dass die Apparatur durch das Verschrauben keine undichten Stellen aufweist und kein Vorbeilaufen der Lösung oder Formulierung an der Membran erlaubt. Desweiteren kann auf eine Probenentnahme mit anschließendem Auffüllen des Akzeptormediums verzichtet werden, da die MiniFZ nach vorsichtigem Abschrauben des Deckels und Entfernen der Membran mit einem regulären HPLC-Vialdeckel versehen und vermessen wird. Die Membran kann direkt mit Lösungsmitteln von den Lackrückständen befreit werden und für eine anschließende Überprüfung der Eindringtiefe (siehe nachfolgenden Abschnitt 5.2) verwendet werden. So kann je nach Zeitpunkt der Probennahme ein zeitlicher Verlauf der Eindringtiefe ermittelt werden.

5.2. RAMAN-mikroskopische Untersuchungen

Die aus den Ergebnissen der FRANZ-Zell-Testung gewonnenen Erkenntnisse (vorheriger Abschnitt), dass das Naphthazarin (**12**) in die Keratinmembran eindringt, aber nicht in das Akzeptormedium diffundiert, führten zu der Frage nach dem Diffusionsverhalten des Wirkstoffes. Da eine Extraktion der Substanz aus den Keratinmembranen nicht möglich war, musste eine Analyseverfahren gefunden werden, die für die Charakterisierung von Oberflächen eingesetzt werden kann. Dies war erforderlich, um die Anwesenheit der diffundierten Substanz im Keratin nachweisen zu können.

Um die Beschaffenheit von Oberflächen und so auch die von Keratin zu untersuchen, stehen in der chemischen Analytik wenige Methoden zur Verfügung, die auch leichte Atome wie Sauerstoff oder Kohlenstoff nachweisen können. Eine Methode ist die RAMAN-Spektroskopie, mit der an Hand der sogenannten RAMAN-Streuung ein Schwingungsspektrum eines Moleküls gemessen wird.^[83]

Wird ein Molekül mit monochromatischem Licht bestrahlt (Laserlicht), kommt es in der Regel zur sogenannten RAYLEIGH-Streuung, bei der unter elastischem Stoß das Photon energetisch unverändert wieder hervorkommt. Der Prozess hinter diesem Stoß umfasst das Anregen von Valenzelektronen in einen virtuellen Schwingungszustand durch das auftreffende Photon und den Übergang in den Grundzustand durch Abgabe eines Photons identischer Energie. Ist das abgegebene Photon jedoch energieärmer (STOKES-Streuung), handelt es sich um einen inelastischen Stoß, der Schwingungen im Molekül anregt. Erhält das Photon zusätzliche Energie durch bereits in virtuellen Anregungszuständen befindliche Elektronen, liegt ein hyperelastischer Stoß (Anti-STOKES-Streuung) vor. Die aufgefangenen Photonen bilden das RAMAN-Spektrum.

Um für die Analytik geeignete Proben vorzubereiten, wurde ein in dieser Arbeit bisher noch nicht angewendetes Nagelmodell verwendet. Dabei wurde der humane Nagel durch eine 2 mm dicke Keratinmembran (0,5 x 1 cm, *bovines* Keratin) simuliert, die auf eine mit Wasser angefeuchtete Baumwolle (Baumwollgaze) gelegt wurde.^[182] Die Baumwolle stellte in dieser Anordnung das Nagelbett des menschlichen Fingers dar.^[57,182,186] Die Oberseite der Membranen wurden dann mit den jeweiligen Wirkstoffformulierungen versehen. Für die Hitsubstanz Deoxyshikonin (**20**) wurde eine selbsterstellte Formulierung verwendet, die der Formulierung des Arzneimittels Loceryl® nachempfunden wurde. Die Zusammensetzung ist in der nachfolgenden Tab. 5.1 gezeigt.

Als Referenzen für diesen Versuch dienten die kommerziell erhältlichen topischen Antimykotikaformulierungen Loceryl® und Ciclopoli®. Sie wurden unter gleichen Bedingungen wie die Testsubstanz **20** eingesetzt. In Abb. 5.4 A ist ein Beispiel für eine mit Deoxyshikonin-Formulierung versehene Membran abgebildet.

Tab. 5.1.: Zusammensetzung der selbsterstellten und angepassten Wirkstoffformulierung für Deoxyshikonin (20) für die Diffusionsuntersuchung am Keratin. Sie wurde angelehnt an die Formulierung des topischen Arzneimittels Loceryl®.

Inhaltsstoff	% (m/m)
Eudragit® RL PO	12.5
Ethanol	60
Ethylacetat	15
Butylacetat	5
Triacetin	2.5
Deoxyshikonin	5

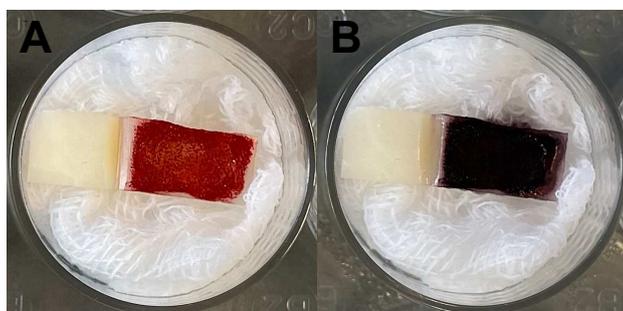


Abb. 5.4.: **A:** Abgebildet ist eine etwa 2 mm dicke Keratinmembran auf angefeuchteter Baumwollgaze und versehen mit Wirkstoffformulierung (Deoxyshikonin (20)). **B:** Die gleiche Keratinmembran nach fünf Tagen Einwirkzeit. Die Membran wies die gleiche Farbveränderung auf, wie in Abschnitt 6.4.2 beschrieben wurde.

Nach einer zuvor definierten Zeitspanne von fünf Tagen Einwirkzeit wurde das Diffusionsexperiment beendet. Die mit Wirkstoffformulierung des Deoxyshikonins (20) versehene Membran wies eine sichtbare Farbveränderung auf (siehe Abb. 5.4 B). Diese Veränderung beruht wie in Abschnitt 6.4.2 beschrieben auf einer Reaktion des Naphthazarinderivats 20 mit dem filmbildenden Polymer. Erst später im Verlauf der Arbeit wurde die Zusammensetzung der eingesetzten Lacke auf eine Nitrocellulose-basierte Variante geändert (siehe Abschnitt 6.4.4), die zu keinerlei Interaktionen mit der Substanzklasse führte.

Bevor die Keratinmembranen mit dem RAMAN-Mikroskop semiquantitativ vermessen werden konnten, wurden sie zunächst von den Lackrückständen befreit. Anders als in den Versuchen anderer Veröffentlichungen wurde nicht der Gehalt der Wirkstoffe im Keratin bestimmt, sondern die maximale Eindringtiefe.^[182,187] Durch das Anfertigen von Querschnitten der Keratinmembranen wurde die jeweilige Eindringtiefe der Wirkstoffe anhand des nachfolgenden Messschemas ermittelt (siehe Abb. 5.5). Die Messreihe beginnt nahe der Oberfläche, wo die Formulierung zuvor aufgetragen war, am Punkt 1.0. In Abständen von jeweils 50 μm wurden zwei weitere Punkte in horizontaler Linie parallel zum Rand des Keratins aufgenommen (1.1; 1.2). 10 μm senkrecht nach unten zur

gedachten Linie auf Höhe von 1.2 wurde Punkt 2.0 gemessen. Analog zur ersten Reihe wurden auch hier die Punkte 2.1 und 2.2 erfasst. Pro Tiefenabschnitt der Keratinmembran wurden auf diese Weise Reihen mit jeweils drei Messpunkten aufgenommen und bis in eine Tiefe von $> 170 \mu\text{m}$ verfahren.

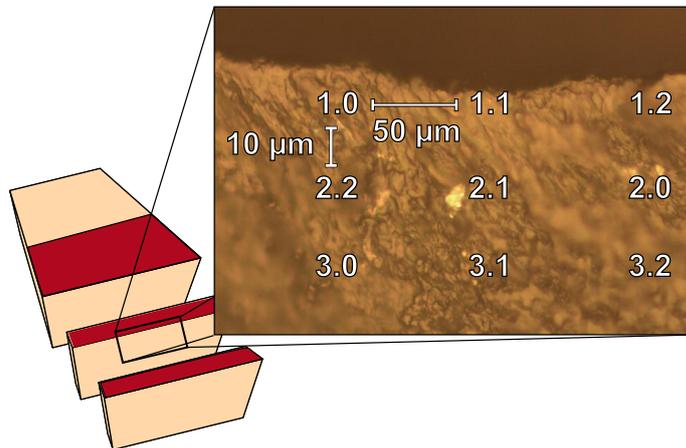


Abb. 5.5.: Mikroskopische Aufnahme eines Keratinquerschnitts. Eingezeichnet ist das Schema, nach dem die Messungen durchgeführt wurden. Die Messreihe begann am oberflächennahen Punkt 1.0 und wurde dann in der angezeigten Folge an weiteren zwei horizontalen Messpunkten im Abstand von jeweils $50 \mu\text{m}$ an der Oberfläche wiederholt (1.1; 1.2). Die nächsten Messpunkte 2.0, 2.1 und 2.2 erfassten dann jeweils einen entsprechend vertikal gelegenen $10 \mu\text{m}$ tieferen Bereich. Das Verfahren wurde wiederholt, bis Keratinbereiche in einer Tiefe von $> 170 \mu\text{m}$ erfasst waren.

Die Messungen wurden pro Position einmalig durchgeführt. Für die Messung der Abstände sowohl in der x- als auch in der y-Ebene wurde die Skala des Mikroskops, sowie die Funktion der automatischen Steuerung der Software (OPUS 7.2, Bruker) verwendet. Die z-Ebene wurde für die Fokussierung der Probe manuell bedient. Die eingangs erwähnte *depth-profiling*-Funktion wurde in unseren Messungen nicht verwendet, da sich die Struktur des Keratins auf Grund von Streuungserscheinungen und möglichen Absorptionen nicht für die hier untersuchten Tiefen eignete. In anderen Arbeiten konnten für keratine Strukturen wie menschliche Haare (max. Tiefe $12 \mu\text{m}$) oder menschliche Haut (*stratum corneum*, $40 \mu\text{m}$) nur geringe Tiefen vermessen werden.^[188,189] Für die hier benötigten Tiefenbereiche ist die Methode des *depth profiling* daher nicht zielführend. In experimentellen Messungen an unbehandeltem Keratin wurden Abnahmen der Intensität mit steigender Eindringtiefe der Strahlung gemessen, sodass die Vermutung bestätigt wurde, dass das *depth-profiling* nicht verwendet werden konnte.

Die Ergebnisse der ramanmikroskopischen Untersuchungen sind in der nachfolgenden Abb. 5.6 dargestellt.

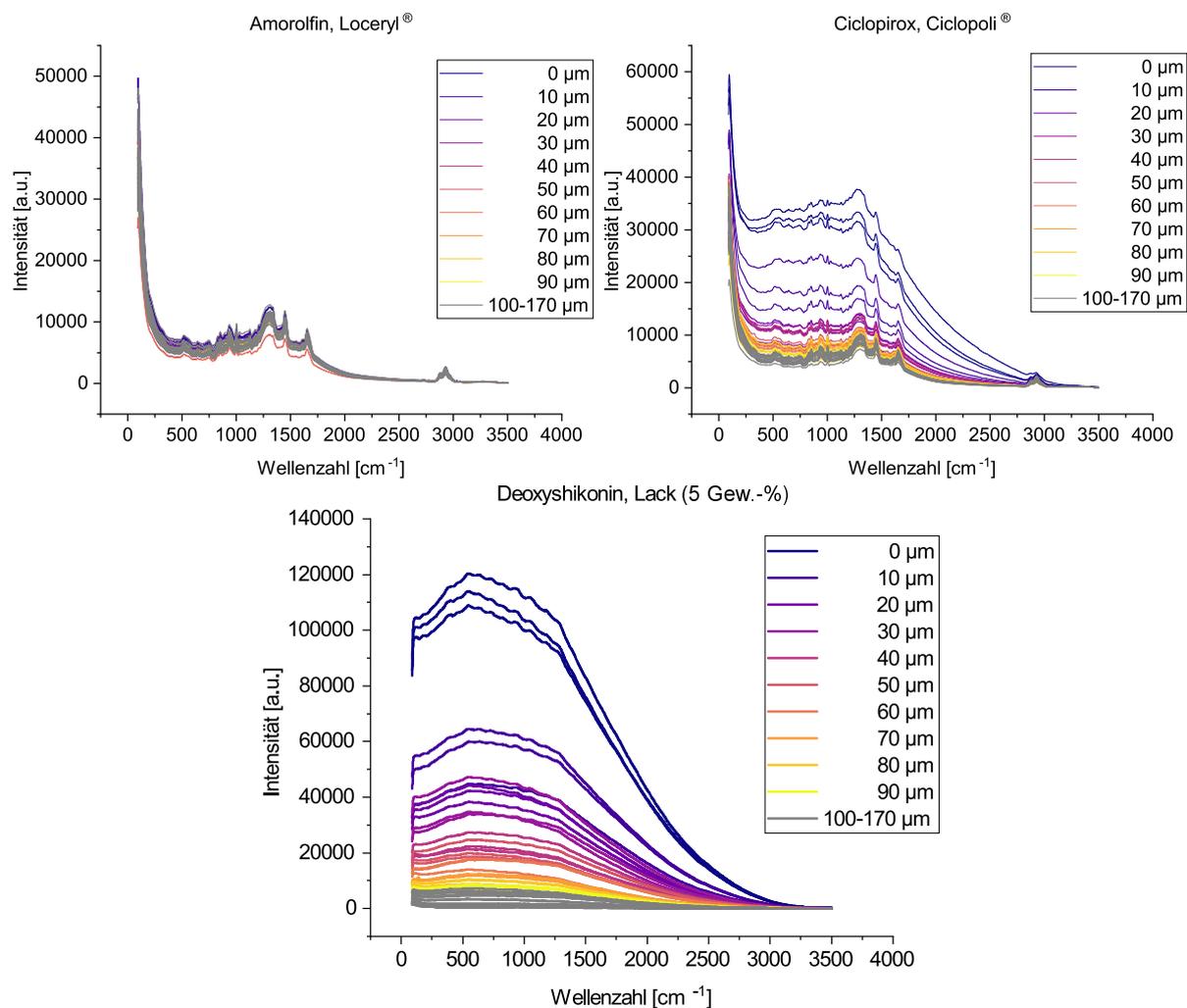


Abb. 5.6.: Ergebnisse der ramanmikroskopischen Untersuchungen von mit Wirkstoffformulierungen versehenen Keratinmembranen. Die oberen Graphen zeigen die RAMAN-Signale der Referenzen Loceryl® (Amorolfin (100)) und Ciclopoli® (Ciclopirox (99)), der untere die der Hitsubstanz Deoxyshikonin (20).

Die Ergebnisse der Messungen zeigten keine direkten Signale der Wirkstoffe Amorolfin (100), Ciclopirox (99) und Deoxyshikonin (20) im Keratin. Vielmehr handelte es sich um eine Überlagerung der Wirkstoffsignale mit den Keratinsignalen der verschiedenen Aminosäuren. Ihre Gesamtabnahme wurde erfasst und ausgewertet. Eine Zuordnung spezifischer Signale war nicht möglich.

Die für das Deoxyshikonin (20) ermittelten Spektren unterschieden sich neben der Überlagerung durch das Keratin von denen, die von der Reinsubstanz bestimmt wurden (siehe Anhang Abschnitt A.3). Anstelle der typischen RAMAN-Schwingungssignale wurde das Signal einer starken Fluoreszenzemission nachgewiesen, die andere überdeckte.

Kommt es bei der Bestrahlung der Probe mittels monochromatischem Laser zu einer Absorption, wie es im Falle des Deoxyshikonins (20) geschah und dabei zu einer Anregung der Valenzelektronen, wird dieses als Resonanz-RAMAN-Effekt bezeichnet.^[83] Die zugrunde liegenden Prozesse sind in Abb. 5.7 zu sehen.

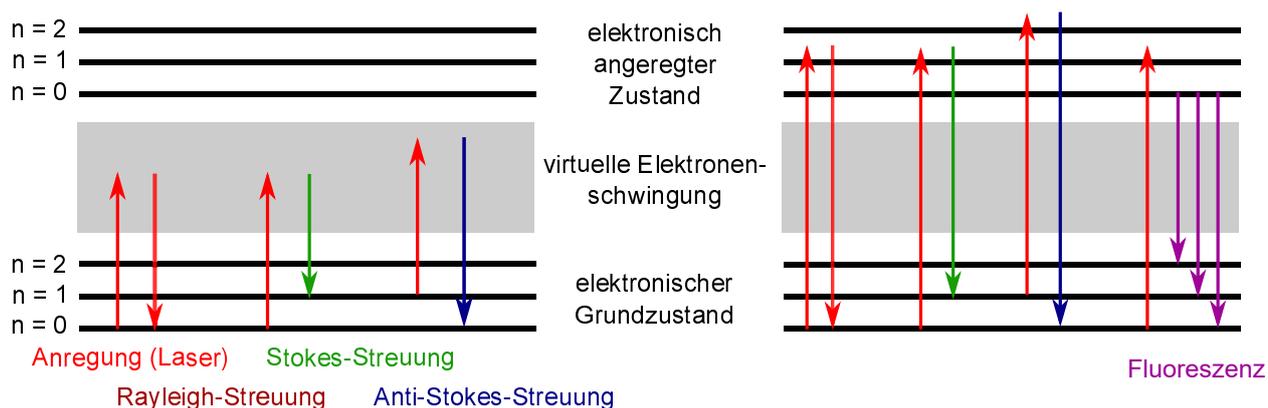


Abb. 5.7.: **Links:** Schematische Darstellung des RAMAN-Effekts. Durch inelastische Stöße kann RAMAN-Streuung detektiert werden. Diese setzt sich aus STOKES und Anti-STOKES-Streuung zusammen. **Rechts:** Der Resonanz-RAMAN-Effekt tritt an Stelle einer inelastischen Streuung ein, indem eine Absorption stattfindet. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung der RAMAN-Emissionslinien. Ein störender Nebeneffekt sind Fluoreszenzerscheinungen. Die Abbildungen wurden nach HESSE *et al.* erstellt und modifiziert.^[83]

Durch die Anregung in den elektronischen Anregungszustand findet ein Resonanz-RAMAN-Effekt statt. Neben einer Verstärkung der RAMAN-Linien wird auch Fluoreszenzstrahlung detektiert, die häufigerweise das RAMAN-Spektrum überlagern.

Für die Auswertung der Messung war dieser Effekt jedoch nicht relevant, da auch für **20** eine Abnahme der Signalstärke in Abhängigkeit zur Tiefe im Keratinstück nachgewiesen wurde.

Für die Anwendung der Arzneiform Loceryl® an den Keratinmembranstücken konnte kein Amorolfin-Wirkstoffsignal abweichend vom Basissignal des Keratins ermittelt werden. Somit ist eine entsprechende Eindringtiefe des Wirkstoffs Amorolfin (**100**) in das hier verwendete Nagelmodell nicht nachweisbar. Bei der Anwendung der Arzneiform Ciclopoli® hingegen konnte eine Eindringtiefe des Wirkstoffs Ciclopirox (**99**) von etwa 40 μm in das Nagelmodell gemessen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundene Hitsubstanz Deoxyshikonin (**20**) in der eigenen Formulierung (siehe Tab. 5.1) wies in diesem Nagelmodell jedoch eine Eindringtiefe von über 50 μm auf, was die Keratinophilie der Naphthochinone zusätzlich bestätigte.

Zu erwähnen ist ebenfalls, dass es sich bei der selbst hergestellten Formulierung noch nicht um eine final optimierte Rezeptur handelte. Neben der in diesem Experiment bereits nachgewiesenen natürlicherweise vorhandenen günstigen Pharmakokinetik der Naphthazarinderivate im Keratin-Kompartiment beinhaltet eine weiter optimierte Formulierung der Lacklösung ein weiteres Potential zur Erhöhung der Wirkstoffverfügbarkeit im Nagel. Damit einher geht ein insgesamt effektiveres Therapiekonzept am Patienten im Vergleich zur bestehenden Therapie.

5.3. Verhalten des Naphthazaringerüsts im Keratin

Die Derivate des Naphthazarins (**12**) sind in Lösung stark färbende Substanzen. In Lösungsmitteln wie Aceton, DCM oder Ethylacetat zeigen sie eine tiefrote Farbe. Wird **12** jedoch mit einer wässrig-alkalischen Lösung versetzt, tritt ein Farbumschlag in eine tiefblaue Färbung ein. Die ersten Beobachtungen zur Verfärbung von Naphthazarin (**12**) im Rahmen dieser Arbeit traten in der

unter Abschnitt 5.1 durchgeführten Permeationstestung unter Verwendung der FRANZ-Zellen auf. Der Grund lag im verwendeten Medium der Vorschrift von MERTIN und LIPPOLD. Es wurde aus PBS-Puffer und Ethanol hergestellt und wies einen pH-Wert von 8.1 auf. Dieser schwach basische pH-Wert führte beim Lösen von **12** zu einer Farbänderung von der normalerweise rot-gefärbten zu einer rot-violetten Lösung. Zu erklären ist dieser Farbumschlag mit der 1993 von IDRIS und SALEH für **12** untersuchten Säure-Base-Reaktion. Sie fertigten UV/Vis-Spektren für die Deprotonierung des NaphthazarinGrundgerüsts **12** in 50 % wässrigem Ethanol (%-v/v) mit steigendem pH-Wert an.^[112] Dabei beschrieben sie für die Absorption der protonierten Form **12** ein Absorptionsmaximum bei 505 nm. Die einfach deprotonierte Form **101** besaß ein Maximum bei 555 nm und die vollständig deprotonierte Form **102** eines bei 600 nm (siehe Abb. 5.8). Bereits ab einem pH-Wert von über 8.9 verschwindet die Bande des protonierten Naphthazarins (**12**) vollständig. Optisch macht sich dies durch die Verfärbung der Lösung von einem rot-violett in ein tiefes Blau bemerkbar. IDRIS und SALEH konnten so einen pK_s von 7.85 ± 0.05 für **101** und einen pK_s von 10.70 ± 0.05 für **102** ermitteln.

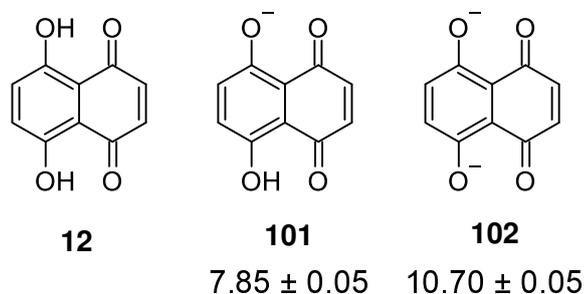


Abb. 5.8.: Abgebildet sind Naphthazarin (**12**) und seine deprotonierten Formen **101** und **102**. IDRIS und SALEH wiesen für die einfach deprotonierte Form **101** einen pK_a -Wert von 7.85 ± 0.05 und für die zweifach geladene Form **102** einen pK_a -Wert von 10.70 ± 0.05 nach.^[112]

Das Auftreten dieser hypsochromen Farbänderung während der Diffusionsuntersuchungen in den vorherigen Abschnitten (siehe Abschnitt 5.1 und 5.2) unter Verwendung der Wirkstoffe Naphthazarin **12** und Deoxyshikonin **20** widerlegt die Vermutung, dass die Substanzen deprotoniert im Keratin vorlagen. Anders als beim verwendeten Puffer (PBS-Puffer/Ethanol-Gemisch, 42 %-v/v, pH 8.1, Abschnitt 5.1), wurden Formulierungen verwendet, die keine basischen Eigenschaften besaßen. Auch das Keratin der Nägel und Hufe, in die die Wirkstoffe **12** und **20** permeierten, zeigen natürlicherweise einen leicht sauren pH-Wert von etwa 5.^[190]

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Verfärbung lieferten BOTTEI *et al.* Die Autoren berichten, dass Naphthazarin und damit auch seine Derivate einen 1 : 1 Komplex mit Kationen wie Zn^{2+} oder Cu^{2+} ausbilden.^[191] Die Komplexe können auch je nach Bedingungen sehr lange lineare Strukturen von bis zu 3000 Einheiten ($n = 3000$) bilden.^[192] Diese Makromoleküle sind im Keratin jedoch unwahrscheinlich, da die Metalle wie eingangs erwähnt nur als Spurenelement im Keratin vorkommen (Abschnitt 1.2). Die Konzentration ist daher nicht hoch genug und die räumlich kompakte Struktur des proteinogenen Materials lässt eine größere Struktureinheitsbildung nicht zu.

PLYTA *et al.* zeigten 1998 in einem Titrationsexperiment ebenfalls, dass phenolische Naphthochinone wie die Naphthazarine mit Zn^{2+} -Kationen (aus $Zn(OAc)_2$) in einer methanolischen Lösung einen

Chelatkomplex eingehen können.^[193] Diese Tatsache wurde von den Autoren aufgezeigt, um die Wirksamkeit von Derivaten wie Naphthazarin (**12**) und Shikonin/Alkannin (**19/33**) an der Topoisomerase I begründen zu können. In den UV/Vis-Spektren war im Verlauf der Titration eine deutliche Rotverschiebung der Absorptionen erkennbar, was eine Verfärbung der Testsubstanzen bedeutet.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RAMAN-Messungen für Deoxyshikonin (**20**) in Keratin zeigten in den erhaltenen Spektren starke Fluoreszenzsignale und unterstützen damit die These einer Komplexbildung (siehe Abschnitt 5.2). Da es durch die Komplexbildung, ähnlich der Deprotonierung, zu einer Rotverschiebung des Absorptionsspektrums kommt, die wiederum eine Absorption des eingesetzten Laserlichts (785 nm, 100 mW) begünstigt. So wäre beim Auftreffen der Laserlichtstrahlung eine Absorption mit anschließender elektronischer Anregung an Stelle eines inelastischen Stoßes möglich (siehe Abschnitt 5.2). Wie in Abb. 5.7 gezeigt, könnte es so zur Fluoreszenzstrahlung kommen.

Dass es sich bei der Verfärbung nicht um eine irreversible Reaktion des Moleküls mit dem Keratin handelt, wurde durch Hinzugeben von 1 M HCl-Lösung auf die verfärbten Keratinmembranen bewiesen. Das Ansäuern führte zu einem erneuten Farbumschlag von der beobachteten violett/bläulichen zurück in die rote Farbe, die unter Lösen des protonierten Naphthazaringerüsts **12** auftritt. Dieses Verhalten lässt darauf schließen, dass das Naphthazaringerüst in seinem deprotonierten Zustand **101** vorliegt oder einen Komplex bildet. Durch Protonierung bei einem geeigneten pH-Wert wird entsprechend wieder **12** gebildet.^[194]

In einem einfachen Versuch wurden vier Mikroreaktionsgefäße mit folgenden Lösungen befüllt: DPBS-Puffer (pH 7.0 - 7.3), Zn^{2+} -Lösung aus $ZnCl_2$, KOH-Lösung (pH 10.8) und KOH-Lösung (pH 12.0). Anschließend wurde auf die Oberflächen der Flüssigkeiten Lackformulierung (Deoxyshikonin (**20**)) gegeben. Nachdem der Lack getrocknet war, wurde die gebildete Lackschicht untergerührt und für drei Tage bei RT stehen gelassen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.9 zu sehen.

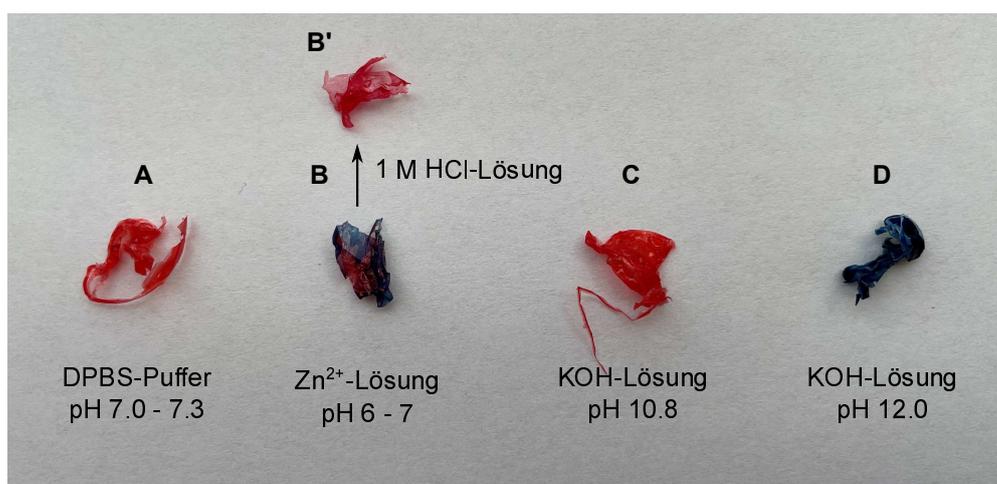


Abb. 5.9.: Abgebildet sind Lackfilme der Formulierung aus Abschnitt 6.4.4. **A:** In DPBS-Puffer (pH 7.0 - 7.3) gelagert. **B:** In Zn^{2+} -Lösung (pH 6 - 7) gelagert. **B':** Ein Teil der Membran **B** mit 1 M HCl-Lösung versetzt. **C:** KOH-Lösung (pH 10.8). **D:** KOH-Lösung (pH 12.0).

Sowohl die Membran, die mit DPBS-Puffer versetzt wurde (Abb. 5.9 A), als auch die mit KOH-Lösung des pH-Werts von 10.8 (Abb. 5.9 B) zeigten keine farblichen Veränderungen nach vergangener Einwirkzeit. Die mit Zn^{2+} -Lösung versetzte Lackschicht (Abb. 5.9 C) zeigte eine stellenweise deutliche dunkle Verfärbung auf, was auf Grund des pH-Wertes von 6-7 für die Bildung eines Komplexes mit den solvatisierten Zn^{2+} -Ionen und keiner Deprotonierung spricht. Die in Abb. 5.9 D gezeigte Probe wies bei einem pH-Wert von 12.0 die typische tiefblaue Farbe des deprotonierten Naphthazaringerüsts auf.

Somit wurde anhand von Zinkionen gezeigt, dass Spuren zweiwertiger Ionen zu einer Komplexbildung mit dem eingesetzten Wirkstoff Deoxyshikonin (20) stellvertretend für die Naphthazarinderivate führten. Ob diese Interaktion der einzige Grund für die starke Verfärbung ist oder ob die proteinogene Umgebung des Keratins weitere Wechselwirkungen ausüben, muss in weiterführenden Experimenten ermittelt werden.

Je nach Zustand, in dem der Wirkstoff im Keratin vorliegt, sollte die Zugabe einer Säure zur Formulierung, bzw. das Ansäuern des Nagels zu einer Steigerung der Permeationsrate der Naphthazarinderivate führen. KOBAYASHI *et al.* berichteten, dass dissoziierte Verbindungen geringere Diffusionen im Nagelkeratin aufweisen als ungeladene.^[40] In einer Formulierungsoptimierung sollte daher auf den Aspekt der pH-Wert-Regulation geachtet werden. Für zukünftige Experimente und vor allem Formulierungen ist es daher wichtig, den pH-Wert zu regulieren und möglicherweise Zusätze wie Milch- oder Salicylsäure hinzuzufügen. Die könnten so gewählt werden, dass sie auf Grund ihrer Eigenschaften nicht nur den pH-Wert einstellen, sondern auch zu einer Permeationsverstärkung (vgl. *permeation enhancer*) führen.^[195,196]

Neben der in dieser Arbeit ausführlich behandelten Formulierung auf Basis eines Lacks gibt es die Möglichkeit, die Wirkstoffe in Form eines Hydrogels anzuwenden. Wie in der bereits kommerziell erhältlichen PACT[®]-Therapie beschrieben, wird ein mit *photosensitizer* (Toluidinblau) beladenes Gel (Hydroxyethylcellulose) (HEC) auf den betroffenen Nagel aufgetragen und nach kurzer Einwirkzeit bestrahlt.^[197] Da für ein Hydrogel eine gute Wasserlöslichkeit des Wirkstoffs unumgänglich ist, muss der verwendete pH-Wert des Gels im Bereich von 12 liegen, damit die Naphthazarinderivate in deprotonierter Form gelöst werden (siehe Abschnitt 5.3). In der nachfolgenden Abb. 5.10 A ist ein mit Naphthazarin (12) angefertigtes Hydrogel auf Basis von Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) und KOH-Lösung (pH 12) abgebildet.

Die tiefblaue Farbe bestätigt das erfolgreiche Lösen von Naphthazarin in der verdickten Hydroxypropylmethylcellulose.^[198] Aufgetragen auf eine Keratinmembran ist wie bei den eingesetzten Lackformulierungen die Violettfärbung nach Diffusion in das Keratin erkennbar (vgl. Abschnitt 5.1). So könnte diese Anwendungsmethode nicht nur den Wirkstoff vermitteln, sondern auch durch den alkalischen pH-Wert für eine Auflockerung der Keratinstruktur sorgen, sodass der Wirkstoff besser in das Keratin eindringen kann.^[199] Für die Formulierung von Arzneimitteln zur Anwendung am Auge werden akzeptable pH-Werte von 5.5 bis 11.4 berichtet.^[198] Da das Auge einen weitaus empfindlicheren Bestandteil des menschlichen Körpers darstellt als das Keratin des Nagels, könnte eine Anwendung am Nagel realistisch sein. Zu beachten ist jedoch, dass dieser hohe pH-Wert bereits für die Spaltung von Peptidbindungen ausreichend ist, sodass die Anwendungszeit kurz gehalten werden müsste.

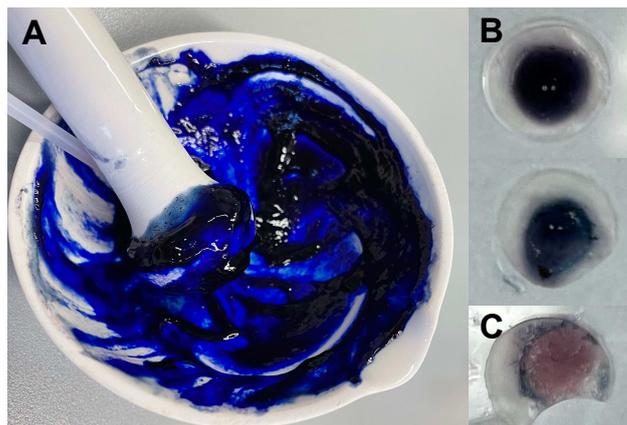


Abb. 5.10.: **A:** Ein aus Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) und Naphthazarin (**12**) hergestelltes Hydrogel mit einem pH-Wert von 12. **B:** Keratinmembranen mit appliziertem Naphthazarin-Hydrogel. **C:** Nach Entfernen des Gels ist die typische Färbung der Substanz **12** im Keratin sichtbar.

Für eine optimale Wirkung bei Bestrahlung würde das Keratin durch eine saure Formulierung zuvor angesäuert werden, damit die Naphthazarinderivate in ihrer protonierten und nachgewiesenen aktivierbaren Form vorliegen.

5.4. Photochemische Aktivierung im Keratin

Um die grundlegenden Vorgänge während der Photoaktivierung im Keratin erklären zu können, bedarf es weiterer mechanistischer Studien. So zeigte sich als eine geeignete Methode die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) als eine der NMR-Spektroskopie verwandten Methode.^[200] Mit ihr können Elektronenspins wie beispielsweise die von Radikalen nachgewiesen und identifiziert werden. Auf Grund der sehr geringen Lebensdauer der Radikale, die bei der photochemischen Aktivierung entstehen, muss auf den Einsatz einer sogenannten *spin-trap* (Spin-Falle) oder *spin-probe* (Spin-Sonde) zurückgegriffen werden. Diese Verbindungen reagieren mit den kurzlebigen Radikalen und bilden dabei selbst eine Radikalverbindung, die auf Grund ihrer optimierten Struktur Stabilitäten von Minuten und Stunden aufweisen können, sodass die ESR-Messungen durchgeführt werden können.^[200] In Verbindung mit den Radikalen der reaktiven Sauerstoffspezies können anhand der Form der gemessenen Signale die unterschiedlichen ROS identifiziert werden können.

In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass Deoxyshikonin (**20**), welches im Keratin befindlich ist, photodynamisch aktiviert werden kann. Dafür wurde es wie in vorherigen Versuchen beschrieben, auf eine Keratinmembran aufgetragen und nach erfolgter Einwirkzeit (siehe Abschnitt 5.1) weiterverarbeitet. Nachdem die Membran mit diversen Lösungsmitteln gewaschen wurde, wurde das Keratin unter Verwendung von flüssigem Stickstoff heruntergekühlt und mit einem Mörser und Pistill pulverisiert. Das Pulver wurde mit ACN und EDTA-Wasser (1 M EDTA) und einer Spin-Sonde (TMTH, **110**) versetzt und für 5 min mit Licht einer Peakwellenlänge von 519 nm bestrahlt. Vom Überstand wurde mit einer Kapillare direkt nach Bestrahlung eine Probe von 25 μL gezogen und vermessen. Nach 5 min Wartezeit wurde eine erneute Probe vermessen. In Abb. 5.11

ist das Ergebnis abgebildet.

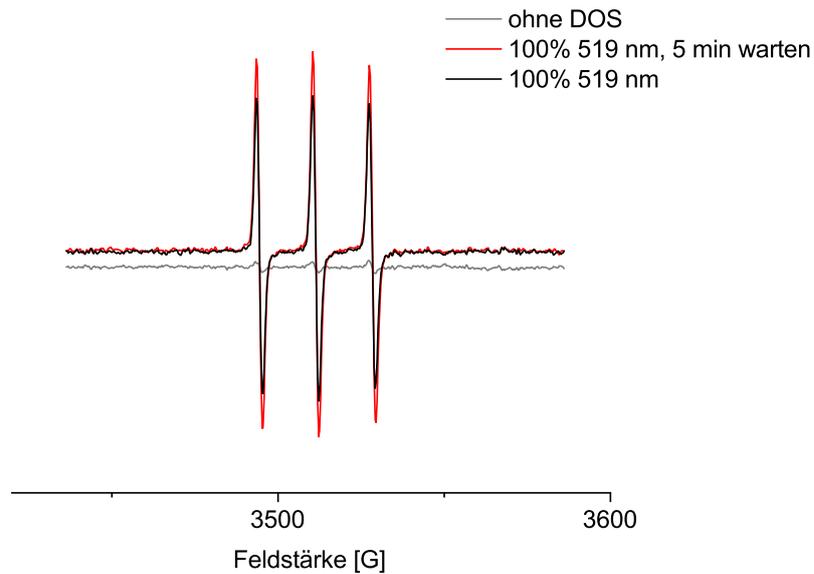


Abb. 5.11.: Abgebildet ist das ESR-Spektrum von Deoxyshikonin (**20**) mit der Spin-Sonde TMTH mit 5 min Bestrahlung mit Licht einer Peakwellenlänge von 519 nm (4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) (schwarz) und nach weiteren 5 min Wartezeit (rot). Das graue Spektrum zeigt TMTH nach Bestrahlung ohne Wirkstoff.

Als Kontrolle in diesem Vorversuch diente eine Probe, die nur TMTH (**110**) ohne Wirkstoff **20** enthielt. Die erhaltenen Spektren für die Wirkstoffproben zeigen ein typisches Signal für **110** und belegen eine photochemische Aktivierung des Deoxyshikonins (**20**). Interessanterweise stieg die Intensität des Signals mit einer Wartezeit von fünf Minuten, sodass zu vermuten ist, dass nicht nur während der Bestrahlungsdauer, sondern auch anschließend noch radikalische Abläufe stattfinden. Welche das genau sind, muss mit mechanistischen Studien untersucht werden.

Kapitel 6.

Wirksamkeitsuntersuchungen an den Pathogenen

Wie eingangs erwähnt, ist die biologische Wirksamkeit gegen die Pathogene *C. albicans* und *T. rubrum* ein Hauptkriterium für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen die Onychomykose (siehe Abschnitt 3.1). Mit Deoxyshikonin (**20**) wurde in der vorangegangenen IC₅₀-Bestimmung eine Hitsubstanz gefunden, die dieses Kriterium mit einem IC₅₀-Wert von 258 nM erfüllte (siehe Abschnitt 3.4). Allerdings ist **20** synthetisch nur schwer zugänglich und entsprechend teuer, sodass es bisher nicht für den kommerziellen Gebrauch (siehe Abschnitt 3.1) geeignet ist. Folglich wurden besser zugängliche Derivate, wie in Kap. 4 beschrieben, im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der biologischen Wirksamkeitsstudien dieser Naphthazarinderivate vorgestellt.

Für die Durchführungen der nachfolgenden IC₅₀-Bestimmungen wurden erneut Verdünnungsreihen in einem Resazurin-Zellviabilitätsassay (siehe Abschnitt 9.3) gegen *C. albicans* und *T. rubrum* angefertigt. Als Referenzsubstanzen dienten Nystatin (**31**, *C. albicans*) und Clotrimazol (**103**, *T. rubrum*). Unter Bestrahlung der jeweiligen 96-well-Mikrotiterplatten mit Licht der Peakwellenlänge von 519 nm (10 min, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) wurden Dosis-Wirkungs-Kurven für die Aktivierung der Substanzen aufgenommen. Die Dunkelkontrollen wurden entsprechend auf die gleiche Weise, jedoch ohne Bestrahlung, durchgeführt. Als einzige Lichtquelle befand sich eine rote LED-Lampe im Raum. Um zu zeigen, dass der Prozess der Bestrahlung durch das eingesetzte Licht und die dabei steigende Temperatur zu keinen Inhibitionseffekten führt, wurden jeweils weitere Kontrollen durchgeführt (siehe Abschnitt 9.3.1).

6.1. Bestimmung der IC₅₀-Werte gegen *C. albicans*

Die ermittelten IC₅₀-Werte für die Referenz Nystatin (**31**) lagen bei 692 ± 128 nMⁱ für die unbestrahlten und $1\,665 \pm 886$ nM für die bestrahlten Durchführungen. Erneut konnte die photolytische Degradation der Substanz beobachtet werden, was sich in dem höheren IC₅₀-Wert in der bestrahlten Probe widerspiegelte. Diese Untersuchungen decken die Ergebnisse der ersten Untersuchung (siehe

ⁱDieser Wert wird fortan als der zu vergleichende Referenzwert für Nystatin (**31**) behandelt.

Abschnitt 3.3). Für eine genauere Betrachtung dieser Photoreaktion könnte massenspektrometrisch untersucht werden, wie sich Nystatin (**31**) im verwendeten Medium zersetzt oder es reagiert. Die ermittelten Werte für die synthetisierten Naphthazarinderivate sind in der nachfolgenden Tab. 6.1 zu sehen.

Im Verlauf der Arbeit wurde als zweite Referenzsubstanz Amorolfin-Hydrochlorid (**100**) in die IC₅₀-Bestimmung eingeführt. **100** findet in Form des Loceryl[®]-Nagellacks in der topischen Therapie der Onychomykose Anwendung und diente im nachfolgenden Nagelmodell (siehe Abschnitt 6.4) als topische angewendete Referenzsubstanz gegen (*T. rubrum*). Gegen *C. albicans* zeigte es in Flüssigmedium-Kultur im Vergleich zur eingesetzten Kontrolle Nystatin (**31**, 692 ± 128 nM) eine geringe Wirksamkeit mit einem IC₅₀-Wert von 28 086 nM (nicht-bestrahlt) und 32 717 nM (bestrahlt). Die Naphthazarinderivate zeigten mit Bestrahlung einer Wellenlänge von 519 nm eine Steigerung ihrer Wirksamkeit gegenüber dem Pathogen *C. albicans*. Der zuvor ermittelte IC₅₀-Wert (siehe Tab. 3.4) für Naphthazarin (**12**) konnte mit 632 ± 175 nM reproduziert werden. Die hier auftauchenden Schwankungen von fast 30 %, sind u.a. durch den Aufbau der Lampe und die dadurch auftretende Unregelmäßigkeit in der Bestrahlung erklärbar. Die für die Bestrahlungsexperimente eingesetzte Lampe war mit 8 LEDs besetzt und wurde mit einem passend angefertigten Metallgestell auf die 96-well-Titerplatte gesetzt (siehe Abschnitt 9.2.1). Dabei saß jede LED in der Mitte von 4 wells der Mikrotiterplatte und bestrahlte dadurch jedes well nur zu einem bestimmten Teil. Saß der Lampenkopf um wenige Millimeter verschoben, wurden die Substanzen in zwei der vier wells in einem direkteren Winkel bestrahlt als die der anderen beiden, was in einer stärkeren Aktivierung resultierte. Der für die nicht-bestrahlten Naphthazarinproben (**12**) erhaltene IC₅₀-Wert von 2 219 ± 511 nM befand sich im selben Bereich wie im initialen Wirksamkeitsscreening der Wirkstoffgruppen (10 μM: 98 %, siehe Tab. 3.3) und dem ersten IC₅₀-Test (2 328 nM siehe Tab. 3.4). Der Wert für die Bestrahlung mit 5 %iger Lampenintensität 2 234 nM (siehe Tab. 3.4) liegt im Fehlerbereich der hier durchgeführten Testung der Dunkelkontrollen, weshalb die Theorie unterstützt wird, dass bei dieser geringen Strahlungsintensität keine Aktivierung der Substanz **12** stattfand.

Die Wiederholung der IC₅₀-Testung von Shikonin (**19**) ergab einen Wert von 1484 nM und lag damit sowohl über dem des Grundgerüsts **12** (632 ± 175 nM), als auch dem der Referenz Nystatin (**31**, 692 ± 128 nM). Auf Grund der im direkten Vergleich zum Deoxyshikonin (**20**) und Naphthazarin (**12**) gezeigten geringeren Wirksamkeit nach Bestrahlung, wurden keine weiteren Versuche mit Shikonin (**19**) durchgeführt.

Deoxyshikonin (**20**) zeigte in allen Durchführungen starke Aktivierungen nach Bestrahlung. In der nachfolgenden Abb. 6.1 ist eine der ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven abgebildet.

Mit einem Wert von 213 ± 55 nM nach der Aktivierung lag dessen Wirksamkeit mit einem Faktor von 3 über der Referenz **31** (692 ± 128 nM). Der direkte Vergleich zur nicht-bestrahlten Probe war nicht möglich, da auf Grund der Unwirksamkeit im untersuchten Konzentrationsbereich Schwankungen in einem Bereich zwischen 3 000 und knapp 60 000 nM auftraten (vgl. Anhang, Abschnitt A.7). Ein Vergleich dieser unbestrahlten IC₅₀-Werte mit dem zuvor durchgeführten Wirksamkeitsscreening (Hemmung zwischen 10 μM und 100 μM, siehe Tab. 3.3) bestätigte den ermittelten Bereich.

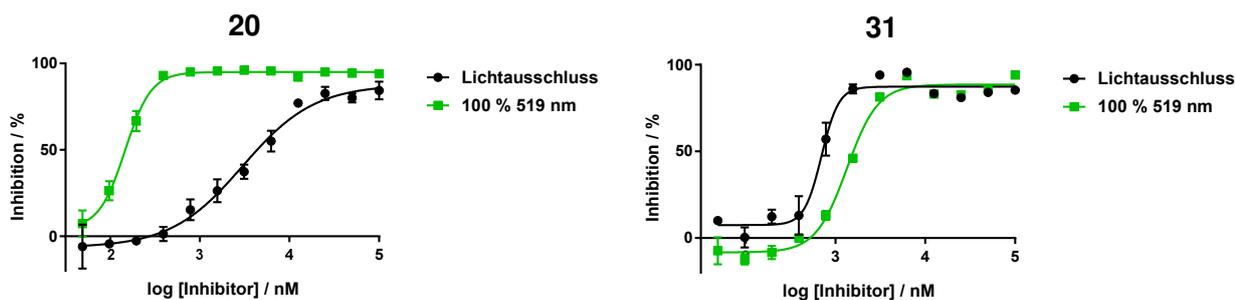


Abb. 6.1.: Beispielhafte Dosis-Wirkungs-Kurven der Substanz Deoxyshikonin (**20**) und der Referenz Nystatin (**31**) mit (grün) und ohne (schwarz) Bestrahlung für 10 min bei 519 nm (4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) in einem Resazurin-Zellviabilitätsassay gegen *C. albicans*. **20** war mit einem IC₅₀-Wert von 213 ± 55 nM (vgl. Referenz Nystatin, unbestrahlt: 692 ± 128 nM) der potenteste Kandidat der getesteten Verbindungen. Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus drei technischen Replikaten mit deren Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Die strukturell mit Deoxyshikonin (**20**) verwandten Verbindungen **85**, **86** und **89**, die in 2-Position eine sich verlängernde Alkylkette (C₂- bis C₄) besitzen, zeigten ebenfalls IC₅₀-Werte im Bereich der Referenz **31** (siehe Tab. 6.1). Alle drei Derivate zeigten mit 715 ± 209 nM (**85**), 599 ± 289 nM (**86**) und 556 ± 355 nM (**89**) vergleichbare IC₅₀-Werte und unterschieden sich nur gering voneinander. Wie auch bei **20** waren für die Dunkeltestungen keine eindeutigen Werte ermittelbar. Einige der Kurvenverläufe der in der Testung nicht-bestrahlten Ethyl-, Propyl- und Butyl-Derivate lagen durch ihre geringe Wirkung ohne Aktivierung außerhalb des mit den Verdünnungsreihen abgebildeten Konzentrationsbereiches (siehe Anhang, Abschnitt A.7). Diese alkylierten Naphthazarinderivate bieten neben der vergleichbaren Wirksamkeit zur Kontrolle Nystatin (**31**) und der bisherigen Hitsubstanz Deoxyshikonin (**111**) den Vorteil der synthetischen Zugänglichkeit (siehe Kap. 4) und dadurch Verfügbarkeit sowie den Vorteil der geringeren Kosten.

Die Derivate des Naphthazarins, die eine kürzere oder eine kürzere und zudem verzweigte Seitenkette besaßen (**82**: 2 337 ± 846 nM, **88**: 1 042 ± 185 nM, **80**: 7 646 ± 4 479 nM, **84**: 2 746 ± 70 nM), zeigten in den Tests erst bei höheren Konzentrationen eine Inhibition des Pathogens auf. Sie waren weniger potent als das Naphthazarinstammsystem. Bei letzterem wurde zudem eine geringe Löslichkeit im verwendeten DMSO/Wasser-Lösungsmittelgemisch festgestellt, die zu einem Ausfall der Substanz führte.

Dadurch, dass die Derivate **92**, **95** und **96** des Naphthazarins erst im Laufe des Projekts synthetisiert wurden, wurden sie nur zum Teil vermessen. Für **92** wurde ein Wert von 1 484 nM (n=1) erhalten, womit es sich in die Wirksamkeit der Derivate mit kürzerer Seitenkette einreichte. Das anillierte Derivat **96** besitzt dagegen mit einem IC₅₀-Wert von 570 nM (n=1) vielversprechendere Eigenschaften. Im Vergleich zu den alkylierten Derivaten **85**, **86** und **89** aber einen sterisch anspruchsvolleren Rest, der in Diffusionstestungen im Nagelmodell zunächst auf seine Keratinophilie geprüft werden muss. Die IC₅₀-Testung des *N*-Butylaminaphthazarin (**95**) steht noch aus.

Neben den Aminoderivaten wurden auch das 2-Hydroxynaphthazarin (**25**), 2-Phenylaphthazarin (**91**) und 2,3-Dichloronaphthazarin (**44**) als Derivate mit variierenden Substitutionen am chinoiden System untersucht. **25** zeigte sowohl unter Bestrahlung, als auch unter Lichtausschluss keine Inhibition des Erregers und stellt damit die einzige untersuchte Naphthazarinverbindung dar, die

unwirksam ist. **91** und **44** zeigten durch Bestrahlung einen niedrigen IC_{50} -Wert von 134 nM, bzw. 145 nM und lagen damit in ihrer Wirkung dicht beieinander. Auch im Vergleich zur Hitsubstanz Deoxyshikonin (**20**, 213 ± 55 nM) zeigten sich die beiden Strukturen vergleichbar. Ohne Einsatz von Licht zeigten die beiden Verbindungen in ihrer Wirkung einen Unterschied. Während **91** mit einem IC_{50} -Wert von 5 148 nM eine deutlich schwächere Wirkung zeigte, befand sich **44** mit 458 nM auch nicht-bestrahlt unter dem IC_{50} -Wert der Referenz Nystatin (**31**, 692 ± 128 nM). Diese beiden zuletzt getesteten Verbindungen zeigten damit großes Potenzial für die Anwendung gegen *C. albicans* und zukünftige Optimierungen der Naphthazarinstruktur.

6.2. Bestimmung der IC_{50} -Werte gegen *T. rubrum*

Parallel wurde die Wirksamkeit der oben beschriebenen Wirkstoffe gegen den zweiten Haupterreger der Onychomykose, *T. rubrum*, untersucht. Als Standardreferenzsubstanz wurde wie im Wirksamkeitsscreening (siehe Tab. 3.3) das Breitbandantimykotikum Clotrimazol (**103**) verwendet.^[201,202] Ebenso wie im vorherigen Abschnitt 6.1 wurden die IC_{50} -Werte über Verdünnungsreihen der Wirkstoffe, versetzt mit Erregerkultur, sowohl durch Bestrahlung mit Licht einer Peakwellenlänge von 519 nm, als auch unter Lichtausschluss bestimmt.

Die Referenz **103** zeigte nicht-bestrahlt am Pathogen *T. rubrum* einen IC_{50} -Wert von 114 ± 61 nMⁱⁱ und bestrahlt 109 ± 51 nM. Die Resultate, die für Clotrimazol (**103**) unter Bestrahlung erhalten wurden, unterschieden sich nicht von den Werten unter Lichtausschluss (bzw. Rotlicht). Das lässt darauf schließen, dass das Licht im verwendeten Wellenlängenbereich von 519 nm nicht von der Referenz absorbiert wurde. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass es sich bei **103** um einen farblosen Feststoff handelt und daher keine Absorption im sichtbaren Bereich des Spektrums besitzt.^[203]

In der nachfolgenden Tab. 6.2 sind die untersuchten Zielverbindungen und die für sie ermittelten IC_{50} -Werte aufgelistet.

Auch an *T. rubrum* zeigten die untersuchten Naphthazarinderivate nach Bestrahlung mit 519 nm eine drastische Steigerung ihrer Wirksamkeit. Dabei lag die Potenz vieler aktivierter Verbindungen über der der Standardreferenz Clotrimazol (**103**). In der ersten IC_{50} -Testung der Verbindungen **20**, **85**, **86** und **89** wurde mit der eingesetzten Startkonzentration von $10 \mu\text{M}$ und einem Verdünnungsfaktor von 1:2 die Dosis-Wirkungs-Kurve nicht vollständig abgebildet (siehe Abb. 6.2).

ⁱⁱDieser Wert wird fortan als der zu vergleichende Referenzwert für Clotrimazol (**103**) behandelt.

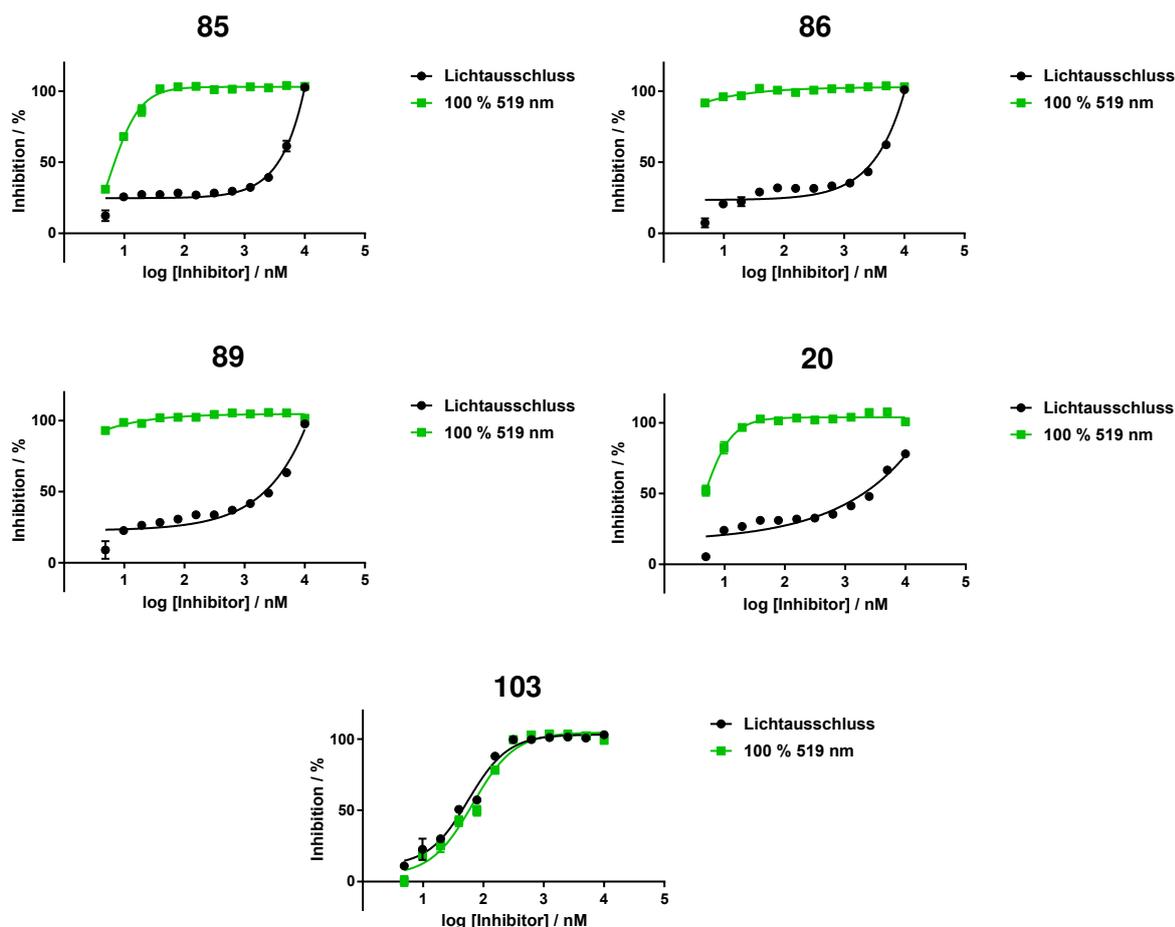


Abb. 6.2.: Dosis-Wirkungs-Kurven der Substanzen 85, 86, 89 und 20 in einem Resazurin-Zellviabilitätsassay gegen *T. rubrum*. Die Kurven konnten auf Grund zu hoher Wirksamkeit der Substanzen nach Photoaktivierung nicht ausgewertet werden und mussten mit geringerer Startkonzentration und größeren Verdünnungsschritten wiederholt werden.

Die Startkonzentration wurde auf Grund der hohen Potenz für die folgenden Testungen an *T. rubrum* angepasst und auf 10 μ M, bzw. 1 μ M herabgesetzt. Wenn nötig wurde auch der Faktor der Verdünnungsreihe auf 1:3 geändert.

Für die bisherige Hitsubstanz in der Testung gegen *C. albicans* Deoxyshikonin (20) konnte nach Aktivierung mit Bestrahlung gegen *T. rubrum* ein IC₅₀-Wert von 32.2 ± 17.4 nM erhalten werden. Sie ist wirksamer als die Referenz Clotrimazol (103) mit einem IC₅₀-Wert von 114 ± 61 nM. Die höchste Wirksamkeit im Test gegen *T. rubrum* zeigten die Verbindungen 85 (24.2 ± 20.6 nM), 86 (13.0 ± 12.2 nM) und 89 (1.0 ± 0.3 nM). In der IC₅₀-Testung gegen *C. albicans* hinter Deoxyshikonin (20) gelegen, bilden die drei Alkylderivate 85, 86 und 89 gegen *T. rubrum* die neuen Hitstrukturen. Beispielhafte Dosis-Wirkungs-Kurven für die Aktivierung durch Bestrahlung der Verbindungen 85, 86, 89 und 20 sind in der nachfolgenden Abb. 6.3 abgebildet.

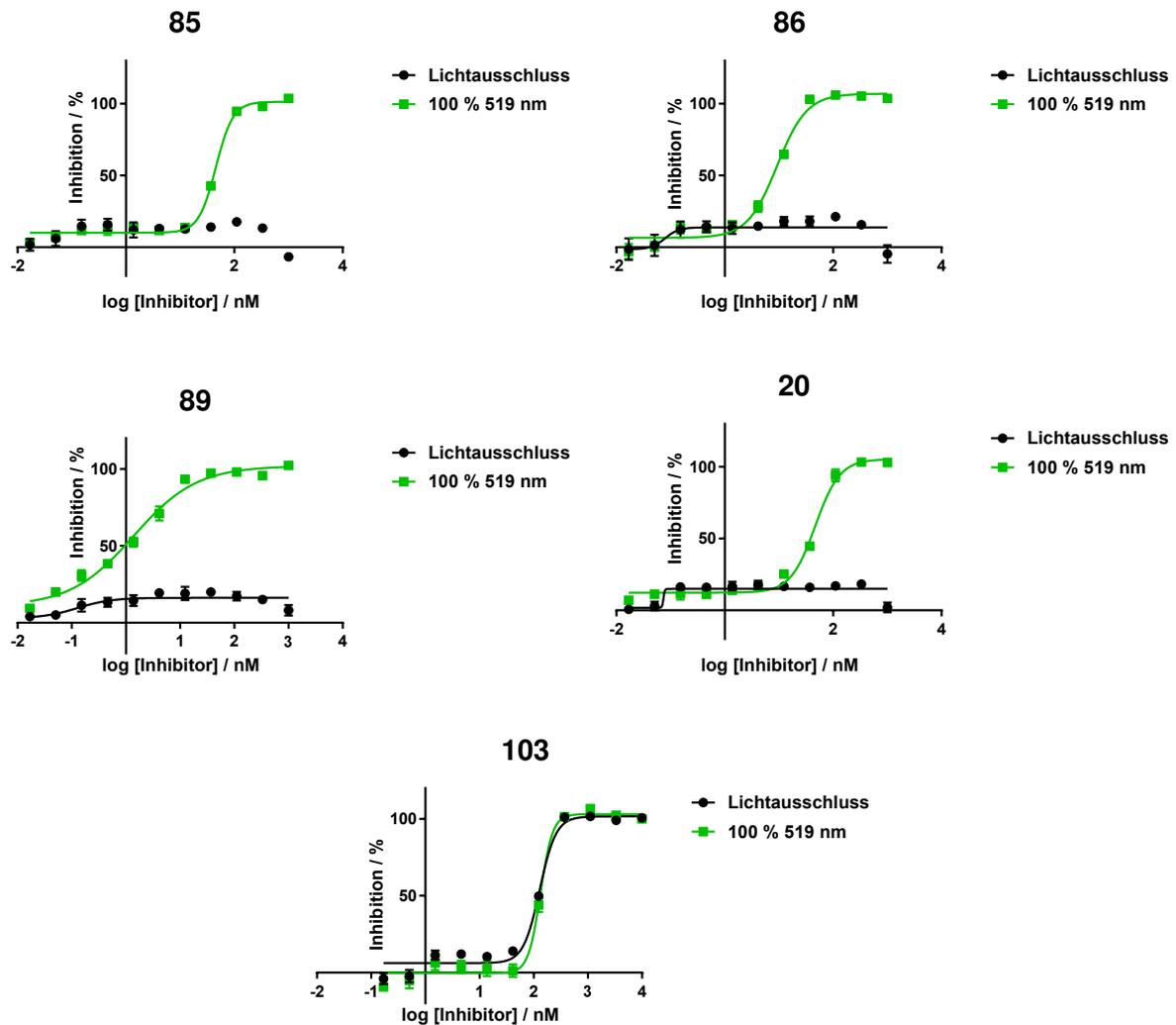


Abb. 6.3.: Beispielhafte Dosis-Wirkungs-Kurven der Substanzen **85** (bestrahlt: 24.2 ± 20.6), **86** (bestrahlt: 13.0 ± 12.2), **89** (bestrahlt: 1.0 ± 0.3), Deoxyshikonin (**20**, bestrahlt: 32.2 ± 17.4) und Referenz Clotrimazol (**103**, unbestrahlt: 114 ± 61 nM) mit und ohne Bestrahlung (10 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm^2 Nennleistung) in einem Resazurin-Zellviabilitätsassay gegen *T. rubrum*. Alle Verbindungen zeigten sich wirksamer als die Referenz Clotrimazol (**103**, unbestrahlt: 114 ± 61 nM). Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus drei technischen Replikaten mit deren Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Für die Verbindung **88** wurden insgesamt drei Messungen durchgeführt, von denen allerdings nur eine ausgewertet werden konnte. Auch hier wurde zunächst eine Messung mit zu hoher Startkonzentration bzw. zu geringen Verdünnungsschritten durchgeführt, sodass die Kurve nicht vollständig abgedeckt wurde. In einer weiteren Testung erreichte die Inhibitionskurve nur etwa 50 % und es gelang keine vollständige Inhibition. Im dritten Versuch konnten mit 42.7 nM eine Wirkung ähnlich den Verbindungen **20** und **85** erhalten werden. Da die tatsächliche biologische Wirksamkeit zwischen den letzten beiden Testungen liegt, bedarf es hier erneuter Durchführungen, damit die Wirkung nach Photoaktivierung wie bei den anderen Derivaten bestätigt werden kann. Wie in den Versuchen gegen *C. albicans* zeigten die Verbindungen **19** (781 ± 407), **84** (321 ± 212) und **80** (244 ± 192) auch gegen *T. rubrum* eine schwächere Aktivierung durch Bestrahlung als die n-Alkylderivate **85**, **86**, **89** und auch **20**. Auch das anillierte Derivat **96** (352 ± 150) und das

NaphthazarinGrundgerüst **12** (353 ± 237) erzielten im Vergleich zur Referenz **103** (114 ± 61 nM) geringere Potenzen. Diese Wirkung war nicht zu erwarten, denn gegen *C. albicans* wurden im Vergleich zur Referenz Nystatin (**31**, 692 ± 128) gleichwertige IC₅₀-Werte nach Aktivierung erhalten (**96**, 570 nM und **12**, 632 ± 175 nM). Worin dieser Unterschied liegt und warum die n-alkylierten Derivate des Naphthazarins (**12**) einen gegenteiligen Effekt zeigten, muss weiter untersucht werden. Die Verbindungen 2-Hydroxynaphthazarin (**25**), 2,3-Dichloronaphthazarin (**44**) und 2-Phenyl-naphthazarin (**91**) zeigten am Dermatophyten *T. rubrum* ein ähnliches Verhalten wie in den IC₅₀-Bestimmungen gegen *C. albicans*. Naphthopurpurin **25** erwies sich auch gegen *T. rubrum* als unwirksam. Die ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven für sowohl die bestrahlte als auch die nicht-bestrahlte Probe lagen aufeinander und zeigten keine Inhibition. Das zweifach chlorierte Derivat **44** hingegen lag mit einem IC₅₀-Wert von 64.9 nM unter dem des Clotrimazols (**103**, 114 ± 61 nM). Die Dosis-Wirkungs-Kurve des 2-Phenyl-naphthazarins (**91**) wurde auf Grund des gewählten Konzentrationsbereiches nicht bestimmt, zeigte aber an Hand ihres Verlaufs, der den anderen Hitsubstanzen ähnelte, großes Potenzial. Der von der Software Prism 7 errechnete IC₅₀-Wert für die photoaktivierten Proben lag bei 2.9 nM.

Mit den Ergebnissen gegen *T. rubrum* und gegen *C. albicans* erwiesen sich die Derivate **44** und **91** als vielversprechende Kandidaten. Sie zeigten neben den variierenden Alkylketten der Derivate **85**, **86** und **89** weitere Substitutionsmöglichkeiten, die in das Naphthazaringerüst eingebracht werden können. In zukünftigen Untersuchungen sollten u.a. Derivate mit Kombinationen aus diesen Resten untersucht werden, um mögliche Synergien aufzuzeigen.

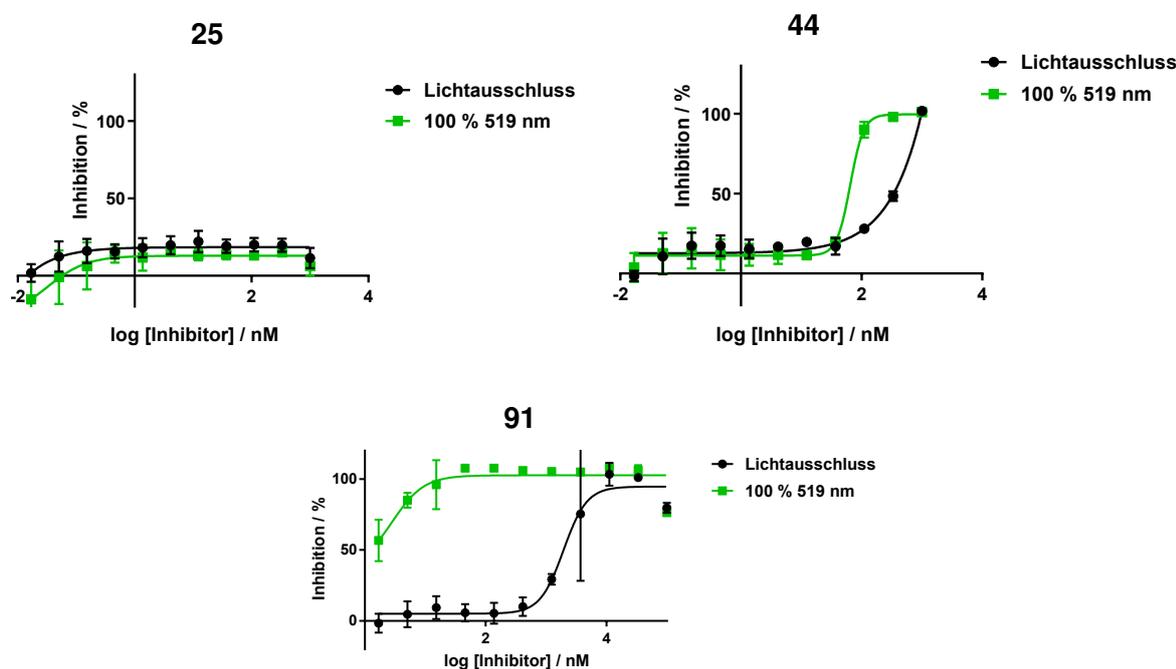


Abb. 6.4.: Dosis-Wirkungs-Kurven der Substanzen **25**, **44** und **91** in einem Resazurin-Zellviabilitätsassay gegen *T. rubrum*. **25** zeigte mit und ohne Bestrahlung (10 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) keine Wirkung gegen den Erreger. **44** wies hingegen einen IC₅₀-Wert von 64.9 nM nach Bestrahlung auf. **91** ist nur bedingt auswertbar, zeigt aber großes Potenzial. Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus drei technischen Replikaten mit deren Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Wie im Abschnitt der IC_{50} -Bestimmungen gegen *C. albicans* erwähnt, wurde Amorolfin (**100**) als weitere Referenz gegen *T. rubrum* mit aufgenommen. Die Dosis-Wirkungs-Kurven von **100** sind in der nachfolgenden Abb. 6.5 aufgezeigt.

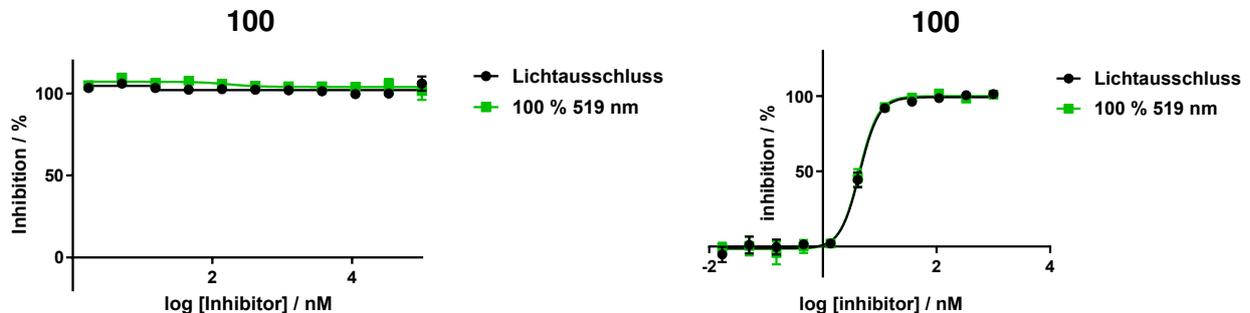


Abb. 6.5.: Dosis-Wirkungs-Kurven der Substanz Amorolfin-Hydrochlorid (**100**) mit und ohne Bestrahlung (10 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) in einem Resazurin-Zellviabilitätsassay gegen *T. rubrum*. In der ersten Testung wurde die Potenz ebenfalls nicht vollständig abgebildet. In der zweiten Durchführung konnte ein IC_{50} -Wert von 4.4 nM ermittelt werden. Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus drei technischen Replikaten mit deren Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Auch bei Amorolfin wurde die Wirksamkeit zunächst unter Standardbedingungen nicht vollständig abgebildet. Mit der angepassten Testung (siehe weiter oben) wurde ein IC_{50} -Wert von 4.4 nM ermittelt. Vergleicht man die neu eingesetzte und gegenüber Clotrimazol (**103**) wirksamere Referenzsubstanz (**100**) mit den Naphthazarinderivaten, wurde gezeigt, dass **89** die potenteste Substanz gegen *T. rubrum* darstellt. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Hitsubstanzen **85**, **86**, **89** und **20** sowohl gegen *T. rubrum* als auch gegen *C. albicans* (siehe vorherigen Abschnitt 6.1) niedrige IC_{50} -Werte erzielen. Daher lassen sich die Naphthazarinderivate auf Grund ihrer Wirkung durch Photoaktivierung im Sinne der PDT universell gegen die Pathogene der Onychomykose einsetzen. Zusätzlich wird mit Hilfe dieser Therapiemethode die Problematik der möglichen Resistenzbildung gegen Wirkstoffe wie Amorolfin (**100**), Clotrimazol (**103**) oder Nystatin (**31**) adressiert.^[204–206] Durch die gezielte Aktivierung des Wirkstoffes kommt es zu einem prompten Wirkungseintritt, sodass sich pathogene Zellen nicht anpassen können.

6.3. Struktur-Wirkungs-Beziehung

Die in den Testungen gegen *C. albicans* und *T. rubrum* eingesetzten Derivate **82**, **85**, **86** und **89** des Naphthazarins (**12**) zeigten in ihrer Wirksamkeit in Abhängigkeit ihrer Struktur eine erkennbare Tendenz. Mit steigender Kettenlänge des Alkylrestes in 2-Position der Moleküle sank der IC_{50} -Wert bzw. stieg die biologische Wirksamkeit. In der nachfolgenden Abb. 6.6 ist der Zusammenhang dargestellt.

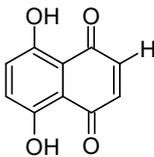
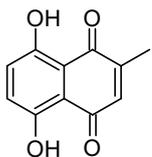
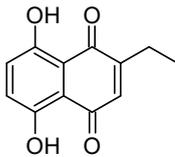
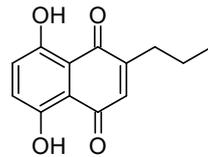
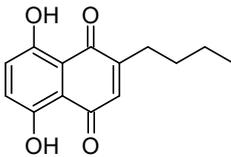
	12	82	85	86	89
					
Ca	632 ± 175	2337 ± 846	715 ± 209	599 ± 289	556 ± 355
Tru	353 ± 237	87.6 ± 65.4	24.2 ± 20.6	13.0 ± 12.2	1.0 ± 0.3

Abb. 6.6.: Abgebildet sind die Naphthazarinderivate mit Alkylseitenkette am chinoiden Teil des Moleküls. Die angegebenen Werte sind die IC_{50} -Werte nach Aktivierung durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 519 nm. Die Werte sind in nM angegeben.

Diese steigende Wirksamkeit mit wachsender Kettenlänge nach Photoaktivierung ist besonders deutlich in den Testungen gegen *T. rubrum* in Erscheinung getreten. Dies legte die Vermutung nahe, dass das Molekül mit steigender Kohlenstoffkette im Rest, ähnlich wie Tensidmoleküle, ein Einlagern in die Zellmembran der Pathogene bewirkte. Beschrieben wurde dieses Verhalten für Tenside wie Triton™ X-100 (Octoxinol 9) oder Pluronic™ F-68 (Poloxamer 188).^[207,208]

Auch die strukturelle Ähnlichkeit dieser Naphthazarinderivate zum Ergosterol (**112**) könnte die Vermutung einer Einlagerung unterstützen. **112** befindet sich in den Zellmembranen von Pilzen und ist unter anderem für die Stabilität der Membranen verantwortlich.^[209] In Abb. 6.7 ist die Hitsubstanz Deoxyshikonin (**20**) im direkten Vergleich gezeigt.

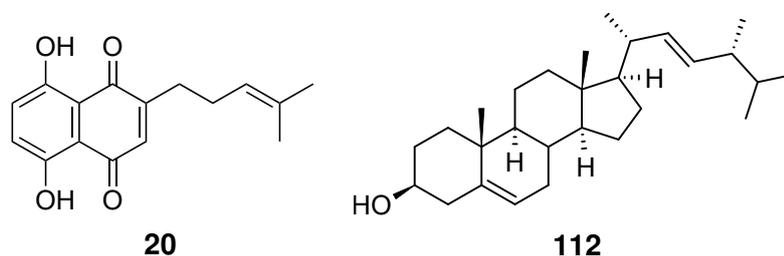


Abb. 6.7.: Abgebildet sind die Strukturen von Deoxyshikonin (**20**, links) und Ergosterol (**112**, rechts).

Das Grundgerüst des Naphthazarinderivats **20** ist kompakter als das des Sterols, besitzt aber eine ähnliche Alkylseitenkette, sodass Deoxyshikonin (**20**) möglicherweise als Substitution für Ergosterol (**112**) in die Membran eingebaut werden und so nach Photoaktivierung direkten Schaden an der Zellmembran verursachen kann.

Ein zusätzlicher wirkungsverstärkender Effekt der bestrahlten Naphthazarinderivate könnte dadurch zu erklären sein, dass sich die Moleküle zunächst in die Membran der Zellen einlagern (vgl. Tensidmoleküle bzw. Ergosterol) und durch anschließende Bestrahlung diese Membran unter Bildung von ROS irreversibel beschädigen. Diese Tendenz wurde ebenfalls für die Kulturexperimente mit *C. albicans* gezeigt.

Die Vermutung zur Anreicherung der Substanzen in der Pilzmembran wird durch die bei der photodynamischen Aktivierung von Naphthazarinen gebildeten ROS unterstützt. Bisherige Arbeiten zur Bestrahlung von Naphthochinonderivaten ergaben, dass in Abhängigkeit vom Lösungsmittel

eine Bandbreite an reaktiven Sauerstoffspezies entsteht.^[95] Neben der für *photosensitizer* üblichen Bildung von Singulett-Sauerstoff nach Photoreaktion Typ II, findet bei den Naphthochinonen ebenfalls die Bildung radikaler ROS nach Photoreaktion Typ I statt (siehe Abschnitt 1.5). FOOTE *et al.* berichteten, dass durch den nicht-radikalischen Singulett-Sauerstoff eine Reihe an Schäden in Zellen bewirkt wird. Vor allem tauchen Schäden an Enzymen und der DNA sowie in Zellmembranen an ungesättigten Phospholipiden auf.^[210] Der große Unterschied der unter Photoreaktion Typ I gebildeten freien Radikale (z.B. Superoxid-Radikal ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxylradikal (HO^{\bullet}) siehe Abschnitt 1.5) zu Singulett-Sauerstoff ist, dass eine direkte Lipidperoxidation Kettenreaktionen in den Zellmembranen durch die Radikale ausgelöst wird und die Membran dabei beschädigt wird.^[211] Befinden sich die Naphthazarinmoleküle durch ihre Alkylkette in der Zellmembran verankert, würde dies eine erhöhte Wirksamkeit mit sich führen.

Zukünftige Synthesepfanungen neuer Naphthazarinderivate sollten zunächst Reste mit längeren Alkylresten bevorzugen, um diese postulierte Tendenz weiter zu bestätigen. WALTERS *et al.* untersuchten eine Reihe von *n*-Alkoholen (C_1 - C_8) und beobachteten eine direkte Abnahme des Permeabilitätskoeffizienten (siehe Abschnitt 1.3) mit steigender Kohlenstoffkette.^[36,212] Interessanterweise stieg der Koeffizient für die C_{10} - und C_{12} -Alkohole wieder, sodass eine generelle Aussage an Hand der steigenden Alkylkettenlänge der zu synthetisierenden Naphthazarinderivate nicht möglich ist. Dennoch fanden Autoren verschiedener Arbeiten einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Molekulargewicht der Verbindung und ihrer Permeationseigenschaften.^[40,52,53] Wahrscheinlich wird die Wirksamkeit der alkylierten Naphthazarinderivate auf Grund dieser Zusammenhänge ein Maximum finden und wieder sinken.

Neben den Alkylderivaten wurden auch Reste mit elektronenschiebenden Eigenschaften untersucht. Die Anilin- (**96**) und die Dimethylamin-Gruppe (**92**), besaßen jedoch keinen positiven Effekt auf die Aktivierung des Naphthazarinkerns, sodass sie insgesamt weniger potent waren als vergleichbare Derivate ohne Heteroatom in Position 2. Interessant wären hier die Testungen von Derivaten mit Aminopropyl- und Aminoethyl-Kette, die in ihrer Länge denen von Verbindungen **86** und **89** gleichen, um direkte Vergleiche erzielen zu können.

Verbindung **44**, welches in 2- und 3-Position jeweils ein Chloratom besitzt, zeigte mit seinen stark elektronenziehenden Substituenten bzw. mit seinem schwachem + M-Effekt eine hohe Wirkung. Dabei stellt sich die Frage, ob eine Variation der Halogenatome oder das Einführen nur eines Halogenatoms in den chinoiden Teil des Naphthazarins weitere Veränderungen in der Wirksamkeit mit sich bringt. Am Beispiel des 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (BODIPY) wurde gezeigt, dass das diiodierte Derivat (2,6-Diiodo-BODIPY) eine höhere Ausbeute an Singulett-Sauerstoff erzielte, als die unsubstituierten Derivate.^[213,214] Diese Beobachtung resultiert aus dem sogenannten *internal heavy atom*-Effekt, der zu einer höheren *intersystem crossing*-Rate (Φ_{isc}) führt und damit einem erhöhten Übergang vom angeregten Singulett \rightarrow Triplett-Zustand entspricht.^[215,216] So könnte die Substitution mit Brom- oder Iodatomen in den Positionen 2, 3 oder 2 und 3 zu einer stärkeren Aktivierung durch Bestrahlung führen.

Desweiteren sollten doppelt-substituierte Derivate des Naphthazarins (**12**) dargestellt werden, die Variationen aus den vorgestellten Substituentengruppen besitzen. So könnten beispielsweise die Vorteile der langen Alkylketten mit den elektronischen Eigenschaften der Halogensubstituenten

kombiniert werden.

Eine weitere wichtige Überlegung in Bezug auf die Struktur der Naphthazarinderivate bezieht sich auf ihre Wasserlöslichkeit. Wie bereits im Abschnitt 5.1 in Verbindung mit der FRANZ-Zell-Diffusionstestung angesprochen, ist die Möglichkeit, die Hitsubstanz anhand ihrer Wirkung auszuwählen, ungeachtet ihrer Pharmakokinetik bzw. Toxizität für den Sonderfall der topischen Anwendung im Nagel. Durch ihre Keratinophilie werden die Naphthazarinderivate im Nagel verbleiben, nicht aber über das darunterliegende Nagelbett resorbiert und systemisch verstoffwechselt. Was in vielen Anwendungen in der medizinischen Chemie als Nachteil auf Grund geringer Bioverfügbarkeit dargestellt wird, ist im Falle der topischen Anwendung am Nagel als Vorteil anzusehen.

Um jedoch die Wirksamkeit gegen die Pathogene der Onychomykose *in vivo* zu bestimmen, die von der hier bestimmten *in vitro*-Wirksamkeit an Flüssigmedium-Kulturen abweichen kann, wurde zunächst ein *in vitro*-Modell herangezogen.^[217] Dieses *in vitro*-Modell (siehe nächster Abschnitt 6.4) vereinte die keratine Umgebung des Nagels mit der Infektion des Erregers.

6.4. Testung der Hitsubstanz in einem infizierten Nagelmodell

Die Herausforderung in der Entwicklung eines neuen Wirkstoffs für die Onychomykose besteht nicht nur im Nachweis der *in vitro*-Wirkung am Pathogen, sondern viel mehr im Nachweis bzw. in der Optimierung der antimykotischen Wirkung in der physiologischen Keratinumgebung des Nagels. Da der menschliche Nagel bisher nicht auf künstliche Weise nachempfunden werden kann, bedurfte es eines Testsystems, das sowohl die Pathogene als auch das Keratin miteinander kombiniert.

6.4.1. Erste Testreihe

Für dieses Vorhaben wurde ein modifiziertes Nagelmodell nach LUSIANA *et al.* eingesetzt, das auf der Infektion von Rinderhufkeratin mit dem Onychomykose-Erreger *T. rubrum* basiert.^[218] Als Keratinquelle dienten hierbei die Sohlen von Rinderhufen, die zu Membranen weiterverarbeitet wurden (siehe Abschnitt 9.2.3). Anders als von LUSIANA *et al.* beschrieben, wurde später in der Testung der Schritt der Probenbestrahlung zur Photoaktivierung ergänzt. Der Ablauf der Testung ist schematisch in Abb. 6.8 dargestellt.

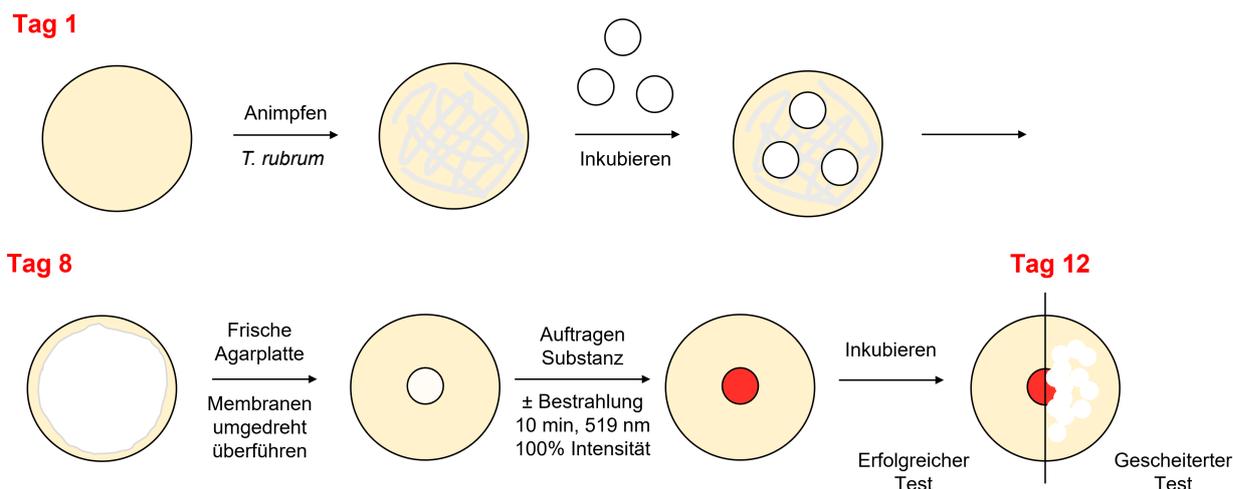


Abb. 6.8.: Schematischer Ablauf des Nagelmodells nach LUSIANA *et al.* zur Bestimmung der antimykotischen Wirkung an *T. rubrum* in Keratin. Der Bestrahlungsschritt wurde ergänzt.

Für das Modell wurde als Testsubstanz die Hitsubstanz Deoxyshikonin (**20**) eingesetzt, da sie sowohl an *C. albicans* als auch an *T. rubrum* vielversprechende Ergebnisse in den IC_{50} -Bestimmungen zeigte (siehe Abschnitt 6.1 sowie Abschnitt 6.2) und früh im Projekt zur Verfügung stand. Die Verwendung von Eudragit[®] E als Filmbildner in der Formulierung wurde einer Arbeit von NAUMANN *et al.* entnommen. Eudragit[®] E findet als filmbildendes Polymer gewöhnlicherweise Anwendung als Filmüberzug für Tabletten (Geruchs- und Geschmacksmaskierung).^[219] In Tab. 6.3 ist die im Rahmen dieser Arbeit optimierte Lackzusammensetzung abgebildet.

Tab. 6.3.: Formulierung für die Hitsubstanz Deoxyshikonin (**20**) in der ersten Testung am infizierten Nagelmodell.

Inhaltsstoff	% (m/m)
Eudragit [®] E100	18
Ethylacetat	74
Triacetin	2
Butylacetat	5
Deoxyshikonin (20)	1

Die eingesetzte Menge des Wirkstoffs Deoxyshikonin (**20**) wurde unter Erwärmen und Verwendung eines Ultraschallbads in der Lackformulierung gelöst. Die Zusammensetzung des Lösungsmittels aus Ethyl- und Butylacetat wurde gewählt, um ein schnelles Verdampfen zu verhindern, da das Auftragen und die Handhabung unter Verwendung von Aceton oder DCM durch die schnelle Trocknung Schwierigkeiten bereitet. Teile des Lacks trockneten bereits vor Auftragen auf der Membran. Ethanol, wie es in vielen medizinischen Lacken eingesetzt wird (Loceryl[®], Ciclopoli[®]), war auf Grund der Lösungseigenschaften von **20** die zweite Wahl. Der Zusatz von DMSO führte zu

einer herabgesetzten Aushärtung des Polymers. Auf den Einsatz von DMSO wurde verzichtet, um den Wirkstoff gezielt auf der Membran über einen längeren Zeitraum platzieren zu können.

Für den Versuch wurden insgesamt 9 Membranen auf mit *T. rubrum*-Kultur angeimpften Agar in Petrischalen für 7 Tage bei 29 °C inkubiert. Drei dieser Membranen sind in Abb. 6.9 A zu sehen, bevor sie weiter bearbeitet wurden. Nachdem sie vom farblosen Myzel befreit wurden, wurden sie dem Agar entnommen, von Agarresten befreit und umgedreht auf den frischen Agar in einer sterilen Petrischale gelegt. Im Anschluss wurden die Membranen wie nachfolgend aufgeteilt und vorbereitet: drei Membranen mit Wirkstoffformulierung, drei als Positivkontrolle (Loceryl®) und drei als Wachstumskontrolle ohne Wirkstoff.

Das Auftragen der selbst erstellten Lackformulierung war auf Grund der Viskosität komplexer als bei der Positivkontrolle. Da sich ein gleichmäßiger roter Film bildete (siehe Abb. 6.9 B), wurden freie Stellen auf der Oberfläche jedoch erkannt und ebenfalls bedeckt. Die geringe Viskosität von Loceryl® führte zu einem starken Spreiten und einer gleichmäßigen Verteilung auf der Oberfläche der Membran. Nach einer Trocknungszeit von 15 min wurde für weitere vier Tage inkubiert. Dieser Durchlauf wurde ohne Bestrahlung durchgeführt, um das Modell zunächst zu etablieren. Anschließend wurden die Membranen visuell ausgewertet.

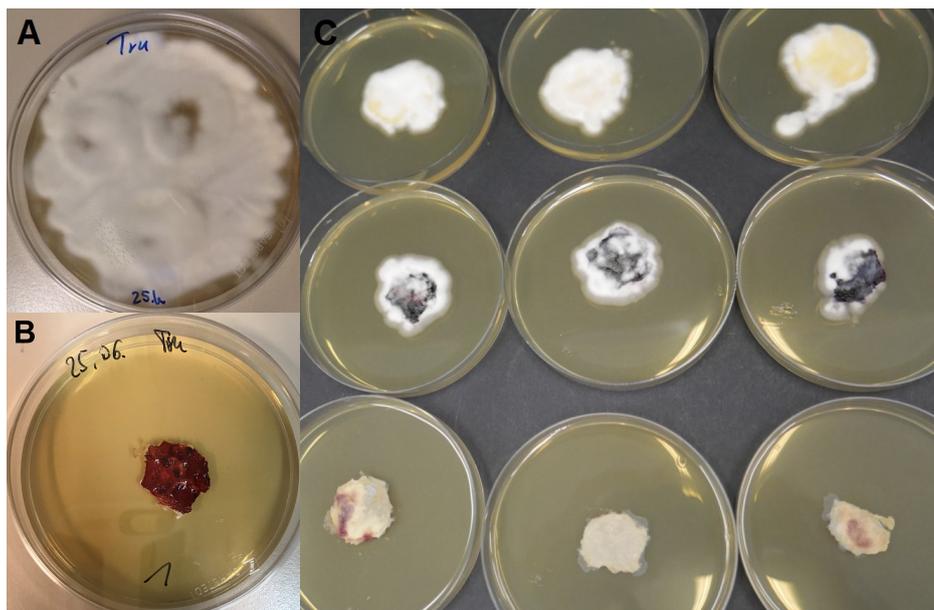


Abb. 6.9.: **A:** Mit *T. rubrum*-Kultur infizierte und überwachsene Membranen nach 7 Tagen Inkubationszeit (aus einem vorherigen Versuch) **B:** Mit Wirkstoffformulierung (Deoxyshikonin (**20**)) behandelte Membran nach der Trocknung und vor der Inkubation **C:** Ergebnisse nach weiteren vier Tagen Inkubationszeit (**Oben:** Wachstumskontrolle, **Mitte:** Wirkstoffformulierung, **Unten:** Positivkontrolle Loceryl®).

Die Wachstumskontrolle im Nagelmodell zeigte um und auf den Membranen Wachstum von farblosen *T. rubrum*-Kulturen. Auch bei den mit Wirkstoffformulierung (Deoxyshikonin (**20**)) versehenen Membranen war dieses Wachstum vorhanden und fand sowohl auf als auch um die Membranränder statt. Lediglich die Positivkontrolle zeigte keine neuen Kulturen. Auffällig war die starke Verdunkelung der roten Farbe der mit Wirkstoffformulierung präparierten Membranen.

In der Wiederholung des Versuchs wurden die gleichen Testbedingungen verwendet. Als ergänzender Schritt wurde dieses Mal mit Licht einer Wellenlänge von 519 nm bestrahlt (siehe Abb. 6.8) sowie eine *vehicle*-Kontrolle (Formulierung ohne Wirkstoff) hinzugefügt. In der nachfolgenden Abb. 6.10 sind die Membranen nach dem Auftragen der drei Formulierungen (*vehicle*-Kontrolle, Wirkstoffformulierung und Positivkontrolle) und drei Tagen Inkubationszeit zu sehen.

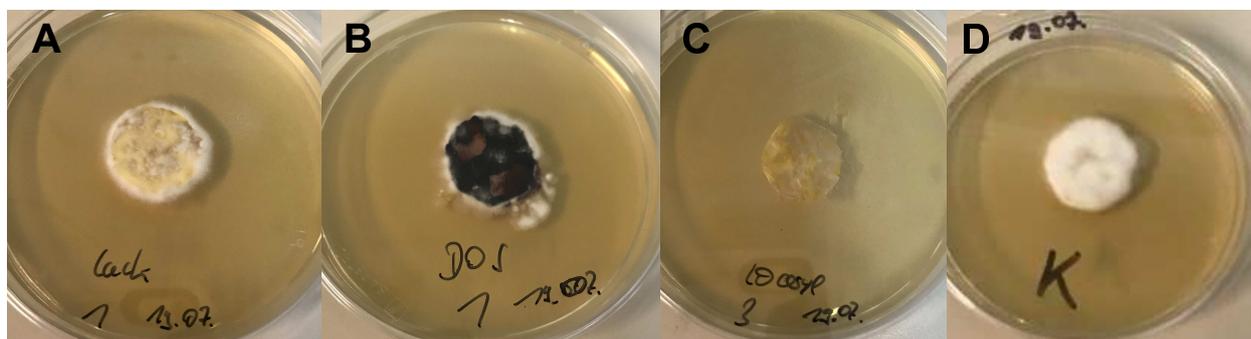


Abb. 6.10.: Abgebildet sind die infizierten Membranen nach Auftragen der Formulierungen und einer Inkubationszeit von drei Tagen. Sie wurden jeweils für 10 min mit Licht einer Peakwellenlänge von 519 nm (4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) bestrahlt. **A:** Membran mit *vehicle*-Kontrolle. **B:** Membran mit Wirkstoffformulierung (Deoxyshikonin (20)). **C:** Membran mit Positivkontrolle (Loceryl®). **D:** Wachstumskontrolle.

Bereits nach der Inkubationszeit war eine sichtliche Verfärbung des Lackes (siehe Abb. 6.10 B) und der darunter liegenden Membran eingetreten. Eine anschließende Bestrahlung (10 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) hatte keinen Effekt, da wie in Abb. 6.10 zu sehen, bereits *T.rubrum*-Kulturen am Rand der Membranen herauswuchsen. Im Vergleich zur Wachstumskontrolle wurde sowohl das Wachstum der Membranen mit *vehicle*- als auch das mit Wirkstoffformulierung beeinträchtigt, was auf einen wachstumshemmenden Effekt der Lackbestandteile zurückzuführen ist. Das Wachstum der Membranen mit Positivkontrolle war bereits komplett gehemmt (siehe Abb. 6.10 C).

Nach drei weiteren Inkubationstagen folgte die abschließende Auswertung der Proben. Auf Grund von Kontaminationen durch unbekannte Kulturen, dem schnellen Wachstum von *T. rubrum* und der Instabilität der Wirkstoffformulierung wurde kein abschließendes Fazit bezüglich der Photoaktivierbarkeit im Keratin gebildet, aber an Hand der Resultate die nachfolgenden Optimierungen an der Versuchsdurchführung vorgenommen.

Ein Grund für die fehlende Wirksamkeit der Wirkstoffformulierung lieferte die Inkompatibilität zwischen Wirkstoff Deoxyshikonin (20) und *vehicle*. 20 in Kombination mit dem Filmbildner führte zu einer Verfärbung der Membran (siehe Abb. 6.11 B). Diese resultiert aus der Struktur des Filmbildners Eudragit® E. Es besteht aus den drei Copolymeren Dimethylaminoethylmethacrylat, Butylmethacrylat und Methylmethacrylat in einem Verhältnis von 2:1:1.^[219] Die endständigen Dimethylaminogruppen besitzen ein freies Elektronenpaar am Stickstoff und dadurch die Möglichkeit, nukleophil mit dem chinoiden Teil des Deoxyshikonins (20) zu reagieren. Aus diesem Grund wurde das filmbildende Polymer Eudragit® E im nächsten Schritt durch Eudragit® RL substituiert. Desweiteren wurden, um die Kontamination der Agarschalen während der Handhabung mit der

Lampe zu verhindern, die Bestrahlung durch den geschlossenen Deckel durchgeführt. Da das Polypropylen der Petrischalen das sichtbare Licht (400-700 nm) zu 93 - 100 % transmittieren, führt dieser Schritt zu keiner Beeinträchtigung in der Aktivierung des eingesetzten Deoxyshikonin (**20**).^[220]

6.4.2. Zweite Testreihe

Durch den Einsatz des neuen filmbildenden Polymers Eudragit[®] RL wurden die Interaktionen zwischen Wirkstoff (DOS, **20**) und dem *vehicle* verhindert. Die Formulierung wurde an die Positivkontrolle Loceryl[®] angelehnt. Eudragit[®] RL wird im Ph. Eur. unter dem Namen Ammoniummethacrylat-Copolymer (Typ A) geführt und wird in medizinischen Nagellacken verwendet (Loceryl[®], Amofin[®]). Anstelle der Dimethylaminogruppen besitzt es kationisch geladene Trimethylammoniumreste. Durch das Fehlen des freien Elektronenpaares ist eine nukleophile Reaktion mit **20** nicht möglich.

Auch die Lösungsmittelzusammensetzung wurde von Ethyl- und Butylacetat auf ein Gemisch mit zusätzlicher Beigabe von Ethanol geändert. Tab. 6.4 zeigt die Zusammensetzung der modifizierten Formulierung für die *vehicle*-Kontrolle (oben) und die Wirkstoffformulierung (unten). Die zuvor angesprochene geringere Löslichkeit in Ethanol wurde auch in dieser Zusammensetzung beobachtet, wurde jedoch zu Gunsten einer besseren Vergleichbarkeit zur Positivkontrolle Loceryl[®] in Kauf genommen.

Tab. 6.4.: Zusammensetzung der angepassten *vehicle*-Kontrolle und der Wirkstoffformulierung mit Deoxyshikonin (**20**) für eine erneute Testung an mit *T. rubrum* infizierten Membranen. Durch Austausch des Filmbilders wurde die Inkompatibilität zum Wirkstoff Deoxyshikonin (**20**) aufgehoben.

Inhaltsstoff	% (m/m)
Eudragit [®] RL PO	22.5
Ethanol	24.5
Ethylacetat	24.5
Butylacetat	24.5
Triacetin	4.0
Eudragit [®] RL PO	22.5
Ethanol	24.3
Ethylacetat	24.3
Butylacetat	24.3
Triacetin	4.0
Deoxyshikonin	0.5

Eine im Vorfeld zur eigentlichen Durchführung angefertigte Probe der Formulierung mit Deoxyshi-

konin (20) zeigte erst nach etwa sieben Tagen eine sichtbare Verdunkelung der Farbe. Durch die kurze Inkubationszeit von Membran und Wirkstoff von drei Tagen wurde die Wirkstoffformulierung für die Testung an der infizierten Membran verwendet.

Für den Versuch wurden 24 Membranen mit *T. rubrum*-Kultur angeimpft und für sechs Tage inkubiert. Die angeimpften Membranen wurden anschließend mit ihrer überwachsenen Seite auf das frische Nährmedium von Petrischalen gelegt und mit *vehicle*- sowie Wirkstoffformulierung (siehe Tab. 6.4), bzw. Referenzlack (Loceryl®) versehen. Pro Formulierungsansatz mit Wirkstoff wurden je drei Membranen auf einzelne Petrischalen aufgeteilt. Jeweils eine Petrischale von jedem Ansatz wurde im Folgenden einfach und eine doppelt bestrahlt. Die verbliebenen drei wurden als Kontrolle ohne Bestrahlung weiter inkubiert. Die *vehicle*-Kontrolle wurde auf jeweils zwei Membranen pro Bestrahlungsvariante aufgetragen und die Referenz auf jeweils drei Membranen. Die selbst erstellten Lackformulierungen waren beim Auftragen auf die Membranen wie bei der ersten Formulierung (siehe Tab. 9.6) viskos und mussten daher sorgfältig verteilt werden. Nach 15 minütiger Trocknungszeit, wurden die Petrischalen bestrahlt. Die Lampe wurde, um Kontaminationen bei der Handhabung zu vermeiden, auf den Deckel der geschlossenen Petrischale gelegt. Die Bestrahlungsdauer betrug wie bei der vorherigen Durchführung 10 min. Die zweite Bestrahlung erfolgte nach 24 h Inkubation mit aufgetragenen Formulierungen. Die Ergebnisse dieser Durchführung sind in Abb. 6.11 A - C abgebildet.

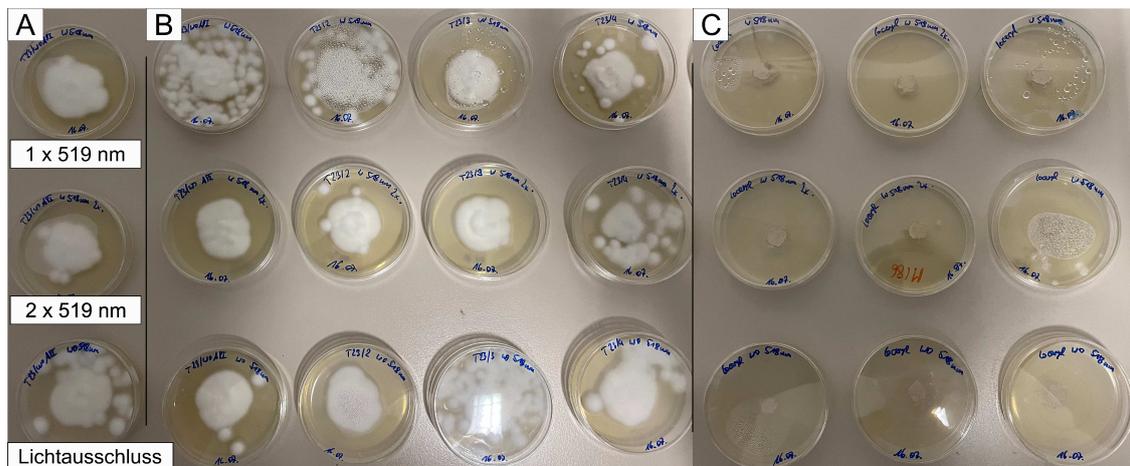


Abb. 6.11.: Abgebildet sind die Agarschalen nach Beenden des Versuchs. Die obere Reihe beinhaltet die einfach (10 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung), die mittlere die doppelt (2 x 10 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) und die untere die nicht-bestrahlten Membranen. **A:** Membranen mit *vehicle*-Kontrolle **B:** Membranen mit Wirkstoffformulierungen **C:** Membranen mit Positivkontrolle (Loceryl®).

Wie zuvor hemmte der Referenzlack Loceryl® auf allen eingesetzten Membranen das Wachstum der *T. rubrum*-Kultur (siehe Abb. 6.11 C). Auch unter Bestrahlung zeigte sich dieses Ergebnis. Die selbst erstellten Formulierungen mit dem Wirkstoff Deoxyshikonin (20) hingegen zeigten auch nach Bestrahlen keine fungizide Wirkung (siehe Abb. 6.11 B). Wie zuvor spielt der Zeitpunkt der Bestrahlung für die Aktivierung der Substanz eine essentielle Rolle. Dadurch, dass sich der Erreger sieben Tage vor Auftragen des Wirkstoffes in der Membran ausbreitet, liegt im Keratin

eine hohe Belastung an Sporen und Pilzzellen vor. Sobald die infizierte Membran beim Übertragen in eine neue Petrischale auf frischen Agar trifft, beginnt sich die Kultur schnell auszubreiten. Da die Wirkung der zu untersuchenden Wirkstoffe erst mit Bestrahlung aktiviert wird, kommt die Aktivierung zeitlich zu stark verzögert.

Daher war das zunächst verwendete Nagelmodell im Sinne einer infizierten Membran für die Untersuchung photodynamischer Wirkstoffe wie die Naphthazarinderivate in dieser Form noch nicht geeignet und wurde weiter optimiert. Während der Optimierung wurde auch die Darreichungsform als Lösung getestet, um jegliche Interaktionen mit dem Polymer auszuschließen. Dafür wurde **20** in DMSO gelöst direkt aufgetragen. Dies führte zu dem Ergebnis, dass der Wirkstoff zu einem geringen Prozentsatz in die Membranen eindrang, aber auch zu einem großen Teil auf der Oberfläche auskristallisierte. Zu erkennen war das an dem typischen grün-metallisch schimmernden Glanz der kristallinen Naphthazarinderivate.

Dies geschah durch die hygroskopischen Eigenschaften des DMSO, sodass Wasser aus der Membran gezogen wurde und das Deoxyshikonin (**20**) aus dem DMSO/Wasser-Gemisch ausfiel. Andere Lösungsmittel wie Ethylacetat oder Aceton waren ebenfalls nicht geeignet, da diese schnell verdampften, was ein ähnliches Resultat wie beim DMSO zur Folge hatte. Daher wurde auch in den anschließenden Tests eine Formulierung mit einem Filmbildner verwendet.

Viele der angeimpften Agarschalen wiesen die zuvor erwähnte Kontamination auf. Die verschiedenen Schritte, um die Membranen von Petrischale zu Petrischale zu übertragen, bedürfen das Hantieren der Membranen außerhalb der sterilen Bereiche. Da die Arbeiten zudem ohne Sterilbank durchgeführt wurden, war die Umgebungsluft ein weiterer Kontaminationsweg. Daher traten Kontaminationen auch bei Wiederholungen von Versuchsdurchführungen wie weiter oben beschrieben auf. Die Form der Kontamination war bei jedem Auftauchen dieselbe, eine matte bis glänzend schleimige Erscheinung. Ihr Wachstum führte zur Verdrängung der durch Animpfen eingebrachten *T. rubrum*-Kultur. In der nachfolgenden Abb. 6.12 ist ein Beispiel zu sehen.



Abb. 6.12.: Petrischale mit Rinderhufmembranen einer späteren Testung im infizierten Nagelmodell mit *T. rubrum*. Nach dem Animpfen und der anfänglichen Inkubationszeit, trat eine Bakterienkontamination des Agars auf.

Unter dem Mikroskop konnte die Kontamination als eine Bakterienkultur ohne genauere Einordnung identifiziert werden. Der verwendete Agar wurde für die nachfolgenden Durchführungen zusätzlich mit Penicillin und Streptomycin versetzt (siehe Abschnitt 9.3.2). Durch Einführen die-

ses Selektionsmediums, wurden diese zuvor häufig auftretenden Kontaminationen vollständig unterbunden.

6.4.3. Bestimmung der Erregerlast in den Membranen

Das Animpfen der Membranen mit einer Inkubationszeit von bis zu sieben Tagen vor dem Auftragen der Formulierungen führte zu einer sehr hohen Anzahl an Pathogenen im Keratin, die nicht die Realität am Nagel widerspiegelt. Wie im Abschnitt zuvor bereits angesprochen, führte dies beim Überführen auf den frischen Agar zu einem schnellen Ausbreiten der *T. rubrum*-Kultur von der Membran auf den Agar, sodass die Diffusion des Wirkstoffes zu gering war, um noch eine Wirkung entfalten zu können. Da dieses Verhalten der Erregerkultur nicht der Realität einer Onychomykose im Nagel entspricht, musste eine optimale Zeit für das Bewachsen (Animpfen) der Membranen gefunden werden, damit ausreichend *T. rubrum*-Zellen in der Membran angesiedelt sind, um sie zusammen mit der Wirkstoffformulierung weiter inkubieren zu können. Waren nicht genügend Erregerzellen vorhanden kam es vor, dass diese beim Auftragen der Formulierung durch das eingesetzte Lösungsmittel abstarben. Daher wurde für nachfolgende Testung an der infizierten Membran zunächst eine Reihe von variierenden Inkubationszeiten untersucht und die geeignetste herausgefunden. So wurde die Erregerlast, die nach der Inkubation von sieben Tagen zu hoch war und die einer echten Onychomykose bei weitem überstieg, reduziert und der Versuchsdurchführung des Nagelmodells mit infiziertem Keratin angepasst. Desweiteren wurde somit die Zersetzungen der Membranen, die sich nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen in der Brüchigkeit beim Überführen auf frisches Agarmedium zeigte, verhindert.

Zunächst wurden Agarplatten wie in den vorherigen Versuchen mit *T. rubrum*-Kultur angeimpft, indem sie mit einem Wattestab bestrichen wurden, und mit Membranen belegt. Anschließend wurde sieben Tage lang vier Membranen pro Tag auf frische Agarplatten übertragen. Zwei Membranen wurden beim Überführen umgedreht, sodass die Kontaktseite zum Agar/Pathogen anschließend nach oben zeigte. Die überführten Membranen wurden täglich beobachtet, um das Wachstum der Kulturen auf den nun angeimpften Membranen nachzuverfolgen. Dabei wurde schnell ersichtlich, dass nach einem Tag Animpfzeitⁱⁱⁱ zu wenig, bzw. nur ein oberflächliches Animpfen erfolgte, da die Membranen im Anschluss auf dem frischen Agar erneut eine Zeit von bis zu sechs Tagen benötigten, um das gewünschte Wachstum zu zeigen. Die Membranen, die nach den Tagen 2 bis 4 überführt wurden, wiesen ein entsprechend höheres Wachstum auf. Bereits die Membranen, die am zweiten Tag der Animpfzeit überführt wurden, zeigten nach nur zwei weiteren Tagen Inkubationszeit sichtbaren Bewuchs. Vier Tage nach dem Überführen waren diese vollständig überwachsen (siehe Abb. 6.13).

ⁱⁱⁱIm Folgenden ist mit Animpfzeit die Verweildauer der Membran auf der ursprünglichen Agarplatte vor dem Übertragen auf eine neue sterile Agarplatte gemeint.

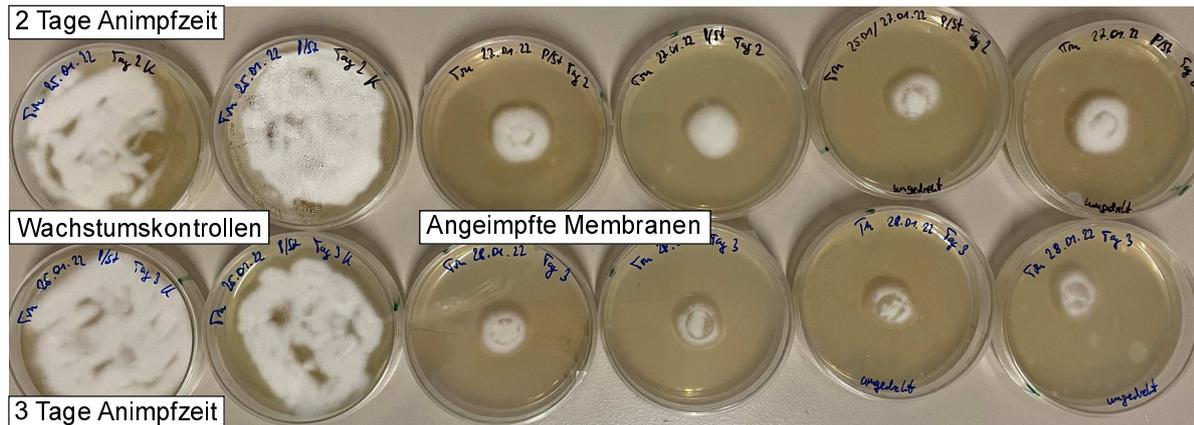


Abb. 6.13.: Das Foto entstand vier Tage nach der Überführung der oberen bzw. drei Tage nach Überführen der unteren Reihe und zeigt bei beiden Reihen ein Wachstum der *T. rubrum*-Kultur um und auf der Membran. **Oben:** Überführte Membranen (zwei Tage Animpfzeit) und die Petrischalen, denen sie entnommen wurden als Wachstumskontrolle. **Unten:** Überführte Membranen (drei Tage Animpfzeit) und ihre Wachstumskontrolle.

Die Konsistenz des Keratins dieser Membranen war unverändert und sie ließen sich ohne Schwierigkeiten handhaben. Der Bewuchs auf der Membran Oberfläche verdeutlichte, dass auch das Innere des Keratins infiziert und für das Nagelmodell bereits geeignet war.

Die Membranen, die nach 5 bis 7 Tagen Animpfzeit überführt wurden, waren für weitere Versuche nicht geeignet, da sie durch die keratinolytischen Eigenschaften von *T. rubrum* instabil wurden und schnell zerrissen.^[221] Desweiteren bildete sich nach dieser Zeit bereits so viel Myzel auf der Oberfläche, dass sie vor dem Überführen von diesem zunächst befreit werden mussten. Durch nicht ausreichend entferntes Myzel traten mitunter unabsichtliche Kontamination des frischen Agars auf. So zeigte sich anhand der Wachstumsuntersuchungen, dass nach zwei bis drei Tagen ein optimaler Bewuchs der Membranen vorlag, um sie zusammen mit der Wirkstoffformulierung weiter inkubieren zu können, ohne dass ein vollständiger Bewuchs mit *T. rubrum*-Kultur eintrat.

6.4.4. Dritte Testreihe

Nicht nur die Animpfzeit der Membranen wurde auf zwei Tage verringert und die Verwendung des Selektionsmediums eingeführt, sondern auch der Ablauf der Versuchsdurchführung wurde angepasst. Der Wirkstoff wurde ein Tag nach Animpfen der Membranen (Tag 2) aufgetragen und einen weiteren Tag zusammen mit diesen inkubiert, bevor das Bestrahlungsschema (Tag 3) begonnen wurde. Die Bestrahlung nach erfolgtem Eindringen des Wirkstoffes wurde drei Mal durchgeführt (2 x 5 min, 1 x 10 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung). Auch das zweimalige Auftragen der Wirkstoffformulierungen passte das vorliegende Modell besser an die photoaktivierbaren Substanzen an, da eine Art Desinfektion der noch unbehandelten Oberfläche stattfand. So wurden unabsichtliche Kontaminationen des Agars vermieden. Der vollständige Ablauf der Testdurchführung ist in Abb. 6.14 dargestellt.

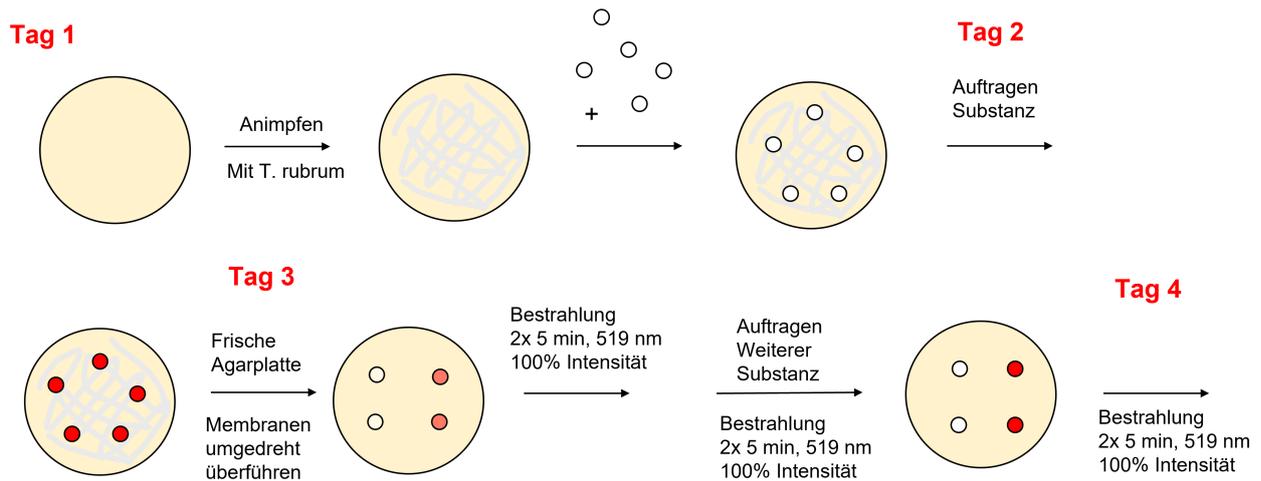


Abb. 6.14.: Abgebildet ist die optimierte Versuchsdurchführung des infizierten Nagelmodells. Neben einer Verkürzung der Animpfzeit, wurde das Bestrahlungsschema angepasst, sodass die Substanz besser aktiviert wurde.

Insgesamt wurden drei Petrischalen mit *T. rubrum*-Kultur angeimpft (siehe Abschnitt 9.3.2). Auf dem angeimpften Medium wurden anschließend jeweils in einer Petrischale fünf Rinderhufmembranen platziert und für einen Tag bei 29 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde jeweils die Testsubstanz bzw. die *vehicle*-Kontrolle sowie die Positivkontrolle Loceryl[®] mit 15 µL topisch auf die mittlerweile infizierten Rinderhufmembranen aufgetragen. Dies geschah mit Hilfe einer Eppendorf[®]-Pipette. Die Formulierungszusammensetzung ist im Nachfolgenden gezeigt:

- **vehicle-Kontrolle:**
 - kosmetischer Nagellack (Nitrocellulosebasis)/EE (1:1)
- **Wirkstoffformulierung 1 (DOS1):**
 - 5 mg/mL Deoxyshikonin (20)
 - kosmetischer Nagellack (Nitrocellulosebasis)/EE (1:1)
- **Wirkstoffformulierung 2 (DOS2):**
 - 10 mg/mL Deoxyshikonin (20)
 - kosmetischer Nagellack (Nitrocellulosebasis)/EE (1:1)

Bei dieser Lackformulierung handelte es sich um einen handelsüblichen, kosmetischen Klarlack auf Basis von Nitrocellulose (siehe Abschnitt 9.3.2). Dieser Filmbildner, hauptsächlich in kosmetischen Nagellacken verwendet, zeigte in Kombination mit Deoxyshikonin (20) auch nach über zwei Wochen keine Verfärbung der Lösung, sodass eine direkte Interaktion von Bestandteilen und Wirkstoff ausgeschlossen werden konnte. Da der Klarlack eine hohe Viskosität aufwies, wurde er zu gleichen Teilen mit EE versetzt. Das übte auch einen positiven Effekt auf die Löslichkeit des Wirkstoffes 20 aus. Deoxyshikonin (20) wurde ohne Zuhilfenahme von Wärme und Ultraschall vollständig bis 10 mg/mL gelöst.

Nachdem der Lack aufgetragen war und ein weiterer Tag Inkubationszeit folgte, wurden die Membranen auf frische, nicht infizierte Agarplatten überführt. Das Verteilungsschema ist in der nachfolgenden Abb. 6.15 gezeigt.

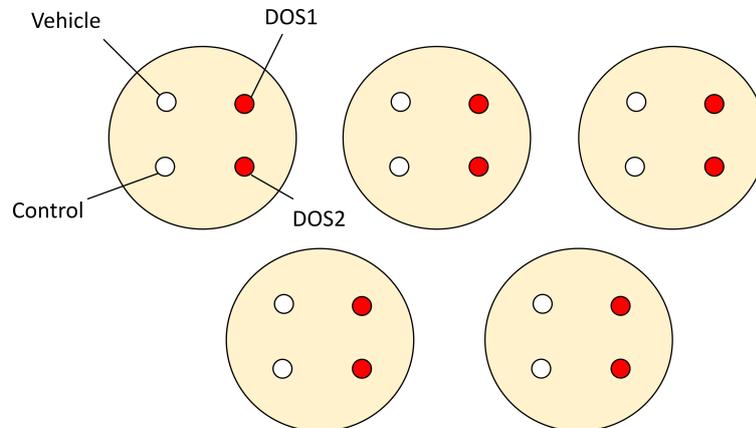


Abb. 6.15.: Schematische Darstellung der Verteilung der Proben für die Testung an der infizierten Membran (*T. rubrum*). **DOS1:** DOS 5 mg/mL, Kosmetiklack auf Nitrocellulosebasis mit Ethylacetat verdünnt (1:1), **DOS2:** DOS 10 mg/mL, Kosmetiklack auf Nitrocellulosebasis mit Ethylacetat verdünnt (1:1), **Vehicle:** Kosmetiklack auf Nitrocellulosebasis mit Ethylacetat verdünnt (1:1), **Positivkontrolle:** Unbehandelte Wachstumskontrolle.

Anschließend erfolgte photodynamisch die erste Bestrahlung (5 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung), um den applizierten Wirkstoff, der auf der Unterseite der Membran bereits für einen Tag in das Keratin eingedrungen ist, zu aktivieren. Darauf folgend wurde neue Lacklösung (jeweils 15 µL), dem zuvor gezeigten Schema folgend, auf die noch unbehandelte Seite der Keratinmembran aufgetragen. Nach einer Trocknungszeit von 15 min wurden die behandelten Membranen erneut für jeweils 5 min mit einer Peakwellenlänge von 519 nm (4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) bestrahlt. Dadurch wurde der Wirkstoff auf der Oberfläche der Membran aktiviert und die dort befindlichen Pathogene abgetötet.

Nach einem Tag Inkubations- und Permeationszeit wurden die Präparationen erneut bestrahlt (2 x 5 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) und abschließend für acht Tage inkubiert, um danach das Pilzwachstum von *T. rubrum* in und um den Keratinmembranen zu bestimmen. Das Ergebnis ist in der nachfolgenden Abb. 6.16 gezeigt.

Auf dem oberen Foto in Abb. 6.16 sind die Membranen zu sehen, die mit Licht einer Peakwellenlänge von 519 nm bestrahlt wurden. Die mit Wirkstoffformulierung (DOS1 und DOS2) behandelten Membranen (jeweils auf der rechten Seite der Schalen) zeigten nach Photoaktivierung eine erfolgreiche antimykotische Hemmung der *T. rubrum*-Kultur. Lediglich eine Membran der niedrig-dosierten Formulierung DOS1 (5 mg/mL) zeigte nach Bestrahlung ein signifikantes Wachstum des Pathogens, welches im Vergleich zu den Kontrollen (jeweils links) jedoch gering ist. Die nicht-bestrahlten Membranen mit den Wirkstoffformulierungen (unteres Foto, jeweils rechts) bestätigen die im oberen Foto beschriebene Photoaktivierung von Deoxyshikonin (20). Die *vehicle*-Kontrollen und die Wachstumskontrollen wiesen ein von der Bestrahlung unabhängiges Wachstum der *T. rubrum*-Kultur auf. So wurde zeitgleich nachgewiesen, dass weder die bei der Bestrahlung entstehenden Tempera-

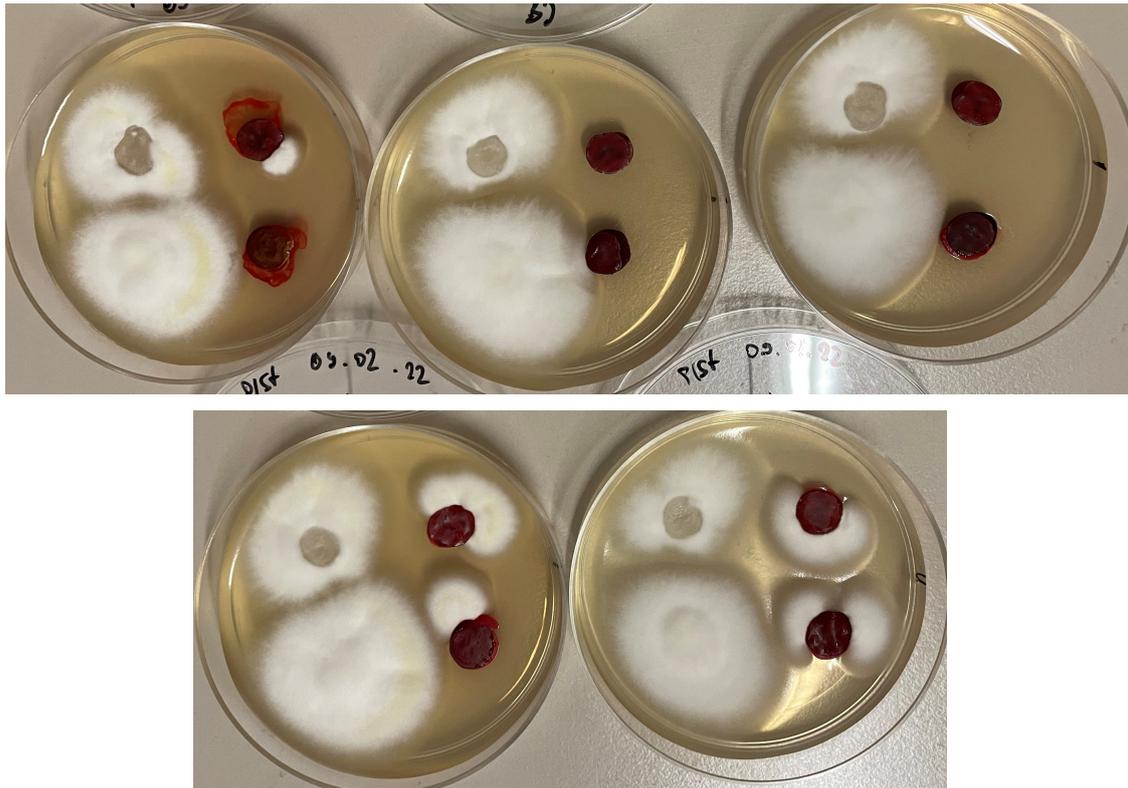


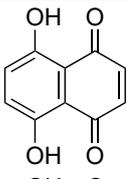
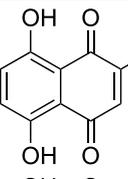
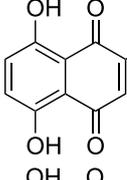
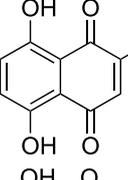
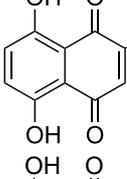
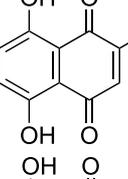
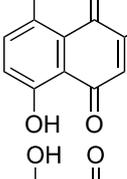
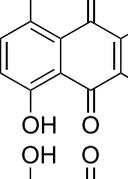
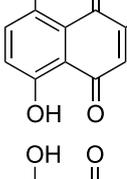
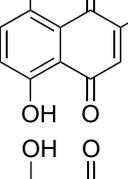
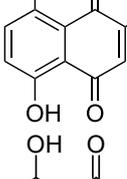
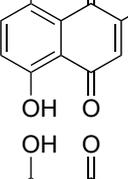
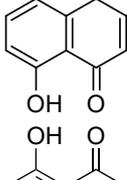
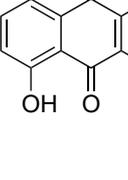
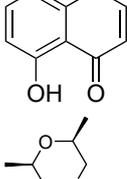
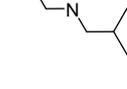
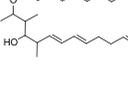
Abb. 6.16.: Ergebnis der Testung am optimierten infizierte-Membranmodell (*T. rubrum*). Die Verteilung der Membranen ist in Abb. 6.15 dargestellt. **Oben:** Die bestrahlten Agarplatten (2 x 2 x 5 min, 519 nm, 100 %, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm²). **Unten:** Die Agarplatten der Dunkelkontrolle.

turunterschiede, noch die Strahlung mit einer Wellenlänge von 519 nm selbst eine Auswirkung auf das Wachstum ausübte. Im direkten Vergleich der beiden Kontrollen kann ein geringer Effekt des *vehicles* auf den Erreger erkannt werden, der jedoch nicht ausschlaggebend für die biologische Wirkung des Naphthazarinderivats **20** ist. Die hier nicht abgebildeten Positivkontrollen (Loceryl®) zeigten ebenfalls eine Hemmung des Erregers unabhängig von der eingesetzten Bestrahlung.

Die photodynamische Aktivierung der Hitsubstanz Deoxyshikonin (**20**) wurde anhand der erfolgreichen Hemmung von *T. rubrum* nach Bestrahlung bestätigt. Die in diesem Abschnitt gezeigte Optimierung des infizierten Nagelmodells stellte dafür das passende Testverfahren dar. Die mitgeführten Kontrollen bestätigten dieses Ergebnis. Der nächste Schritt ist der Beweis am infizierten humanen Nagel. Um eine Vergleichbarkeit mit aktuellen topischen Therapien zu erhalten, bedarf es außerdem des Einsatzes standardmäßig empfohlener unterstützender Maßnahmen. Damit wird die Verwendung von Verbindungen beschrieben, die die Diffusionsrate von Antimykotika in den Nagel steigern und als Permeationsverstärker bezeichnet werden.^[31,36] Diese Substanzen (siehe Abschnitt 1.2) können die Struktur des kompakten Keratins lockern und so das Eindringen der keratinophilen Naphthazarinderivate weiter steigern. Angewendet werden diese Substanzen entweder direkt in der Formulierung des topischen Wirkstoffs oder in einer davon losgelösten Darreichungsform. Der am häufigsten eingesetzte Permeationsverstärker ist Harnstoff. Aktuelle Therapien und klinische Studien zu neuen Substanzen (auch photoaktivierbaren Substanzen)

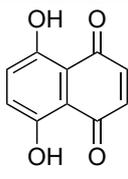
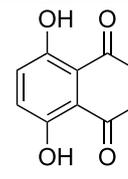
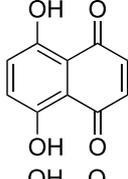
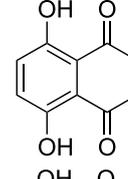
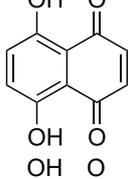
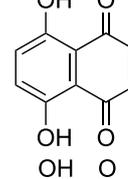
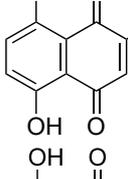
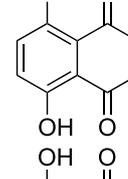
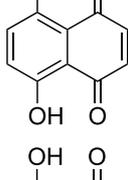
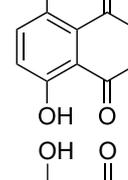
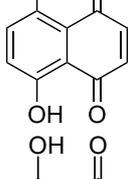
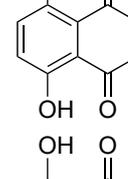
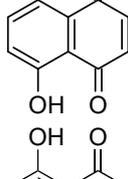
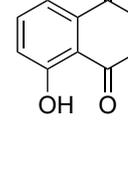
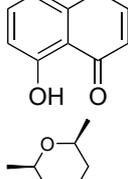
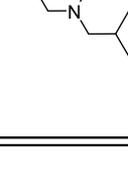
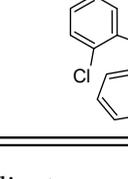
beinhalten die vorherige Behandlung der Nägel mit einer bis zu 40 %igen Urea-Creme.^[88–90,222,223] Diese führt wie eingangs beschrieben (siehe Abschnitt. 1.2) dazu, dass die Disulfidbrücken im Keratin reduziert werden und so der Zusammenhalt der proteinogenen Struktur des Keratins geschwächt wird. Daraus resultiert eine erleichterte Wirkstoffpenetration in den Nagel.^[31] Oft werden diese Cremes über einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen täglich aufgetragen und mit einem Abtragen der obersten Nagelschichten verbunden. Auf Grund der sehr dünnen Stärke der Membranen von 100 μm war eine mechanische Behandlung in dem hier durchgeführten Versuchsaufbau ausgeschlossen. Auch das Auftragen und anschließende Entfernen von Substanzen ist schwer zu realisieren, ohne die Membran zu beschädigen oder den Agar zu kontaminieren. Sowohl in Hinsicht auf die unterstützenden Maßnahmen, als auch in der eigentlichen Formulierung des Lackes, die bisher nicht unter dem Aspekt der Wirkstofffreisetzung sondern lediglich der Kompatibilität eingesetzt wurde, bestehen Möglichkeiten zur weiteren Steigerung der Wirkung der photoaktivierbaren Naphthazarinderivate.

Tab. 6.1.: Dargestellt sind die IC_{50} -Werte der eingesetzten Verbindungen gegen *C. albicans*. Der nicht-lineare *fit* wurde mit Prism 7 (GraphPad Software) angefertigt. Die oberen Werte geben die Wirkung ohne Bestrahlung an, die unteren mit Bestrahlung (10 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung, siehe Abschnitt 9.2.1). Je Wiederholung (n) wurden drei technische Replikate angefertigt.

#	Struktur	IC_{50} unbestrahlt [nM] bestrahlt [nM]	#	Struktur	IC_{50} unbestrahlt [nM] bestrahlt [nM]
12		2 219 ± 511 632 ± 175 (n=4)	82		10 933 ± 4 079 2 337 ± 846 (n=3)
85		- 715 ± 209 (n=3)	86		- 599 ± 289 (n=3)
89		- 556 ± 355 (n=3)	20		- 213 ± 55 (n=6)
19		- 1 484 (n=1)	84		- 2 746 ± 70 (n=2)
88		- 1 042 ± 185 (n=2)	80		- 7 646 ± 4 479 (n=2)
91		5 148 134 (n=1))	92		- 1 484 (n=1)
96		- 570 (n=1)	44		458 145 (n=1)
25		- - (n=1)			
100		28 086 32 717 (n=1)	31		692 ± 128 1 665 ± 886 (n=7)

-: kein *fit* möglich.

Tab. 6.2.: Dargestellt sind die in IC_{50} -Werte gegen *T. rubrum* eingesetzten Verbindungen und ihre mit Prism 7 (GraphPad Software) errechneten Werte. Die oberen geben die Wirkung ohne Bestrahlung an, die unteren mit Bestrahlung (10 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung, siehe Abschnitt 9.2.1). Jede Wiederholung (n) bestand aus drei technischen Replikaten.

#	Struktur	IC_{50} unbestrahlt [nM]	IC_{50} bestrahlt [nM]	#	Struktur	IC_{50} unbestrahlt [nM]	IC_{50} bestrahlt [nM]
12		2 476 ± 1 506 353 ± 237 (n=5)	-	82		-	87.6 ± 65.4 (n=2)
85		-	24.2 ± 20.6 (n=4)	86		-	13.0 ± 12.2 (n=3)
89		-	1.0 ± 0.3 (n=3)	20		-	32.2 ± 17.4 (n=5)
19		10 510 ± 6 917 781 ± 407 (n=3)	-	84		-	321 ± 212 (n=2)
88		-	42.7 (n=1)	80		-	244 ± 192 (n=3)
91		-	~2.9 ^a (n=1)	92		8142 3338 (n=1)	-
96		-	352 ± 150 (n=2)	44		-	64.9 (n=1)
25		-	- (n=1)				
100		4.5 4.4 (n=1)	-	103		114 ± 61 109 ± 51 (n=10)	-

-: kein fit möglich; ^a: Testung nur bedingt auswertbar.

Kapitel 7.

Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine effektive photodynamische Therapie der Onychomykose auf Basis der Wirkstoffklasse der Naphthazarine entwickelt werden. Dabei beruht sie auf dem Prinzip, eine topische Formulierung eines Naphthazarinderivats am Nagel einzusetzen, um eine Sättigung des Wirkstoffs im Keratin zu erhalten. Durch gezielte Bestrahlung mit Licht der geeigneten Wellenlänge wird die in der Membran angereicherte Substanz photodynamisch aktiviert. So kann die antimykotische Wirkung zielgerichtet an der betroffenen Stelle induziert werden.

Die Wahl, das Naphthazaringerüst als *scaffold* für eine neue Substanzklasse und weitere Untersuchungen zu verwenden, wurde neben der postulierten Keratinophilie auf Basis ihrer photochemischen Eigenschaften getroffen. Sie besitzen auf Grund ihrer einzigartigen Struktur ein Absorptionsmaximum im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Dieses Licht, welches in einem Bereich von 500 - 550 nm liegt, ist dazu geeignet, das Keratin des menschlichen Nagels zu durchdringen, ohne absorbiert zu werden.^[44] Desweiteren sind Naphthochinone im Allgemeinen und Naphthazarine im Speziellen bekannt für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Bestrahlung.^[95] Dieser Mechanismus ist für den Einsatz einer Substanzklasse als photoaktivierbare Verbindung (*photosensitizer*) in der photodynamischen Therapie essentiell.

Um eine Bandbreite an verschiedenen Naphthazarinderivaten den gestellten Voraussetzungen nach (siehe Abschnitt 3.1) testen zu können, wurden diese zunächst synthetisch dargestellt, da nur wenige Substanzen **12**, **19** und **20**) kommerziell erhältlich waren (siehe Kap. 4).

Die Darstellungen der Zielverbindungen (siehe Abschnitt 4.3) konnte unter Verwendung einer zweifach-verlaufenden FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung in geringen Ausbeuten durchgeführt werden. Eine allgemeine Struktur der Derivate ist in Abb. 7.1 zu sehen.

Das Grundgerüst der Naphthazarine wurde dabei aus Hydrochinon (**37**) bzw. 1,4-Dimethoxybenzol

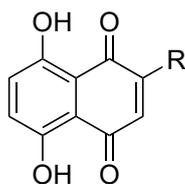


Abb. 7.1.: Die allgemeine Struktur der synthetisierten Naphthazarinderivate. Durch Substitution des Restes R, konnten verschiedene Funktionen in das Molekül eingebracht werden.

(45) und einer Reihe von Maleinsäure- bzw. Fumarsäurederivate aufgebaut. Letztere eigneten sich zum Einführen der angestrebten Substituenten R und konnten selbst über eine einstufige Synthese erhalten und dadurch derivatisiert werden. Die eingeführten Reste R bestanden aus verschiedenen langen und verzweigten Alkylketten (C₁-C₄) sowie einer Phenyl- und Hydroxylgruppe. Desweiteren wurden drei unterschiedlich aminierte und zwei doppelt-substituierte (Position 2 und 3) Naphthazarine dargestellt (siehe Abschnitt 4.3).

Neben einer biologischen Aktivität war für die Wahl der Substanzklasse die Keratinophilie entscheidend (siehe Abschnitt 3.1). Sie ist das Maß einer Verbindung, durch das Keratin diffundieren zu können. Bekannt als Henna-Farbstoff sind die Übergruppe der Naphthochinone seit Jahrhunderten als Färbemittel keratiner Strukturen wie Haaren, Haut, Nägel und Wolle bekannt und verwendet.^[145,183]

Diese postulierte Eigenschaft der Naphthazarine wurde in Experimenten an *bovinem* Rinderhufkeratin bestätigt. Als erstes wurde das Permeationsmodell der FRANZ-Diffusionszelle in Verbindung mit Keratinmembranen als geeignetes Modell für den Ersatz menschlicher Nägel herangezogen. Das Grundgerüst Naphthazarin (**12**) zeigte stellvertretend für die Derivate seiner Substanzklasse, geeignete Eigenschaften für eine topische Anwendung. **12** drang zwar in das Keratin ein und reicherte sich dort an, jedoch ging es nicht in die darunterliegende wässrige Akzeptorphase über. Die im Anschluss mit Lösungsmittel gewaschene und extrahierte Membran konnte nicht vom Farbstoff befreit werden, sodass die hohe Keratinophilie bestätigt werden konnte.

Um die Eindringtiefe in das Keratin zu bestimmen, wurde in einem weiteren Permeationsexperiment Deoxyshikonin (**20**) in einer selbsterstellten Formulierung den kommerziell erhältlichen Arzneimitteln Loceryl[®] und Ciclopoli[®] gegenübergestellt. Nach eindringen in eine 2 mm Dicke Keratinmembran für fünf Tage konnte anhand angefertigter Querschnitte und Vermessung mittels RAMAN-Mikroskopie, die Eindringtiefe ermittelt werden. Die Auswertung lieferte für den Wirkstoff Ciclopirox (**99**) des topischen Arzneimittels Ciclopoli[®] eine maximale Eindringtiefe von etwa 40 μm, wohingegen Deoxyshikonin (**20**) noch in einer Tiefe von über 50 μm nachgewiesen werden konnte. Die Messung von Amorolfiin (**100**) der topischen Arzneimittelformulierung Loceryl[®] lieferte keine auswertbaren Signale. Durch erfolgreichen Vergleich zur kommerziellen und optimierten Arzneiform Ciclopoli[®] konnte die hohe Keratinophilie von **20** unter Beweis gestellt werden, was gleichzeitig den Einsatz des NaphthazarinGrundgerüsts **12** in der ersten Permeationstestung als Referenz für die Naphthazarinderivate bestätigte.

Um die Photoaktivierbarkeit und eine daraus resultierende Wirksamkeit im biologischen Kontext zu überprüfen, wurden Flüssigmedien-basierte IC₅₀-Bestimmungen gegen die beiden Hauptpathogene *C. albicans* und *T. rubrum* durchgeführt.

An *C.albicans* zeigten sich die untersuchten Derivate mit einer hohen Wirksamkeit nach 10-minütiger Bestrahlung mit Licht einer Peakwellenlänge von 519 nm (4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) (siehe Abschnitt 6.1). Bis auf Verbindung **25** zeigten alle untersuchten Naphthazarinderivate eine photochemische Aktivierung. Dabei lagen viele Verbindungen nach der Bestrahlung, vor allem die mit steigender linearer Alkylkette **85** (715 ± 209nM), **86** (599 ± 289nM), **89** (556 ± 355 nM) und Deoxyshikonin (**20**) (213 ± 55 nM) in ihrer Wirksamkeit über der Standardreferenz Nystatin (**31**, 692 ± 128 nM). Für 2-Phenylnaphthazarin (**91**, 134 nM) und 2,3-Dichloronaphthazarin (**44**, 145 nM)

wurden ebenfalls potente IC₅₀-Werte ermittelt.

An *T.rubrum*-Kulturen zeigte sich ein ähnliches Bild für die durch Bestrahlung aktivierten Naphthazarine (siehe Abschnitt 6.2). Auch hier ergaben sich für die alkylierten Derivate IC₅₀-Werte, die den Wert der Referenz Clotrimazol (**103**, 114 ± 61 nM) übertrafen. **85** (24.2 ± 20.6 nM), **86** (13.0 ± 12.2 nM) und **20** (32.2 ± 17.4 nM) lieferten hohe Wirksamkeiten nach Bestrahlung, während **89** (1.0 ± 0.3 nM) sogar die topische Referenz Amorolfiin (**100**, Loceryl[®], 4.5 nm) übertraf. Wie bei der Testung gegen *C. albicans* zeigten **91** (2.9 nM) und **44** (64.9 nM) großes Potenzial für weitere Messungen.

Die erhaltenen Wirksamkeiten nach Bestrahlung zeigten an beiden Pathogenen ein Muster. Die Verlängerung der Alkylkette in 2-Position des Naphthazaringerüst (**12**) führte zu einer Verbesserung der Wirksamkeit an den Erregern. Diese Tendenz führte zu der Vermutung, dass die Naphthazarine mit steigender Kettenlänge die Fähigkeit erhalten, sich wie Tensidmoleküle (z.B. TritonTM X-100) in die Membran der Pathogene einzulagern und dort nach Aktivierung und Bildung von ROS direkten Schaden anrichten können. Eine weitere Syntheserieihe von Derivaten abermals verlängerter Kohlenstoffketten in 2-Position (C₇-C₁₂) könnte diese Aussage bestätigen. Weiterhin unterstützt wird diese Vermutung durch die bei photochemischer Aktivierung (Typ I) der Naphthazarine gebildeten freien Radikale, die durch Kettenreaktionen zu direkten Schädigungen in den Zellmembranen führen.

Im anschließenden Abschnitt der Arbeit wurden die Parameter der biologischen Testung mit denen der physikochemischen Untersuchungen in einem praxisnahen Testmodell vereint. Unter Verwendung von Keratinmembranen wurde ein infizierter Nagel simuliert. Zunächst wurde ein Modell nach LUSIANA *et al.* modifiziertes und den photoaktivierbaren Substanzen angepasst. Dieses Testmodell lieferte die in der nachfolgenden Abb. 7.2 dargestellten Ergebnisse.^[218]

Die obere Reihe zeigt die bestrahlten Proben, welche bei den mit **20** und Licht behandelten Membranen eine erfolgreiche antimykotische Wirksamkeit der Testsubstanz zeigen. Die untere Reihe besteht aus den unbestrahlten Dunkelkontrollen mit Deoxyshikonin-Behandlung, die ein starkes Pilzwachstum aufweisen und somit die effektive photodynamische Wirksamkeit von DOS in den bestrahlten Experimenten untermauern.

Die photodynamische Wirkung der Naphthazarine konnte anhand der Modellverbindung Deoxyshikonin (**20**) in diesem praxisnahen Testmodell demonstriert werden. Zukünftige Untersuchungen werden die Wirkung am infizierten menschlichen Nagel zeigen. Hierbei ist es ebenfalls von Bedeutung, die bei aktuellen topischen Therapien standardmäßig empfohlenen unterstützenden Maßnahmen anzuwenden, um eine entsprechende Vergleichbarkeit der Therapiekonzepte zu gewährleisten. Dazu zählen beispielsweise der Einsatz von Urea-haltigen Cremes am befallenen Nagel, um mittels des hoch dosierten Harnstoffs vor der eigentlichen Behandlung mit dem Wirkstoff die Nagelstruktur aufzuweichen und/oder das vorherige Abtragen oberer befallener Nagelschichten zu ermöglichen.

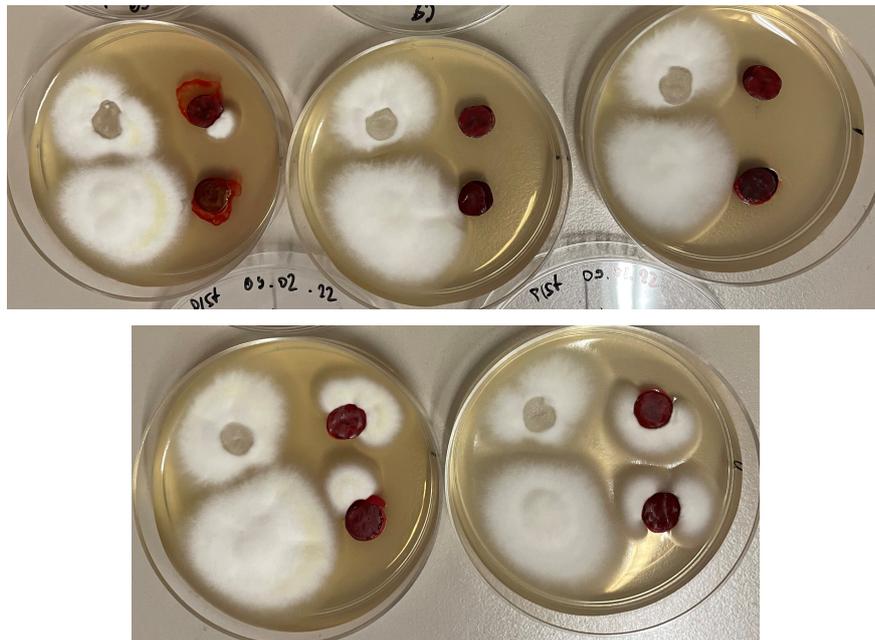


Abb. 7.2.: Ergebnis der Testung am optimierten Infizierte-Membranmodell (*T. rubrum*) mit Bestrahlung (obere Reihe, 4 x 5 min, 519 nm, 100 %, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm²) und die Dunkelkontrolle (untere Reihe). **Oben links:** *vehicle*-Kontrolle **Unten links:** Wachstumskontrolle. **Oben rechts:** Wirkstoffformulierung 1 (Deoxyshikonin (20), 5 mg/mL). **Unten rechts:** Wirkstoffformulierung 2 (Deoxyshikonin (20), 10 mg/mL).

Kapitel 8.

Ausblick

Nachdem die photoaktivierbare Wirkung der Naphthazarinderivate an den Erregern der Onychomykose grundlegend bestätigt wurde, bleiben für die zukünftige Anwendung am menschlichen Nagel verschiedene Punkte für Optimierungen offen. So ist das molekulare Verhalten und der Wirkmechanismus in der keratinen Umgebung noch nicht bekannt. Dabei wurde ebenfalls nicht abschließend geklärt, ob die Naphthazarine eine irreversible Bindung zum Keratin eingehen oder ob es sich um starke Affinitäten oder ionische Bindungen handelt (siehe Abschnitt 5.3), die mit geeigneten Maßnahmen wieder rückgängig gemacht werden können. Für Naphthochinone im Allgemeinen werden in der Literatur viele Beispiele für die Bildung irreversibler kovalenter Bindungen mit Gewebe, Proteinen und anderen Zellbestandteilen berichtet.^[224–227] Dies geschieht nach dem Mechanismus einer MICHAEL-Addition zwischen dem Naphthochinon und einem Nukleophil, wie beispielsweise HS- (Cystein)^[227]

Dieser Punkt ist nicht unerheblich, da die photochemischen Eigenschaften durch eine kovalente Bindung am chinoiden Teil des Naphthazaringerüsts **12** beeinflusst werden kann (siehe Abschnitt 3.2). Außerdem klingt die Färbung des Nagels bei Bildung einer kovalenten Bindung erst mit Herausgewachsen des Nagels ab. Hier müsste im Sinne einer späteren Anwendung am menschlichen Nagel ein neutraler abdeckender Kosmetiklack angewendet werden, wenn die rötliche Färbung des *photosensitizers* unerwünscht ist.

Die Optimierung der Darreichungsform der Naphthazarinderivate, die im Rahmen dieser Arbeit anhand verschiedener Lackformulierungen stattfand, bietet großes Potenzial für eine gesteigerte Bioverfügbarkeit der Substanzen. Auf Grund der Unverträglichkeit zu den Eudragiten[®] E und RL, die in Arzneimitteln wie Loceryl[®] eingesetzt werden (siehe Abschnitt 6.4), wurde eine Lackformulierung mit einem kosmetischen Klarlack auf Basis von Nitrocellulose verwendet. Neben diesen beiden Filmbildnern gibt es jedoch noch einige weitere, die für Untersuchungen in Frage kommen können. Das Ausschlusskriterium sind Polymere, die nukleophile Reste beinhalten, da sie ähnliche Nebenreaktionen wie die Eudragite[®] zeigen würden.

Neben der grundlegenden Zusammensetzung der Formulierung sind Eigenschaften wie die Viskosität von wichtiger Bedeutung. Je nach Viskosität unterliegt der Lack einem Spreiten auf dem Nagel. Ist der Lack dünnflüssig, verteilt er sich auf der Nageloberfläche und Haut um den

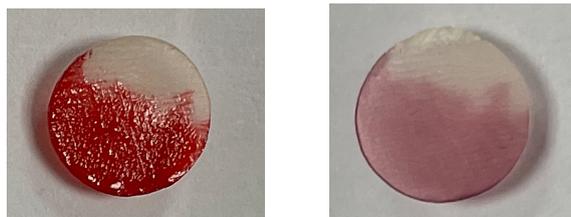


Abb. 8.1.: **Links:** Eine Membran aus Rinderhufkeratin wurde mit Deoxyshikonin (**20**) in einer Lackformulierung (siehe Abschnitt 6.4.4) bestrichen. **Rechts:** Nach etwa 3 Tagen wurde die Formulierung mit Hilfe von Lösungsmitteln entfernt. Es sind klare Konturen zwischen den Stellen zu sehen, die vormals mit Formulierung versehen waren und den unberührten.

Nagel herum. Diese gleichmäßige Verteilung sorgt dafür, dass die gesamte Oberfläche des Nagels behandelt wird und es nicht zu Rezidiven durch unbehandelte Bereiche kommt. Wenn der Lack eine höhere Viskosität aufweist, ist auch die Steuerbarkeit größer und es lassen sich bestimmte Bereiche gezielt behandeln wie in Abb. 8.1 zu sehen ist.

Nach Einwirken und Entfernen der eingesetzten Lackformulierung mit Deoxyshikonin (**20**) als Wirkstoff sind deutliche Abgrenzung zwischen behandelten und unbehandelten Stellen auf der Keratinmembran zu sehen. Die Steuerbarkeit könnte in einer Anwendung am menschlichen Nagel eine Reduzierung von auftretenden Nebenwirkungen bewirken, da nur das Nagelkeratin behandelt wird. Ob ein Spreiten oder eine hohe Viskosität zu einer besseren Wirkstoffvermittlung führt, müssen zukünftige Experimente zeigen.

Die Anpassung des pH-Werts wurde bereits diskutiert (siehe Abschnitt 5.3) und muss je nach Anwendung (ungeladenes oder geladenes Naphthazaringerüst) eingestellt werden. Auch hier sind Testreihen für die Ermittlung des geeignetsten Wertes erforderlich, können aber mit den in dieser Arbeit etablierten Testmethoden durchgeführt werden.

Neben der Formulierung ist die Synthese weiterer Derivate das wichtigste Vorhaben für zukünftige Arbeiten auf diesem Gebiet. Dabei könnten weitere funktionelle Gruppen in das Naphthazaringerüst eingeführt werden, die zum einen die Photoaktivierbarkeit verbessern und zum anderen die Keratinophilie weiter steigern. Für ersteres wurde in Abschnitt 6.3 mit der Einführung schwerer Atome wie Iod oder Brom bereits ein mögliches Konzept angesprochen. Durch den *heavy-atom*-Effekt könnte der Übergang des angeregten Singulettzustands der Naphthazarine in den angeregten Triplettzustand erleichtert werden, sodass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, vor allem von Singulett-Sauerstoff, gesteigert wird.

Wahrscheinlich könnten Derivate mit sowohl einer langen Alkylkette, als auch mit einem Halogenatom am chinoiden Rest substituiert, die besten Ergebnisse in den Wirkungstestungen gegen die Pathogene liefern. Dadurch könnte neben der Verbesserung der photochemischen Eigenschaften auch der im selben Abschnitt angesprochene "Tensid- oder Ergosterol-Effekt" gegen die Pathogene ausgenutzt werden.

Das Einführen neuer Reste war in der bisherigen Synthese nur über die doppelte FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung möglich (siehe Kap. 4). Die Verwendung einer "NEGISHI-Eintopfsynthese" in Kombina-

tion mit dem fertigen Naphthazaringerüst (**12**) führte zu keinem Produkt. Neben Anpassungen der Reaktionsbedingungen könnte auch eine weitere Kreuzkupplungsreaktion verwendet werden. Durch die Verwendung von mit Borsäure substituierten Alkyl- und Arylresten könnten Palladiumkatalysierte Kreuzkupplungen mit dem bromierten und geschützten Naphthazarinderivat **48** durchgeführt werden. Hier wären die SUZUKI-, die STILLE- und die HECK-Reaktion denkbar.^[228,229] HARVEY *et al.* verwendeten ein 2-Bromo-1,4-dimethoxynaphthalen, welches Verbindung **48** (siehe Abschnitt 4.2.3) entspricht, in einer SUZUKI-Kreuzkupplung zusammen mit einem Borsäurearylrest. In Abb. 8.2 ist das Schema übertragen auf das Naphthazarinderivat gezeigt.

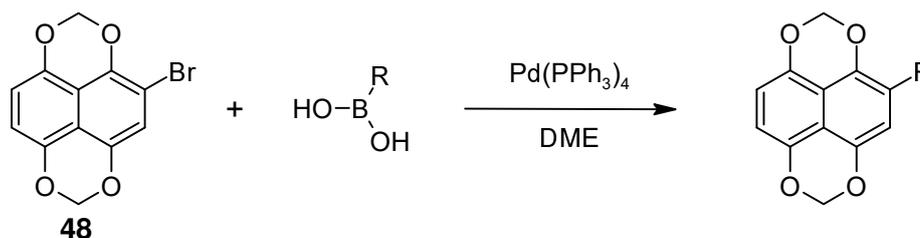


Abb. 8.2.: Abgebildet ist eine SUZUKI-Kupplung des geschützten Naphthazarinderivats **48** mit einer Alkyl- bzw. Arylborsäure nach HARVEY *et al.* Dies könnte eine Möglichkeit darstellen, die Seitenkette weiter zu variieren.

Als Katalysator wurde von den Autoren Tetrakis(triphenylphosphan)palladium(0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) unter hohen Produktausbeuten verwendet. Ließe sich die Synthese auf die Naphthazarine übertragen, könnte eine Vielzahl Alkyl- und Arylderivate hergestellt werden und die zuvor angesprochene Reihe an Alkylderivaten dargestellt werden.

Desweiteren müssen in zukünftigen Synthesen neben den bisher synthetisierten aminierten Naphthazarinderivaten **113**, **95** und **96** weitere langkettige Derivate synthetisiert werden. In anschließenden IC_{50} -Bestimmungen wird der Zusammenhang zwischen der Länge der Alkylkette und der Wirkung nach Photoaktivierung weiter verdeutlicht, sodass ein Vergleich mit den Kohlenstoffanaloga möglich ist. Das in Abschnitt 3.2 kurz angesprochenen 5-Aminonaphthazarin bietet auf Grund seiner hohen Absorptionswellenlänge von bis zu über 600 nm signifikant bessere Voraussetzungen als das Naphthazaringerüst **12**. Bei Derivatisierungsreaktionen zeigte es sich jedoch als nicht stabil. Hier müssen Anpassungen der Reaktionsbedingungen getroffen werden, damit eine Substitution der Aminogruppe durch eine Hydroxylgruppe zum **12** nicht stattfindet. So könnten durch Bildung einer Carbonsäureamidbindung Reste in den aromatischen Ring eingeführt werden, ohne, dass die Tautomerie des Wasserstoffs zwischen Stickstoff und Ketongruppe gestört wird. Auch nach Bildung der Amidgruppe bleibt ein Proton am Stickstoff verfügbar, sodass die photochemischen Eigenschaften erhalten bleiben sollten.

Neben Produktoptimierungen und dem Einführen neuer Reste in das Naphthazarinringgrundgerüst sind auch Syntheseansätze neuer Verbindungen bzw. zusätzlicher Wirkmechanismen von Vorteil, um die Wirkung am Pathogen weiter zu steigern.

Unter dem Begriff der bioreduktiven Alkylierung (*bioreductive alkylation*) berichteten MOORE *et al.* 1983 von Chinonverbindungen, die in 2- bzw. 3-Position einen Alkylrest besitzen, der ähnlich dem Shikonin (**19**) an Position 1 des Restes eine Abgangsgruppe (LG, *leaving group*) besitzt und wie in

der nachfolgenden Abb. 8.3 eine Abspaltung durchführen.^[230]

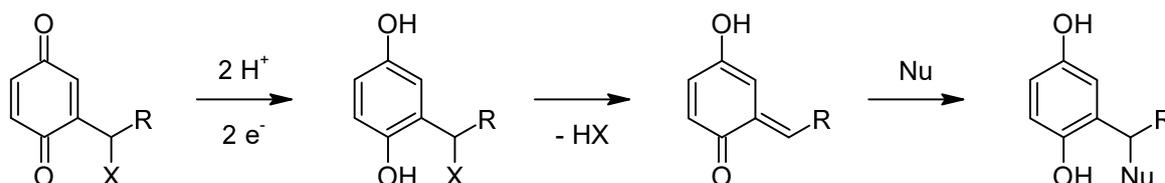


Abb. 8.3.: Abgebildet ist der Mechanismus der bioreduktiven Alkylierung nach MOORE *et al.*. Unter Abspaltung der Abgangsgruppe (LG) im Rest des Chinons, kommt es zur Bildung eines reaktiven Ketens, welcher mit Nucleophilen reagieren kann.^[230]

Zunächst wird das Chinon durch (photo)reduktive Prozesse im Organismus in das Hydrochinon überführt und durch anschließende Abspaltung der LG aktiviert. Das entstandene Keten ist durch seine Konjugation zur Ketogruppe reaktiv gegenüber Nucleophilen. So können Reaktionen mit Proteinen, der DNA oder sonstigen Zellbestandteilen einer Zelle eingegangen werden. Nach MOORE *et al.* ist der Mechanismus nun abgeschlossen, doch mit hoher Wahrscheinlichkeit wird das Hydrochinon durch in der Zelle befindlichen Sauerstoff wieder zum Chinon oxidiert.^[96] Verbindet man dieses Konzept mit der PDT, so könnte nach erfolgter Reaktion mit einem Protein eine photochemische Aktivierung des Chinons folgen und zu weiteren Schäden führen. Mit Shikonin (**19**) lag bereits eine solche Struktur vor, die jedoch mit einer Hydroxylgruppe an der gewünschten Position eine schwache LG aufweist. Durch Substitution mit einem Halogen wie Brom oder Iod, könnte diese stärker aktiviert werden. Wichtig bei diesem Konzept zu beachten ist jedoch, dass die Größe der Abgangsgruppe nicht beliebig ist, da durch zu hohe Molekulargewichte die Permeabilität durch das Keratin, in dem es angewendet werden soll, sinkt (siehe Abschnitt 1.3).

Kapitel 9.

Experimenteller Teil

9.1. Allgemeine Arbeitstechniken

9.1.1. NMR-Spektroskopie

Die Messung der NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance III 400 durchgeführt. Alle NMR-Spektren wurden mit deuteriertem DMSO-d₆ und CDCl₃ mit TMS (Tetramethylsilan) als internen Standard aufgenommen. Die Signale sind rel. zu TMS angegeben. Die bei den unterschiedlichen Messmethoden verwendeten Parameter sind in Tab. 9.1 zu finden.

Tab. 9.1.: Messbedingungen für die ¹H- und ¹³C-Spektren.

Methode	Frequenz [MHz]	Temperatur [K]
¹ H	400	295
¹³ C	100	295

Eine Zuordnung der Lösemittelpeaks wurde nach GOTTLEIB *et al.* vorgenommen und ist in Tab. 9.2 zu finden.

Tab. 9.2.: Lösungsmittelsignale in ¹H-NMR- und ¹³C-NMR Spektren. Werte sind in ppm angegeben.

Lösungsmittel	¹ H-NMR-Signal	¹³ C-NMR-Signal
DMSO-d ₆	2.50	39.52
CDCl ₃	7.26	77.16

Die Abkürzungen der ausgewerteten Signalmultiplizitäten, sowie deren Bedeutungen sind in Tab.

9.3 zu finden.

Tab. 9.3.: Abkürzungen der Signalmultiplizitäten und ihre Bedeutungen.

Multiplizität	Bedeutung
bs	breites Singulett
s	Singulett
d	Duplett
t	Triplett
q	Quartett
m	Multiplett
m_c	zentriertes Multiplett

Um die Signale der Zielmoleküle aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren eindeutig zuordnen zu können, wurden ebenfalls 2D-NMR-Spektren (COSY, HSQC, HMBC) aufgenommen und für die Auswertung verwendet.

9.1.2. HPLC-Analytik

Für HPLC-Messungen (*high-performance-liquid-chromatography*) wurde ein Hewlett Packard 1050 System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) oder ein Agilent 1100 System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet.

Die HPLC wurde unter anderem zur Kontrolle einzelner Fraktionen während der Flash-Chromatographie, sowie zur Reinheitskontrolle der fertigen Produkte eingesetzt. Die hauptsächlich verwendeten Parameter waren die folgenden:

Methode 1: Gradient aus Acetonitril (ACN) und H_2PO_4 -Puffer (10 mM, pH 2.3) über eine STAGROMA YMC-C-18-Säule mit einer Laufzeit von 10 min. Das Injektionsvolumen lag bei 20 μM , die Flussrate bei 1.5 mL/min. Die Detektion der Fraktionen erfolgte über eine UV-Messung bei 254 nm.

Für die Untersuchungen mit den FRANZ-Diffusionszellen (siehe Abschnitt 5.1) wurde eine KinetexTM RP-C8-Säule (4.6 mm x 150 mm, 5 μm , Fa. Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) sowie die Parameter aus Methode 1 abgesehen von der Detektionswellenlänge, die auf 298 nm angehoben wurde, um Ciclopirox detektieren zu können.

Die Vermessung von Naphthazarin erfolgte mittels Methode 2.

Methode 2: ACN (70 %) und Wasser (30 %) über eine STAGROMA YMC-C-18-Säule mit einer Laufzeit von 6 min. Das Injektionsvolumen lag bei 20 μM , die Flussrate bei 1.5 mL/min. Die

Detektion der Fraktionen erfolge über eine UV-Messung bei 254 nm.

9.1.3. Dünnschicht-Chromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde mit Silica-Gel beschichteten Polyesterplatten (Polygram SIL G/UV₂₅₄, 0.2 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt.

9.1.4. Flash-Chromatographie

Für die Aufarbeitung wurde neben der Säulenchromatographie die Flash-Chromatographie mit einem LaFlash-System (VWR International GmbH, Hannover, Deutschland) durchgeführt. Die Rohprodukte wurden auf Silicagel (0.063-0.2 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Deutschland) gezogen, um eine Vorsäule anfertigen zu können. Die Hauptsäule war eine vorgepackte Säule (SIHP-JP, 30 μ M 40 g, puriFlash Interchim, Montluçon, Frankreich). Die Fraktionen wurden während der Trennung mittels UV-Absorption bei 254 nm verfolgt.

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-Analyse untersucht.

9.1.5. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie erfolgte über eine vorgeschaltete Flüssigchromatographie (LC), die mit einem Agilent 1260 HPLC System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt wurde. Die eingesetzte Trennungssäule war eine ZORBAX[®] Eclipse XDB-C8-Säule (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ M). Die Messung erfolgte mittels einer Bruker Amazon SL Ionenfalle (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) unter Verwendung der Elektrospray-Ionisierung (ESI, dry gas 6.5 L/min, Nebulizer 25 psi, Trocknungstemperatur 250 °C).

Die Zielprodukte dieser Arbeit (Naphthazarinderivate) konnten in der Masse und unter Verwendung der Elektrospray-Ionisierung nicht detektiert werden.

9.2. Spezielle Arbeitsmethoden

9.2.1. Lampe für die Bestrahlungstests

Die Lichtquelle, die in den Bestrahlungsexperimenten eingesetzt wurde, wurde von der Fa. Sahlmann Photochemical Solutions (Bad Segeberg, Deutschland) angefertigt. In Abb. A.3 ist ihr Aufbau zu sehen. Sie besteht aus einem Kopfteil mit Kühlelement, an dem acht LEDs (Nichia NCSG219-V1) eingebaut sind (weitere Eigenschaften sind in Abschnitt A.4 des Anhangs zu finden). Dieses Bauteil eignet sich dazu, es auf extra angefertigten Aufsätzen auf Mikrotiterplatten (*well plates*) zu befestigen. So konnten bei einer 96-*well plate* vier *wells* pro LED gleichzeitig bestrahlt werden. Für die Bestrahlung einer gesamten Platte musste die Lampe drei Mal im Gestell versetzt werden. Die Peakwellenlänge bei 100 % Intensität beträgt 519 nm und eine Nennleistung von 4600 mW bzw.

6.5 mW/cm². Das Kopfteil ist an einer Kontrolleinheit angeschlossen, mit der die Bestrahlungsintensität sowie die Bestrahlungsdauer genau eingestellt werden kann (siehe Anhang Abschnitt A.5).

9.2.2. UV/Vis-Messungen

Messungen aus Kap. 3:

Für die UV/Vis-Messung unter Abschnitt 3.2 wurden die Substanzen in DMSO und DMF in einer Konzentration von 3 mM gelöst und in einer *96-well plate* (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit einem Fluostar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) vermessen.

Messungen aus Kap. 4:

Für die Testsubstanzen wurden 50 mM Stammlösungen angefertigt. Diese wurden in eine Mikrotiterplatte (*96-well plate*, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zusammen mit Wasser (HPLC-Reinheit) pipettiert, sodass eine Konzentration von 5 mM bzw. 50 µM vorlag. Die Bestimmung der UV/Vis-Spektren erfolgte mit Hilfe eines *plate readers* (Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland). Die Proben wurden weitestgehend unter Lichtausschluss behandelt. Nach dem Vermessen wurde die Platte für 10 min mit einer sonderangefertigten Lichtquelle bestrahlt, deren Wellenlängenmaximum bei 519 nm liegt (8 LEDs, 4600 mW, 6.5 mW/cm², Fa. Sahlmann Photochemical Solutions, Bad Segeberg, Deutschland) und erneut vermessen. Die Spektren sind im Anhang unter Abschnitt A.6 zu finden.

9.2.3. Membranen aus Rinderhufen

Für die Herstellung der Membranen für die FRANZ-Zellen-Untersuchungen wurden zunächst von einer lokalen Schlachtereier schlachtfrische Rinderhufe besorgt und direkt am selben oder darauffolgenden Tag (Kühlung über Nacht im Kühlkeller) verarbeitet. Die Hufteile wurden in Blöcke mit Kantenlängen über 20 mm gesägt, um im Anschluss mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM2255, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) 100 µm starke Schnitte machen zu können. Durch Ausstanzen mit einem Locheisen (25 mm Durchmesser, bzw. 8 mm) wurden zuletzt die Membranen erhalten.

9.2.4. Testung mit FRANZ-Diffusionszellen

Zuerst wurde das Akzeptormedium (PBS-Puffer/Ethanol-Gemisch, 42 %-v/v, pH 8.1) bis zur Bildung eines Diskus in das Akzeptorkompartiment eingefüllt. Die Membranen wurden vor dem Experiment für mindestens eine Stunde im Akzeptormedium eingelegt, um ihren Durchmesser von 100 µm durch Quellen mit Wasser zu erhalten. Sie wurden danach so auf den geschliffenen Glasrand des Akzeptorkompartiments gelegt, dass sich in der Öffnung zum Akzeptormedium keine Luftblasen bildeten. Nach Auflegen und Festklemmen des Donorkompartiments wurde die Apparatur bei einer Temperatur von 32 °C für etwa 15 min equilibriert und die Donorlösung eingefüllt. Diese bestand

aus Naphthazarin (12) bis zur Sättigung bei RT gelöst im Akzeptormedium. Die Temperatur wurde während der gesamten Versuchsdurchführung bei 32.0 ± 0.5 °C gehalten und es wurde mit einem kleinen Magnetrührstab bei 600 RPM gerührt.

Zur Probenentnahme wurden 100 μ L des Akzeptormediums entnommen und per HPLC-Analytik (siehe **HPLC-Analytik**) vermessen. Das fehlende Medium wurde sofort nach der Probenentnahme ersetzt. Desweiteren folgte eine visuelle Kontrolle auf Färbung des Akzeptormediums (vgl. Ph. Eur. 10.3/2.2.2). Nach 20 h wurde das Experiment beendet.

Eine Berechnung eines Permeabilitätskoeffizienten folgte auf Grund des Ausganges des Versuchs nicht (siehe Abschnitt 5.1).

9.2.5. Miniatur-FRANZ-Zellen

Der Aufbau des Systems entsprach dem des herkömmlichen FRANZ-Zellentests. Für das Akzeptorkompartiment wurden 1.5 mL Kurzgewindeflaschen (HPLC-Vial, Gesamtvolumen 1,9 mL, ND 8, Fa. Techlab, Braunschweig, Germany) verwendet. Auf den Rand der Vials wurde nach Einfüllen des Akzeptormediums mit hochviskoser Silikonpaste (Silikonpaste KORASILON® M-S 2 M-S 2-200, hochviskos, Fa. Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad-Berleburg, Deutschland) aufgeklebt. Beim Aufkleben musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen unter der Membran gebildet wurden. Das Akzeptormedium bestand aus einer 70 %igen wässr. Ethanol-Lösung. Das Donorkompartiment wurde aus zwei zur Kurzgewindeflasche passenden Deckeln (Vial-Deckel, aus PP, ND8, Fa. Techlab, Braunschweig, Germany) gebildet. Die Deckel wurden einige Zeit vor dem Versuch an der Oberseite mit einer Feile angeraut und mit Ethyl-Cyanacrylatkleber (CA 221, Fa. Best Klebstoffe GmbH & Co. KG, Kinsau, Deutschland) verklebt. Der Kleber musste über Nacht aushärten. Die zusammengesetzten Deckel wurden auf das Vial und die aufgeklebte Membran geschraubt. Im Anschluss wurde das Donormedium in den Deckel gefüllt. Um ein Verdunsten der flüchtigen Formulierungen zu verhindern, wurde mit der Silikonpaste ein Mikroskopie Deckgläschen aufgeklebt.

Der Versuch wurde, um Verunreinigungen oder Nebenreaktionen zu vermeiden, auch ohne Silikonpaste zwischen Membran und Vial durchgeführt.

9.2.6. Raman-Mikroskopie

Der Aufbau des eingesetzten RAMAN-Mikroskops Senterra II (Bruker, Billerica, USA) bestand aus den folgenden Einzelkomponenten:

- Olympus Materialforschungsmikroskop Typ BX51 (Reflexionsmessung) mit Standardobjektiven (10x, 20x, 50x, 100x)
- Beobachtungsokular und INFINITY-Kamera
- Weißlichtquelle (Auflicht)
- Polarisator und Analysator

- Laserquelle (785 nm, maximale Leistung 100 mW)
- externer Controller für Laser
- temperierbarer Tisch
- externer Controller für den temperierbaren Tisch

Gesteuert wurde das Gerät mittels OPUS 7.2 (Bruker, Billerica, USA). Die von den Membranen angefertigten Querschnitte wurden auf Objektträgern fixiert, damit ein Verrutschen vor und während der Messung ausgeschlossen werden konnte.

Für die Messungen wurde ein Objektiv mit 50facher Vergrößerung und eine Blendenöffnung von 50 mm verwendet. Die Spektren setzen sich aus 2 Coadditionen von 15 s Belichtungszeit zusammen. Für Deoxyshikonin wurde eine Laserintensität von 50 mW verwendet, für Ciclopoli® und Loceryl® 100 mW.

9.2.7. ESR-Spektroskopie

Für die qualitative Voruntersuchung der gebildeten ROS nach Bestrahlung (5 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) von Deoxyshikonin (**20**) wurde die Verbindung in Aceton gelöst auf eine Keratinmembran aufgetragen und durch Verschluss des Gefäßes am Verdunsten gehindert. Anschließend wurde die Membran äußerlich gründlich mit verschiedenen LM gewaschen (Aceton, MeOH, DCM, EE). Nach dem Trocknen wurde sie unter Verwendung von flüssigem Stickstoff heruntergekühlt und mit einem Mörser und Pistill pulverisiert. Das Pulver wurde mit ACN und EDTA-Wasser (1 M EDTA) und einer Spin-Sonde (TMTH) versetzt, dass die Endkonzentration von TMTH 5 mM betrug. Es wurde für 5 min mit Licht einer Peakwellenlänge von 519 nm (4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) bestrahlt. Vom Überstand wurde mit einer Kapillare direkt nach Bestrahlung eine Probe von 25 µL gezogen und vermessen. Nach 5 min Wartezeit wurde eine erneute Probe vermessen. Als Kontrolle diente eine Probe, die nur TMTH ohne Wirkstoff **20** enthielt. Zur Spektrenaufnahme wurde das ELEXSYS E 500 (Bruker Biospin, Billerica, USA) benutzt. Dazu wurden die Testlösungen mit einer 25 µL-Kapillare (Fa. Hirschmann) genommen und direkt vermessen. Die Messungen der Proben erfolgte mittels X-Band und folgender Parameter: Zentralfeld: 3511.35 GHz; Resonanzfrequenz: 9.85 GHz; Mikrowellenleistung: 20 mW; Modulationsamplitude: 1.0 G; Modulationsfrequenz: 100 kHz; Umsetzungszeit: 40 ms; Zeitkonstante: 40.96 ms.

9.2.8. Untersuchung der Verfärbung

In vier Mikroreaktionsgefäße (1.5 mL) mit jeweils 1 mL der folgenden Lösungen befüllt: DPBS-Puffer pH 7.0 - 7.3, Zn²⁺-Lösung aus ZnCl₂, KOH-Lösung pH 10.8 und KOH-Lösung pH 12. Anschließend wurden auf die Oberflächen der Flüssigkeiten 15 L Lackformulierung (Deoxyshikonin (**20**) 10 mg/mL, siehe Abschnitt. 6.4.4) gegeben. Nachdem der Lack getrocknet war, wurde die gebildete Lackschicht untergerührt und für drei Tage bei RT stehen gelassen. Die Hälfte der mit Zn²⁺-Lösung versehenen Membran wurde im Anschluss mit 1 M HCl-Lsg. versetzt. Die Auswertung erfolgte visuell.

9.3. Biologische Testungen

9.3.1. Screenings in 96-well-Mikrotiterplatten

Lösungsmittel- und Strahlungskontrolle

Um auszuschließen, dass die Strahlung der eingesetzten Lampe (9.2.1) einen schädlichen Effekt auf *C. albicans* und *T. rubrum* hat, wurden Wachstumskontrollen in den Mikrotiterplatten eingesetzt, sodass exakt dieselben Bedingungen vorherrschten. Auch ein Lösungsmiteleinfluss wurde mit Hilfe einer Lösungsmittelkontrolle ausgeschlossen. Hierfür wurden die maximalen Konzentrationen an DMSO eingesetzt (0.5 und 1 %). Die Ergebnisse einer solchen Kontrolle sind in der nachfolgenden Tabelle abgebildet.

Tab. 9.4.: Beispielhafte Ergebnisse für eine in den IC₅₀-Bestimmungen mitgeführte Wachstumskontrolle von *C. albicans* und *T. rubrum*. Unter denselben Bedingungen wie die getesteten Substanzen, zeigte die eingesetzte Strahlung (10 min, 519 nm, 4600 mW bzw. 6.5 mW/cm² Nennleistung) keine Wirkung ohne Verwendung einer photoaktivierbaren Substanz.

<i>C. albicans</i>		<i>T. rubrum</i>	
- 519 nm	+ 519 nm	- 519 nm	+ 519 nm
0.27	0.26	0.28	0.26
0.23	0.26	0.35	0.33
0.19	0.20	0.33	0.35

Tab. 9.5.: Beispielhafte Ergebnisse für eine in den IC₅₀-Bestimmungen mitgeführte DMSO-Lösungsmittelkontrolle (% v/v DMSO). Unter denselben Bedingungen wie die getesteten Substanzen, zeigte das Lösungsmittel keine Wirkung auf die Pathogene.

<i>C. albicans</i>			<i>T. rubrum</i>		
0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %
0.26	0.28	0.27	0.35	0.34	0.30
0.23	0.23	0.23	0.33	0.31	0.28
0.19	0.19	0.19	0.28	0.26	0.27

Temperaturkontrolle

Da es wie bei allen Lampen mit einer derartigen Strahlungsleistung zu einer Wärmeentwicklung kommt, befindet sich unmittelbar an den LEDs gekoppelt ein Kühlelement mit einem Lüfter. Da es aber auch unterhalb und somit in den bestrahlten Mikrotiterplatten zu einer Erwärmung kommt, wurde ein Temperaturverlauf aufgenommen. Dieser sollte bestätigen, dass auch die entstehenden Temperaturen bei der Bestrahlung keinen Einfluss haben.

Für die Durchführung des Tests wurde in eine 6-well-Mikrotiterplatte an der Seite ein Loch gebohrt, sodass mit einem Temperaturfühler einen Wert ermitteln konnte. Verwendet wurde ein EKT Hei-Con Temperaturmessfühler (Fa. Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland), um einen groben Wert zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Abb. 9.1 abgebildet und bestehen aus einer dreifachen Durchführung.

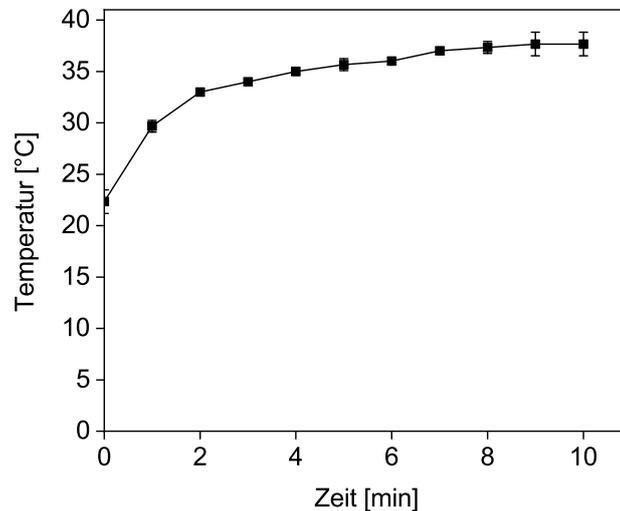


Abb. 9.1.: Der Temperaturverlauf während der Bestrahlung einer 6-well Platte mit der 519 nm Lampe. Die Datenpunkte sind jeweils Mittelwerte aus drei Messungen mit deren Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Die Temperatur erreichte keine für die Pathogene schädlichen Werte.^[231]

***Candida albicans* (Ca)**

Die pathogene Hefe *Candida albicans* DSM 1386 wurde über Nacht in M186/3 (3.3 % Glucose, 0.16 % Pepton aus Sojabohnen, 0.1 % Hefeextrakt, 0.1 % Malzextrakt) kultiviert. Die Testverbindungen wurden in Triplikaten in die Mikrotiterplatten pipettiert, sodass Endkonzentrationen von 10 μM und 100 μM vorlagen. 200 μL der Hefe wurde zu jedem well hinzugegeben, nachdem die Kultur auf eine optische Dichte von 0.03 (600 nm) eingestellt wurde. Die Mikrotiterplatten wurden für 10 min mit einer sonderangefertigten Lichtquelle bestrahlt, deren Wellenlängenmaximum bei 519 nm liegt (8 LEDs, 4600 mW, 6.5 mW/cm², Fa. Sahlmann Photochemical Solutions, Bad Segeberg, Deutschland). Die Mikrotiterplatten wurden zu jeder Zeit unter Ausschluss der Umgebungsbeleuchtung gehandhabt. Die einzige Lichtquelle war eine rote LED. Die Platten wurden anschließend bei 28 °C für 5 h inkubiert und bei 200 RPM geschüttelt. Anschließend wurden jedem well 10 μL Resazurin-Lsg. (0.3 mg/mL in Phosphatpuffer) hinzugefügt. Die Platten wurden für weitere 30 min inkubiert bevor sie mit Hilfe eines *microplate readers* (Tecan Infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) fluoreszenzvermessen (560/590 nm) wurden. Als Positivkontrolle wurde Nystatin (**31**) verwendet. Für die IC₅₀-Bestimmungen wurden Verdünnungsreihen der Testverbindungen angefertigt. Die Ergebnisse wurden mit GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) ausgewertet und gefittet. Der nachfolgende Fit und die dazugehörige Gleichung wurden eingesetzt:

Fit: log(inhibitor) vs. response - Variable slope

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50}-X) * \text{HillSlope})})$$

***Trichophyton rubrum* (Tru)**

Trichophyton rubrum I/95 (isoliert von einem Patienten der Universitäts-Hautklinik Kiel, Prof. Brasch) wurde für eine Woche bei 29 °C auf GPY (0.1 % Glucose, 0.05 % Pepton, 0.01 % Hefeextrakt, 1.5 % Agar) inkubiert. Es wurde eine Suspension aus 5*10⁴ Sporen/mL in M186 (1 % Glucose, 0.5 % Pepton aus Sojabohnen, 0.3 % Hefeextrakt, 0.3 % Malzextrakt) angefertigt und zu jedem *well* der Mikrotiterplatte hinzugefügt, das die Testverbindungen enthielt. Es wurden Triplikate angefertigt die mit einer Endkonzentration von 10 µM und 100 µM vorlagen. Die Mikrotiterplatten wurden für 10 min mit einer sonderangefertigten Lichtquelle bestrahlt, deren Wellenlängenmaximum bei 519 nm liegt (8 LEDs, 4600 mW, 6.5 mW/cm², Fa. Sahlmann Photochemical Solutions, Bad Segeberg, Deutschland). Die Platten wurden zu jeder Zeit unter Ausschluss der Umgebungsbeleuchtung gehandhabt. Die einzige Lichtquelle war eine rote LED. Nach Inkubation für 72 h bei 29 °C und Schütteln bei 120 RPM wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen unter Verwendung eines *microplate readers* (Tecan Infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) (560/590 nm) wurden. Die Ergebnisse wurden mit der Positivkontrolle Clotrimazol (103, 10 µM) und einer Negativkontrolle ohne Wirkstoff auf der selben Platte verglichen. Für die IC₅₀-Bestimmungen wurden Verdünnungsreihen der Testverbindungen angefertigt. Die Ergebnisse wurden mit GraphPad Prism 7 ausgewertet und gefittet (siehe Abschnitt 9.3.1).

9.3.2. Modifiziertes Infizierte-Membranmodell

Das Anfertigen der Formulierungen erfolgte durch lösen von Deoxyshikonin (20) im Lösungsmittelgemisch und anschließendem Zugeben der Lösung zum abgewogenen Eudragit[®]. Anschließend wurde mit Schütteln und Gabe ins Ultraschallbad das Polymer gelöst. Zuletzt wurde das Triacetin hinzugegeben und ebenfalls unter starkem Schütteln eingearbeitet.

Tab. 9.6.: Erste Testreihe: Wirkstoffformulierung für den Einsatz im infizierten Nagelmodell.

Inhaltsstoff	% (m/m)
Eudragit [®] E100	18
Ethylacetat	74
Triacetin	2
Butylacetat	5
Deoxyshikonin (20)	1

Tab. 9.7.: Zweite Testreihe: Formulierung der *vehicle*-Kontrolle (oben) und des Wirkstoffs (unten) für den Einsatz im infizierten Nagelmodell.

Inhaltsstoff	% (m/m)
Eudragit® RL PO	22.5
Ethanol	24.5
Ethylacetat	24.5
Butylacetat	24.5
Triacetin	4.0
Eudragit® RL PO	22.5
Ethanol	24.3
Ethylacetat	24.3
Butylacetat	24.3
Triacetin	4.0
Deoxyshikonin (20)	0.5

Tab. 9.8.: Dritte Testreihe: Formulierung der *vehicle*-Kontrolle (oben) und des Wirkstoffs (unten) für den Einsatz im infizierten Nagelmodell.

Inhaltsstoff	
kosmetischer Klarlack	50 %
Ethylacetat	50 %
kosmetischer Klarlack	50 %
Ethylacetat	50 %
Deoxyshikonin (20)	5 mg/mL
kosmetischer Klarlack	50 %
Ethylacetat	50 %
Deoxyshikonin (20)	10 mg/mL

Die Zusammensetzung des kosmetischen Lacks ist in der nachfolgenden Tab. 9.9 abgebildet.

Tab. 9.9.: Inhaltsstoffe des eingesetzten kosmetischen Klarlacks auf Basis von Nitrocellulose (Power Gel 2in1 Base & Top Coat, Catrice Cosmetics cosnova GmbH, Sulzbach, Deutschland).

[Iem] Inhaltsstoff	Funktion
Ethylacetat	Lösungsmittel
Nitrocellulose	Polymer/Filmbildner
Butylacetat	Lösungsmittel
Acetyltributylcitrat	Weichmacher
Adipinsäure/Neopentylglycol/ Trimellitsäureanhydrid Copolymer	Polymer/Filmbildner
Isopropylalkohol	Lösungsmittel
Maltol	Antioxidans
Polyester-26	Polymer/Filmbildner
2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl- 4-methylphenol	UV-Absorber
CI 60725 (Violet 2)	Farbstoff

Vorkultur: 1 Woche auf GPY (0.1 % Glucose, 0.05 % Pepton, 0.01 Hefeextrakt, 1.5 % Agar) bei 29 °C

Hauptkultur: M186 (1 % Glucose, 0.5 % Pepton aus Sojabohnen, 0.3 % Hefeextrakt, 0.3 % Malzextrakt, 1.5 % Agar), versehen mit 100 U/mL Penicillin and 100 mg/mL Streptomycin

Trichophyton rubrum I/95 (isoliert von einem Patienten der Universitäts-Hautklinik Kiel, Prof. Brasch) wurde für 1-3 Wochen bei 29 °C auf GPY (0.1 % Glucose, 0.05 % Pepton, 0.01 % Hefeextrakt, 1.5 % Agar) kultiviert. Für das Infizierte-Membranmodell wurden Petrischalen mit M186 agar (1 % Glucose, 0.5 % Peptone aus Sojabohnen, 0.3 % Hefeextrakt, 0.3 % Malzextrakt, 1.5 % Agar, versehen mit 100 U/mL Penicillin and 100 mg/mL Streptomycin) wurden mit Tru-Kultur angeimpft indem sie mit einem Wattestäbchen bestrichen wurden. Anschließend wurden autoklavierte Rinderhufmembranen (in DPBS-Pufferlösung, 100 µm Dicke, 8 mm Durchmesser) auf Agar verteilt (5/Schale) und für 48 h bei 29 °C inkubiert. Es wurden die Formulierungen mit einer Eppendorfpipette aufgetragen (15 µL/Membran). Nach einer Trocknungszeit von 15 min und weiterer Inkubation für 24 h bei 29 °C, wurden vier Membranen, eine von jedem Typ (Kontrolle, *vehicle*, DOS1, DOS2), auf frische Petrischalen überführt. Dies geschah, indem die Membranen dabei gedreht wurden, sodass die unbehandelte Seite nach oben zeigte. Die Petrischalen wurden zweimal für 5 min mit einer sonderangefertigten Lichtquelle bestrahlt, deren Wellenlängenmaximum bei 519 nm liegt (8 LEDs, 4600 mW, 6.5 mW/cm², Fa. Sahlmann Photochemical Solutions, Bad Segeberg,

Deutschland) bestrahlt. Im Anschluss wurde erneut Formulierung (15 $\mu\text{L}/\text{Membran}$) aufgetragen, für 15 min getrocknet und erneut bestrahlt (2 x 5 min). Die Petrischalen wurden für 24 h bei 29 °C inkubiert und erneut bestrahlt (2 x 5 min). Nach 7 Tagen weiterer Inkubation bei 29 °C wurden die Ergebnisse visuell ausgewertet. Immer wenn die Testverbindungen oder die Petrischalen mit Testverbindungen gehandhabt wurden, geschah dies unter Ausschluss der Umgebungsbeleuchtung. Als einzige Lichtquelle diente eine rote LED-Lampe.

9.4. Synthesen

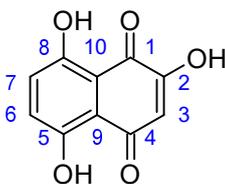
Allgemeine Synthesevorschrift 1

Unter N₂-Atm. wurde NaH (60 %ig in Mineralöl) vorgelegt und unter Eiswasserkühlung Triethylphosphonoacetat in einem Zeitraum von 5 min hinzugegossen. Es wurde für 20 min bei 0 °C gerührt. Das Keton wurde unter Rühren hinzugegeben und für weitere 5 min gerührt. Nach Erwärmen auf RT wurde für 75 min bei 65 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit ges. NH₄Cl-Lsg. gequenchet und für 30 min bei RT gerührt. Es wurde mit DCM extrahiert und die vereinigten org. Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde i.Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie (EE/PE) aufgereinigt.

Allgemeine Synthesevorschrift 2

Wenn nicht anderes beschrieben, wurde für die Synthese der Zielverbindung eine Vorschrift nach ELÖVE *et al.* verwendet.^[173]

Es wurde AlCl₃ zusammen mit NaCl unter N₂-Atm. vorgelegt und auf 150 °C erhitzt. Bei Eintreten der Schmelze wurde das Fumar/Maleinsäurederivat vermengt mit 1,4-Dimethoxybenzen portionsweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 150 °C erhitzt und die Temperatur wurde in 60 min Intervallen um 10 °C erhöht bis eine Temperatur von 180 °C erreicht wurde. Nach Abkühlen auf RT wurde 18 %ige HCl-Lsg. unter Eiswasserkühlung hinzugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde mit Et₂O extrahiert und die vereinigten org. Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und i.Vak. vom LM befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch und/oder durch Umkristallisation aufgereinigt.

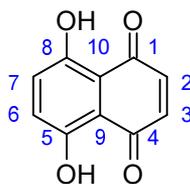
Synthese von 2-Hydroxynaphthazarin (BJ-8)

531 mg (2.79 mmol) Naphthazarin (**12**) wurden in einer wässr. 6 M NaOH-Lsg. gelöst und für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei wurde mittels Druckluft Sauerstoff eingeleitet. Nach Beenden der Reaktion wurde mit 1 M HCl-Lsg. neutralisiert und mit CHCl_3 (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und i.Vak. vom LM befreit. Das Rohprodukt wurde Säulenchromatographisch (EE/PE, 1:1) aufgereinigt. **25** wurde als roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 223 mg (1.08 mmol, 39 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 12.67(s, 1 H, *H-OH*), 11.42(s, 1 H, *H-OH*), 7.27(d, 1 H, $^3\text{J} = 9.4 \text{ HzH-}$), 7.14(d, 1 H, $^3\text{J} = 9.4 \text{ HzH-}$) 6.30(s, 1 H, *H-*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 188.9 (C-1), 182.6 (C-4), 158.3 (C-7), 157.2 (C-6), 132.3 (C-10), 127.7 (C-9), 111.5 (C-3) ppm.

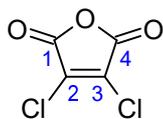
Synthese von Naphthazarin (12) aus 1,5-Dinitronaphthalen

5.01 g (23.0 mmol) 1,5-Dinitronaphthalen wurden in einem Dreihalskolben in 25 mL konz. H_2SO_4 gelöst und unter Eiswasserkühlung und starkem Rühren mit einer Lösung aus 2.64 g (82.3 mmol) Schwefel in 34 mL Oleum (66 %ig) in einem Zeitraum von 30 min versetzt. Die Temperatur stieg dabei nicht über 50 °C. Es wurde für 1 h 20 min bei RT gerührt und die Reaktionslösung im Anschluss in einen mit Eis gefüllten Kolben gegeben. Es wurde für 1 h 20 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung über Nacht stehen gelassen und der ausgefallene Feststoff abgesaugt. Das Filtrat wurde mit kaltem Toluol (2 x 200 mL) extrahiert. Der abgesaugte Feststoff wurde mit 500 mL kaltem und 300 mL kochendem Toluol extrahiert. Die vereinten org. Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und i.Vak. vom LM befreit. Das Rohprodukt wurde über eine Filtersäule (Toluol) und anschließende Sublimation aufgereinigt.

Ausbeute: 624 mg (3.28 mmol, 14 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 12.44 (s, 2 H, *H-OH, OH*), 7.17 (s, 4 H, *H-2, 3, 6, 7*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 173.8 (C-1, 4, 5, 8), 134.0 (C-2, 3, 6, 7) 111.8 (C-9, 10) ppm.

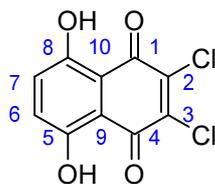
Synthese von 2,3-Dichlormaleinsäureanhydrid (43)

10.0 g (0.10 mol) Maleinsäureanhydrid wurden zusammen mit 100 mL (1.38 mol) SOCl_2 in einem Zweihalskolben vorgelegt und unter Eiswasserkühlung wurden 16.7 mL (0.21 mmol) Pyridin in einem Zeitraum von 30 min hinzugegeben. Es wurde für 1 h bei 0 °C gerührt und im Anschluss für 1 h 15 min unter Rückfluss erhitzt. SOCl_2 wurde abdestilliert und ließ einen wachsartigen Feststoff zurück, der in etwa 1 L Toluol aufgenommen wurde. Das LM wurde i.Vak. entfernt und das Produkt wurde als gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6.80 g (40.7 mmol, 40 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): Wie in der Literatur beschrieben, wurde kein H-Signal beobachtet.^[155]

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 157.3$ (C-1, 4), 135.8 (C-2, 3) ppm.

Synthese von 2,3-Dichlornaphthazarin (44)

In einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer wurden 18.2 g (136.5 mmol) AlCl_3 zusammen mit 3.59 g (61.4 mmol) NaCl vorgelegt und auf 150 °C erhitzt. Bei Einsetzen der Schmelze wurden 5.06 g (30.3 mmol) **44** zusammen mit 2.19 g (15.9 mmol) 1,4-Dimethoxybenzen vermengt und portionsweise hinzugegeben. Es wurde auf 175 °C erhitzt und auf RT abgekühlt. Es wurde 1 M HCl -Lsg. hinzugegeben und 24 h bei RT gerührt (4 h KPG-Rührer, 20 h Magnetührer). Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und mit Wasser (3 x 50 mL) gewaschen und i.Vak. getrocknet. Es wurde ein violetter Feststoff erhalten, der ohne weitere Aufarbeitung verwendet wurde.

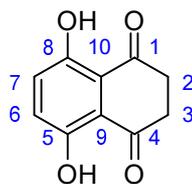
Ausbeute: 4.10 g (15.8 mmol, 100 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO_{d6} , 295 K): $\delta = 11.93$ (bs, 2 H, *H-OH, OH*), 7.21 (m_c , 2 H, *H-6, 7*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 178.1$ (C-1, 4), 159.8 (C-5, 8) 142.0 (C-2, 3), 128.7 (C-6, 7), 125.8 (C-2, 3), 111.7 (C-9, 10) ppm.

Die Ergebnisse der NMR-Messungen stimmten mit den literaturbekannten überein.^[154,155]

Synthese von Leukonaphthazarin (46)



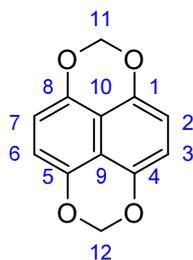
473 mg (1.83 mmol) **12** wurde zusammen mit 2.53 g (13.4 mmol) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 60 mL 4 M HCl-Lsg. suspendiert und unter Rückfluss für 4 h erhitzt. Die Reaktionssuspension wurde heiß über Celite filtriert. Die wässr. Phase wurde mit EE extrahiert und i.Vak. von LM befreit. Es wurde ein gelb bis rötlicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 108 mg (0.56 mmol, 31 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 11.91$ (s, 2 H, *H-OH, OH*), 7.19 (s, 2 H, *H-7, 8*), 2.992 (s, 4 H, *H-2, 3*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 201.5$ (C-1, 4), 155.17 (C-6, 9), 128.51 (C-7, 8), 114.43 (C-5, 10), 36.2 (C-2, 3) ppm.

Die Ergebnisse der NMR-Messungen stimmten mit den literaturbekannten Signalen überein.^[154,155]

Synthese von Naphtho[1,8-*de*;4,5-*d'e'*]bis-1,3-dioxin (47)

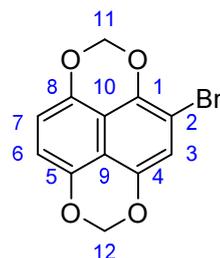
97.0 mg (0.51 mmol) **46** wurden zusammen mit 350 mg (2.53 mmol) K_2CO_3 in einem Zweihalskolben unter N_2 -Atm. vorgelegt und in abs. DMF suspendiert. Es wurde für 23 h bei 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit 10 mL H_2O gequenchet. Nach Zugabe von 10 mL DCM wurden die Phasen unter Zuhilfenahme von ges. NaCl-Lsg. getrennt. Die vereinigten org. Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das LM wurde i.Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cy/EE, 5:1) aufgereinigt. **47** wurde als beige-brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 33.8 mg (0.156 mmol, 31 %)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 295 K): δ = 6.76 (s, 4 H, *H*-2, 3, 6, 7), 5.44 (s, 4 H, *H*-11, 12) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 295 K): δ = 144.4 (C-1, 4, 5, 8), 115.2 (C-9, 10), 108.6 (C-2, 3, 6, 7), 91.7 (C-11, 12) ppm.

Die Ergebnisse der NMR-Messungen stimmten mit den literaturbekannten Signalen überein.^[154,155]

Synthese von 2-Bromnaphtho[1,8-*de*;4,5-*d'e'*]bis-1,3-dioxin (48)

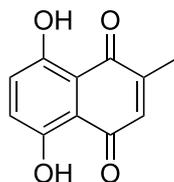
39.9 mg (0.19 mmol) **47** wurden mit 23.9 mg (0.19 mmol) frisch umkristallisiertem NBS vorgelegt und in abs. CHCl_3 gelöst. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurden 3 mL 10 %ige KOH-Lsg. hinzugegeben und 10 min bei RT gerührt. Die Phasentrennung erfolgte nach Zugabe von CHCl_3 und Wasser (je 30 mL). Die wässr. Phase wurde mit CHCl_3 (1 x 30 mL) extrahiert. Die verinigten org. Phasen wurden mit Wasser (1 x 30 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das LM wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde aus Isopropanol umkristallisiert, um **48** als farblosen bis bräunlichen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 28.2 mg (0.0956 mmol, 52 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 6.97 (s, 1 H, *H*-3), 6.83 (d, 1 H, ^3J = 8.2 Hz, *H*-7), 6.80 (d, 2 H, ^3J = 8.2 Hz, *H*-6), 5.50 (s, 2 H, *H*-12), 5.43 (s, 2 H, *H*-11) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 144.7 (C-8), 144.6 (C-1), 144.4 (C-5), 143.5 (C-4), 114.2 (C-3), 112.5 (C-2), 110.0 (C-9), 109.3 (C-10), 101.7 (C-7), 92.0 (C-6), 91.8 (C-12), 91.7 (C-11) ppm.

Die Ergebnisse der NMR-Messungen stimmten mit den literaturbekannten Signalen überein.^[154,155]

Synthese von 2-Methylnaphthazarin (82)

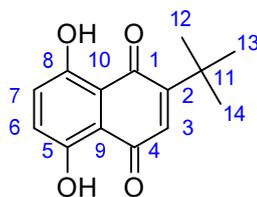
Es wurden 17.5 g (131 mmol) AlCl_3 zusammen mit 3.81 g (65.2 mmol) NaCl unter N_2 -Atm. vorgelegt und auf $170\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Bei Eintreten der Schmelze wurden 2.01 g (14.6 mmol) 1,4-Dimethoxybenzol in 4 mL (43.5 mmol) 2-Methylmaleinsäureanhydrid gelöst in einem Zeitraum von 10 min hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 10 min auf $200\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurden etwa 300 mL 12.5 %ige HCl -Lsg. unter Eiswasserkühlung hinzugegeben und für 22 h bei RT gerührt. 200 mL 5 %ige Oxalsäure wurden hinzugegeben und es wurde über Celite filtriert. Das Filtrat wurde auf $100\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und anschließend mit DCM (3 x 100 mL) extrahiert. Der Filterkuchen wurde ebenfalls mit DCM (3 x 250 mL) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. vom LM befreit. Das Rohprodukt wurde für die Flashchromatographie (EE 10 %, PE 90 %) vorbereitet und aufgereinigt. Es wurde ein roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 429 mg (2.10 mmol, 15 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 12.49$ (s, 1 H, $H\text{-OH}$), 12.38 (s, 1 H, $H\text{-OH}$), 7.12 (dd, 2 H, $H\text{-7, 8}$), 6.83 (q, 1 H, $^4J = 1.4\text{ Hz}$, $H\text{-3}$), 2.17 (d, 3 H, $^4J = 1.5\text{ Hz}$, $H\text{-11}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 183.7$ (C-4), 183.3 (C-1), 163.0 (C-6), 162.4 (C-9), 148.5 (C-4), 135.5 (C-3), 131.5 (C-7), 131.0 (C-8), 112.0 (C-5, 10) 16.5 (C-11) ppm.

Synthese von 2-Isobutylnaphthazarin (80)

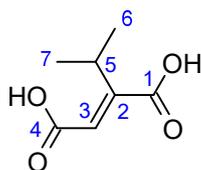


Es wurden 11.88 g (89.1 mmol) AlCl_3 zusammen mit 5.11 g (87.4 mmol) NaCl unter N_2 -Atm. vorgelegt und auf $145\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Bei Eintreten der Schmelze wurden 2.41 g (14.5 mmol) 2-(*tert*-Butyl)-benzen-1,4-diol vermengt mit 4.27 g (43.6 mmol) Maleinsäureanhydrid portionsweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf $150\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und die Temperatur wurde in 75 min Intervallen um $10\text{ }^\circ\text{C}$ erhöht bis eine Temperatur von $180\text{ }^\circ\text{C}$ erreicht war. Nach Abkühlen auf RT wurden 80 mL 25 %ige HCl -Lsg. unter Eiswasserkühlung hinzugegeben und über nacht bei RT gerührt. Es wurde mit Et_2O ($5 \times 80\text{ mL}$) extrahiert und die vereinigten org. Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (CHCl_3) aufgereinigt. Es wurde ein roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 89.8 mg (0.37 mmol, 2 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 12.87$ (s, 1 H, *H-OH*), 12.37 (s, 1 H, *H-OH*), 7.14 (d, $^4J = 1.0\text{ Hz}$, 2 H, *H-7,8*), 6.83 (s, 1 H, *H-3*), 1.33 (s, 9 H, *H-12,13,14*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 185.4$ (C-4), 185.2 (C-1), 161.3 (C-6), 160.1 (C-9), 158.9 (C-3), 133.7 (C-7), 130.6 (C-8), 130.0 (C-3), 112.8 (C-5), 111.6 (C-10), 36.0 (C-11), 29.3 (C-12, 13, 14) ppm.

Synthese von 2-Isopropyl-fumarsäurediethylester (62)

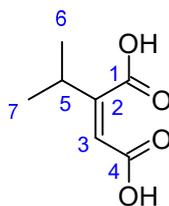
62 wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 1 dargestellt.

443 mg (17.6 mmol) NaH (60 %ig in Mineralöl) wurden mit 2.18 mL (19.7 mmol) Triethylphosphoacetat und 1.46 mL (17.2 mmol) Ethyl-3-methyl-2-oxobutyrat umgesetzt. Das Rohprodukt wurde als farblose Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Ausbeute: 2.01 g (9.38 mol, 94 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 5.70$ (d, 1 H, $^4J = 1.40$ Hz, H-5), 4.24 (q, 2 H, $^3J = 7.16$ Hz, H-7), 4.10 (q, 2 H, $^3J = 7.14$ Hz, H-2), 2.60 (m_c, 1 H, H-9) 1.27 (t, 3 H, $^3J = 7.16$ Hz, H-8), 1.21 (t, 3 H, $^3J = 7.15$ Hz, H-1), 1.07 (d, 6 H, $^3J = 6.86$ Hz, H-10, 11) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 169.2$ (C-6), 165.5 (C-3), 157.0 (C-5), 117.4 (C-4), 61.5 (C-7), 61.0 (C-2), 33.2 (C-9), 20.9 (C-10, 11), 14.4 (C-8), 14.3 (C-1) ppm.

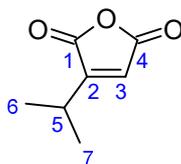
Synthese von 2-Isopropyl-fumarsäure (69)

Zu einer Lösung aus 2.03 g (9.48 mmol) **62** in 30 mL THF wurden 30 mL 2 N LiOH-Lsg. gegeben und für etwa 20 h bei RT gerührt. THF wurde i.Vak. entfernt und die wässr. Lösung wurde mit 1 M HCl-Lsg. angesäuert. Es wurde mit EE (3 x 50 mL) extrahiert und die vereinigten org. Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde i.Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde als farblose Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Ausbeute: 792 mg (5.01 mol, 53 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 295 K): δ = 6.49 (d, 1 H, ⁴J = 1.6 Hz, H-4), 2.83 (m_c, 1 H, ³J = 6.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, H-7), 1.21 (d, 6 H, ³J = 6.9 Hz, H-2) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 295 K): δ = 174.1 (C-1), 170.5 (C-4), 157.5 (C-2), 127.0 (C-3), 26.6 (C-5), 20.5 (C-6,7) ppm.

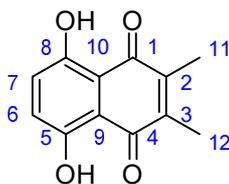
Synthese von 2-Isopropyl-fumarsäureanhydrid (70)

503 mg (3.18 mmol) **69** wurde in 4.4 mL Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) gelöst und 22 h bei RT gerührt. TFAA wurde i.Vak. entfernt. **70** wurde als leicht bräunliche Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

Ausbeute: 308 mg (2.20 mol, 69 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 6.49$ (d, 1 H, $^4J = 1.6$ Hz, H-4), 2.84 (m_c , 1 H, $^3J = 6.9$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, H-7), 1.21 (d, 6 H, $^3J = 6.9$ Hz, H-2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 165.2$ (C-1), 164.2 (C-4), 159.3 (C-2), 127.0 (C-3), 26.6 (C-5), 20.5 (C-6,7) ppm.

Synthese von 2,3-Dimethylnaphthazarin (84)

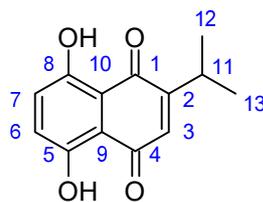
Die Synthese wurde nach der Allgemeinen Synthesevorschrift 2 durchgeführt.

Es wurden 4.14 g (31.1 mmol) AlCl_3 zusammen mit 1.76 g (30.1) NaCl unter N_2 -Atm. vorgelegt und auf 150 °C erhitzt. Bei Eintreten der Schmelze wurden 1.90 g (15.0 mmol) 2,3-Dimethylmaleinsäureanhydrid vermengt mit 0.70 g (5.09 mmol) 1,4-Dimethoxybenzen portionsweise hinzugegeben. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (EE/PE, 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 82.4 mg (0.378 mmol, 7 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 12.57$ (s, 2 H, *H-OH, OH*), 7.14 (s, 2 H, *H-7, 8*), 2.13 (s, 6 H, *H-2, 3*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 186.5$ (C-1, 4), 158.4 (C-5, 8), 144.4 (C-2, 3), 129.3 (C-6, 7), 111.6 (C-9, 10), 12.5 (C-11, 12) ppm.

Synthese von 2-Isopropyl-naphthazarin (88)

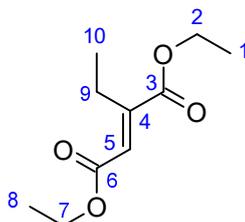
Die Synthese wurde nach der Allgemeinen Synthesevorschrift 2 durchgeführt.

Es wurden 2.27 g (17.0 mmol) AlCl_3 zusammen mit 0.99 g (16.9 mmol) NaCl unter N_2 -Atm. vorgelegt und auf 150 °C erhitzt. Bei Eintreten der Schmelze wurden 731 mg (2.82 mmol) **62** vermengt mit 311 mg (2.25 mmol) 1,4-Dimethoxybenzen portionsweise hinzugegeben. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (1. EE/PE, 1:1, 2. DCM) aufgereinigt. Es wurde ein roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 21.2 mg (0.09 mmol, 4 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 12.63 (s, 1 H, *H-OH*), 12.41 (s, 1 H, *H-OH*), 7.15 (s, 2 H, *H-6,7*), 6.78 (d, 1 H, $J=1.00\text{Hz}$ *H-3*), 3.22 ($d_{\text{sept.}}$, 1 H, $^3J = 6.9\text{ Hz}$, $^4J = 1.1\text{ Hz}$, *H-11*) 1.16 (d, 6 H, $J = 6.9\text{ Hz}$, *H-12,13*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 184.1 (C-1), 183.4 (C-4), 162.2 (C-5), 161.4 (C-8), 157.7 (C-2), 132.2 (C-3), 130.8 (C-6), 130.6 (C-7), 112.1 (C-9), 111.5 (C-10), 26.9 (C-11), 21.6 (C-12,13) ppm.

Synthese von 2-Ethyl-fumarsäure (61)

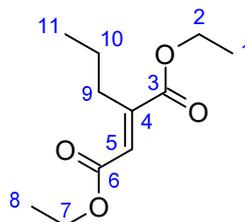
61 wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 1 dargestellt.

689 mg (28.7 mmol) NaH (60 %ig in Mineralöl) wurden mit 2.53 g (19.4 mmol) Triethylphosphoacetat und 2.44 mL (17.2 mmol) Ethyl-2-oxobutyrat in 50 mL THF umgesetzt. Das Rohprodukt wurde als säulenchromatographisch (EE/PE, 5:95) aufgereinigt und als farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 2.22 g (11.1 mmol, 64 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 5.78 (d, 1 H, ^4J = 1.4 Hz, H-5), 4.31 (q, 2 H, ^3J = 7.2 Hz, H-7), 4.18 (q, 2 H, ^3J = 7.2 Hz, H-2), 1.34 (t, 3 H, ^3J = 7.2 Hz, H-), 2.34 (m_c , 2 H, H-9), 1.28 (t, 3 H, ^3J = 7.2 Hz, H-10) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 169.2 (C-3), 165.3 (C-6), 150.8 (C-5), 119.4 (C-4), 61.6 (C-7), 61.0 (C-2), 36.7 (C-9), 14.4 (C-8), 14.3 (C-1), 13.7 (C-10) ppm.

Synthese von 2-Propyl-fumarsäure (63)

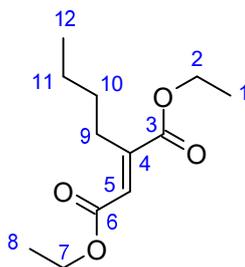
63 wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 1 dargestellt.

240 mg (10.0 mmol) NaH (60 %ig in Mineralöl) wurden mit 1.00 mL (5.00 mmol) Triethylphosphonoacetat und 0.72 mL (17.2 mmol) Ethyl-2-oxopentanoat umgesetzt. Das Rohprodukt wurde als farblose Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Ausbeute: 622 g (2.90 mol, 58 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 5.80 (t, 1 H, ^4J = 1.5 Hz, H-5), 4.30 (q, 2 H, ^3J = 7.2 Hz, H-7), 4.19 (q, 2 H, ^3J = 7.1 Hz, H-2), 2.34 (m_c , 2 H, H-9), 1.55 (sextett, 2 H, ^3J = 7.6 Hz, H-10), 1.34 (t, 3 H, ^3J = 7.2 Hz, H-9), 1.28 (t, 3 H, ^3J = 7.2 Hz, H-11) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 169.3 (C-3), 165.3 (C-6), 150.8 (C-5), 119.6 (C-4), 61.6 (C-7), 61.0 (C-2), 36.7 (C-9), 20.5 (C-10), 14.4 (C-8), 14.3 (C-1), 13.7 (C-11) ppm.

Synthese von 2-Butyl-fumarsäure (64)

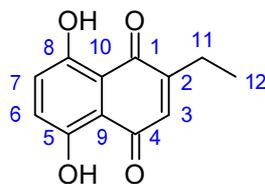
64 wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 1 dargestellt.

443 mg (17.6 mmol) NaH (60 %ig in Mineralöl) wurden mit 2.18 mL (19.7 mmol) Triethylphosphoacetat und 1.46 mL (17.2 mmol) Ethyl-3-methyl-2-oxobutyrat umgesetzt. Das Rohprodukt wurde als farblose Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Ausbeute: 2.01 g (9.38 mol, 94 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 5.80 (t, 1 H, ^4J = 1.5 Hz, H -5), 4.31 (q, 2 H, ^3J = 7.2 Hz, H -7), 4.18 (q, 2 H, ^3J = 7.1 Hz, H -2), 2.37 (t, 2 H, ^3J = 7.6 Hz, H -9) 1.50 (m_c , 2 H, H -11), 1.34 (m_c , 8 H, H -1, 8, 10), 0.93 (t, 3 H, ^3J = 7.3 Hz, H -12) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 169.0 (C-3), 165.0 (C-6), 150.8 (C-5), 119.1 (C-4), 61.2 (C-7), 60.6 (C-2), 34.1 (C-10), 29.0 (C-9), 22.0 (C-11) 14.1 (C-9), 14.0 (C-1), 13.7 (C-12) ppm.

Synthese von 2-Ethyl-naphthazarin (85)

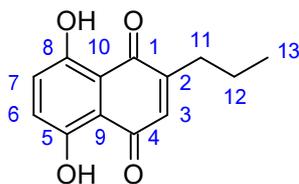
Die Synthese wurde nach der Allgemeinen Synthesevorschrift 2 durchgeführt.

4.08 g (30.6 mmol) AlCl_3 wurden zusammen mit 1.80 g (30.8) NaCl in einer Schmelze eingesetzt. Es wurden 998 mg (4.98 mmol) **61** vermengt mit 368 mg (2.66 mmol) 1,4-Dimethoxybenzen portionsweise hinzugegeben, um das Produkt **85** zu erhalten. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Aceton/Cy, 15:85) aufgereinigt. Es wurde ein roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 46.4 mg (0.21 mmol, 8 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 12.62 (s, 1 H, *H-OH*), 12.41 (s, 1 H, *H-OH*), 7.14 (s, 2 H, *H-6,7*), 6.78 (s, 1 H, *H-3*), 1.16 (d, 5 H, 3J = 6.9 Hz, *H-11,12*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 184.4 (C-1), 183.7 (C-4), 162.5 (C-5), 161.7 (C-8), 158.0 (C-2), 132.6 (C-3), 131.1 (C-6), 131.0 (C-7), 112.4 (C-9), 111.9 (C-10), 27.2 (C-11), 21.9 (C-12) ppm.

Synthese von 2-Propylnaphthazarin (86)

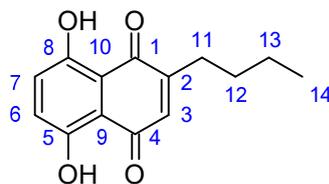
Die Synthese wurde nach der Allgemeinen Synthesevorschrift 2 durchgeführt.

1.76 g (13.2 mmol) AlCl_3 wurden zusammen mit 0.71 g (12.2 mmol) NaCl in einer Schmelze eingesetzt. Es wurden 435 mg (2.03 mmol) **63** vermengt mit 188 mg (1.36 mmol) 1,4-Dimethoxybenzen portionsweise hinzugegeben, um das Produkt **86** zu erhalten. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Aceton/Cy, 15:85) aufgereinigt. Es wurde ein roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 34.8 mg (0.15 mmol, 11 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 12.55 (s, 1 H, *H-OH*), 12.40 (s, 1 H, *H-OH*), 7.13 (s, 2 H, *H-6, 7*), 6.78 (s, 1 H, *H-3*), 2.51 (t, 2 H, 3J = 7.6 Hz, *H-11*), 1.57 (sextett, 2 H, 3J = 7.6 Hz, *H-12*), 0.98 (t, 3 H, 3J = 7.4 Hz, *H-13*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 183.3 (C-1), 183.2 (C-4), 162.7 (C-5), 162.0 (C-8), 151.9 (C-2), 134.4 (C-3), 131.0 (C-6), 130.7 (C-7), 111.9 (C-9), 111.7 (C-10), 31.3 (C-11), 21.3 (C-12), 13.8 (C-13) ppm.

Synthese von 2-Butylnaphthazarin (89)

Die Synthese wurde nach der Allgemeinen Synthesevorschrift 2 durchgeführt.

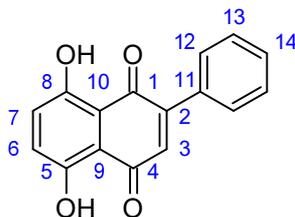
1.90 g (14.2 mmol) AlCl_3 wurden zusammen mit 0.73 g (12.5 mmol) NaCl in einer Schmelze eingesetzt. Es wurden 498 mg (2.18 mmol) **64** vermengt mit 187 mg (1.35 mmol) 1,4-Dimethoxybenzen portionsweise hinzugegeben, um das Produkt **85** zu erhalten. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Aceton/Cy, 15:85) aufgereinigt. Es wurde ein roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 42.6 mg (0.17 mmol, 13 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 12.65 (s, 1 H, *H-OH*), 12.49 (s, 1 H, *H-OH*), 7.22 (s, 2 H, *H-6,7*), 6.87 (t, 1 H, *H-3*), 2.63 (t, 2 H, $^3J = 7.7$ Hz, *H-11*) 1.61 (pentett, H, $^3J = 7.5$ Hz, *H-12*), 1.45 (sextett, H, $^3J = 7.3$ Hz, *H-13*), 0.98 (t, 3 H, $^3J = 7.3$ Hz, *H-14*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 183.4 (C-1), 183.3 (C-4), 162.6 (C-5), 161.9 (C-8), 152.2 (C-2), 134.3 (C-3), 131.1 (C-6), 130.7 (C-7), 111.9 (C-9), 111.7 (C-10), 30.2 (C-11), 29.1 (C-12), 22.5 (C-13), 13.8 (C-14) ppm.

Synthese von 2-Phenylnaphthazarin (91)



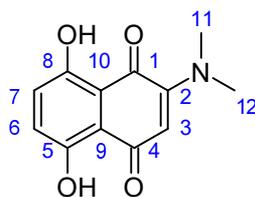
Die Synthese wurde nach der Allgemeinen Synthesevorschrift 2 durchgeführt.

Es wurden 2.42 g (18.1 mmol) AlCl_3 zusammen mit 1.05 g (18.0 mmol) NaCl unter N_2 -Atm. vorgelegt und auf 150 °C erhitzt. Bei Eintreten der Schmelze wurden 531 mg (3.05 mmol) 2-Phenylmaleinsäureanhydrid vermengt mit 279 mg (2.02 mmol) 1,4-Dimethoxybenzen portionsweise hinzugegeben. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Aceton/ Et_2O , 1:10) aufgereinigt. Es wurde ein roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 26.0 mg (0.10 mmol, 21 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 12.76 (s, 1 H, *H-OH*), 12.48 (s, 1 H, *H-OH*), 7.52 (m_c , 2 H, *H-12, 12'*), 7.42 (m_c , 3 H, *H-13, 13', 14*), 7.16 (s, 2 H, *H-6, 7*), 7.08 (s, 1 H, *H-3*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 179.7 (C-1), 179.1 (C-4), 166.3 (C-5), 165.4 (C-8), 147.7 (C-2), 134.3 (C-), 133.3 (C-), 132.4 (C-), 132.3 (C-), 130.0 (C-13, 13'), 129.4 (C-14), 128.5 (C-12, 12'), 112.2 (C-9), 111.9 (C-10) ppm.

Synthese von *N,N*-Dimethylaminonaphthazarin (92)

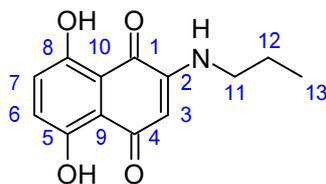
Es wurden 2.18 g (11.4 mmol) Naphthazarin **12** und 0.523 g (11.6 mmol) *N,N*-Dimethylamin in Ethanol gelöst und über 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das LM wurde i.Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE/PE, 1:4) aufgereingt. Es wurde ein roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.18 g (5.06 mmol, 44 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): $\delta = 12.20$ (s, 2 H, *H-OH*), 7.08 (m_c , 2 H, *H-6, 7*), 5.68 (s, 1 H, *-c*), 3.24 (s, 6 H, *H-11, 12*) ppm.

Die Ergebnisse der NMR-Messungen stimmten mit den literaturbekannten Signalen überein.^[232]

9.4.1. Synthese von 2-*n*-Butylaminonaphthazarin (**95**)

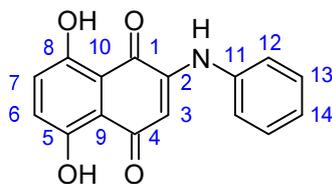


Es wurden 105 mg (0.56 mmol) Naphthazarin (**12**) in 5 mL Wasser suspendiert und mit 98.8 μ L (1 mmol) Butylamin versetzt. Es wurde für 3 h gerührt und filtriert und mit EE (3 \times 10 mL) gewaschen. Die vereinten org. Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das LM i.Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie (DCM) aufgereinigt und aus Ethanol umkristallisiert. **95** wurde als roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 7.7 mg (0.03 mmol, 5 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 13.31 (s, 1 H, *H-OH*), 11.77 (s, 1 H, *H-OH*), 7.19 (d, 1 H, J = 9.3 Hz, *H-6*), 7.02 (d, 1 H, J = 9.3 Hz, *H-7*), 6.00 (bs, 1 H, *H-NH*) 5.61 (s, 1 H, *H-3*), 3.14 (q, 2 H, J = 6.7 Hz, *H-11*), 1.62 (p, 2 H, J = 4.9 Hz, *H-12*), 1.38 (sext., 2 H, J = 7.5 Hz, *H-13*), 0.91 (t, 3 H, J = 7.4 Hz, *H-14*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 295 K): δ = 187.1 (C-1), 183.8 (C-4), 157.9 (C-5), 156.1 (C-8), 148.7 (C-2), 131.6 (C-6), 125.9 (C-7), 111.6 (C-10), 111.1 (C-9), 100.5 (C-2), 42.4 (C-11), 30.2 (C-12), 20.2 (C-13), 13.7 (C-14) ppm.

Synthese von 2-Phenylaminonaphthazarin (96)

Es wurden 116 mg (0.61 mmol) Naphthazarin (**12**) in 10 mL EtOH gelöst und mit 70.0 μ L (0.77 mmol) Anilin versetzt. Es wurde über 8 d bei RT gerührt. Das LM wurde i.Vak. entfernt. Die vereinten org. Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie (EE/PE) aufgereinigt und aus Ethanol umkristallisiert. **96** wurde als roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 55.9 mg (0.21 mmol, 34 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 295 K): δ = 13.15 (s, 1 H, *H*-OH), 11.84 (s, 1 H, *H*-OH), 7.62 (bs, 1 H, *H*-6), 7.38 (t, 1 H, ³J=7.6Hz, *H*-7), 7.21 (m_c, 6 H, *H*-NH) 7.09 (d, 1 H, *H*-3), 6.28 (s, 1 H, *H*-11) ppm.

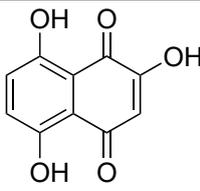
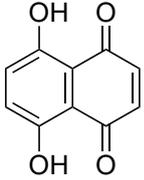
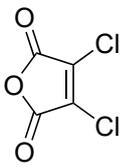
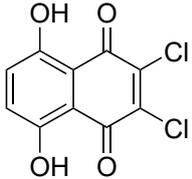
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 295 K): δ = 187.9 (C-1), 183.8 (C-4), 158.1 (C-5), 156.3 (C-8), 145.7 (C-2), 137.0 (C-11), 131.8, 129.8, 126.5, 126.2, 122.9, 116.5, 112.2, 103.3 ppm.

Anhang A.

Anhang

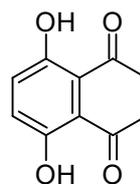
A.1. Verbindungsverzeichnis

In der nachfolgenden Tabelle sind die wichtigsten Produkte und Zwischenprodukte der Arbeit mit ihrem zugehörigen Laborbezeichnung abgebildet.

Nummer	Laborcode	Strukturformel
25	BJ-8	 <chem>Oc1ccc2c(c1)cc(O)c(=O)c2=O</chem>
114	Naphtharain	 <chem>Oc1ccc2c(c1)cc(O)c(=O)c2=O</chem>
43	BJ-10	 <chem>O=C1OC(=O)C(Cl)=C1Cl</chem>
44	BJ-11	 <chem>Oc1ccc2c(c1)cc(O)c(=O)c2Cl</chem>

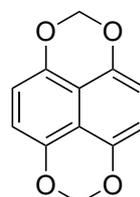
46

BJ-12



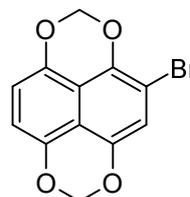
47

BJ-13



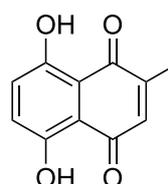
48

BJ-14



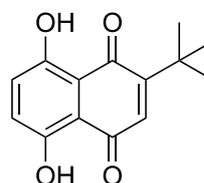
82

BJ-18



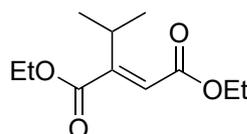
80

BJ-19



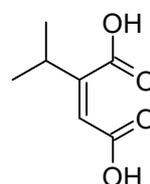
62

BJ-22



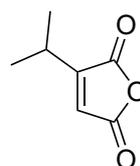
69

BJ-25



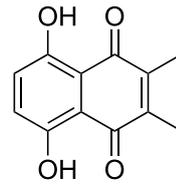
70

BJ-26



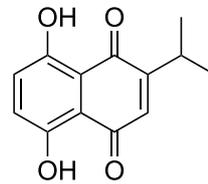
84

BJ-27



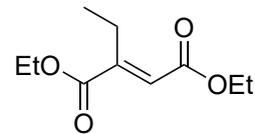
88

BJ-28



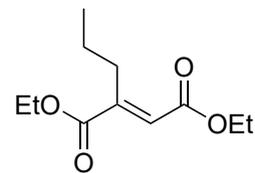
61

BJ-30



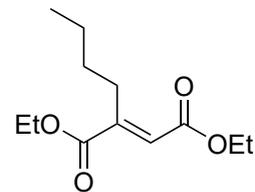
63

BJ-31



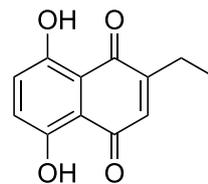
64

BJ-32



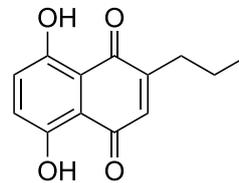
85

BJ-34



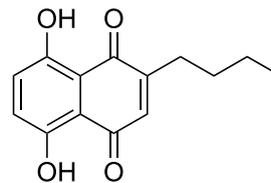
86

BJ-35



89

BJ-36



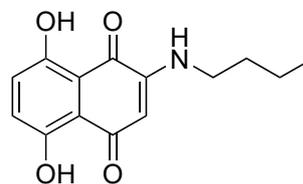
91

BJ-39



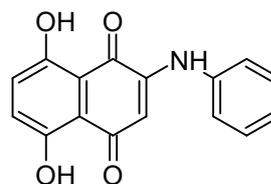
95

BJ-43



96

BJ-49



A.2. Etablierung der FRANZ-Diffusionszelle anhand von Ciclopirox (99)

In der nachfolgenden Tab. A.2 sind die ermittelten Steigungen der FRANZ-Diffusionszellen, die für die Etablierung des Testsystems mit Ciclopirox eingesetzt wurden abgebildet.

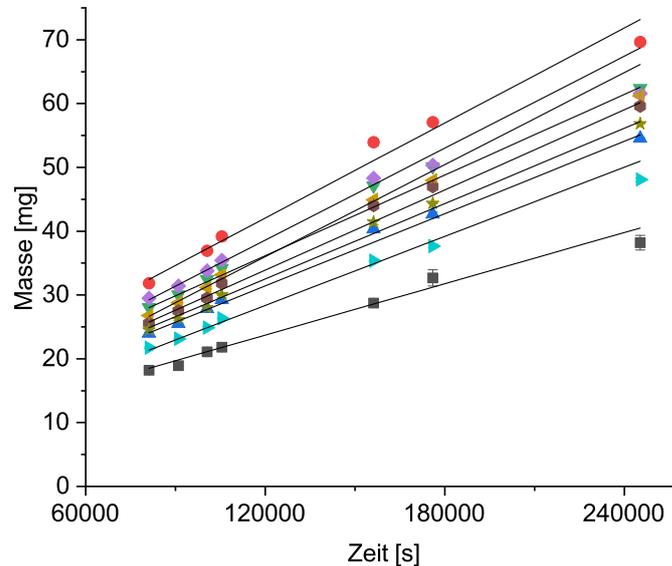


Abb. A.1.: Die Kurvenverläufe der Messungen mit den FRANZ-Diffusionszellen in Verwendung von Ciclopirox nach der Methode von MERTIN und LIPPOLD.^[52]

Tab. A.2.: Die aus den Kurvenverläufen der Messungen mit den FRANZ-Diffusionszellen in Verwendung von Ciclopirox bestimmten Steigungen zur Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten P nach der Methode von MERTIN und LIPPOLD.^[52]

Zelle	$\frac{dm}{dt}$ [$10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$]
1	1.34 ± 0.07
2	2.48 ± 0.13
3	1.89 ± 0.06
4	2.11 ± 0.03
5	2.40 ± 0.11
6	2.40 ± 0.06
7	1.81 ± 0.06
8	2.10 ± 0.06
9	1.97 ± 0.04

Der errechnete Mittelwert ergab $2.15 \pm 0.26 \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Ausreißer wurden mittels Grubbs-Test ermittelt.

A.3. Ramanspektren

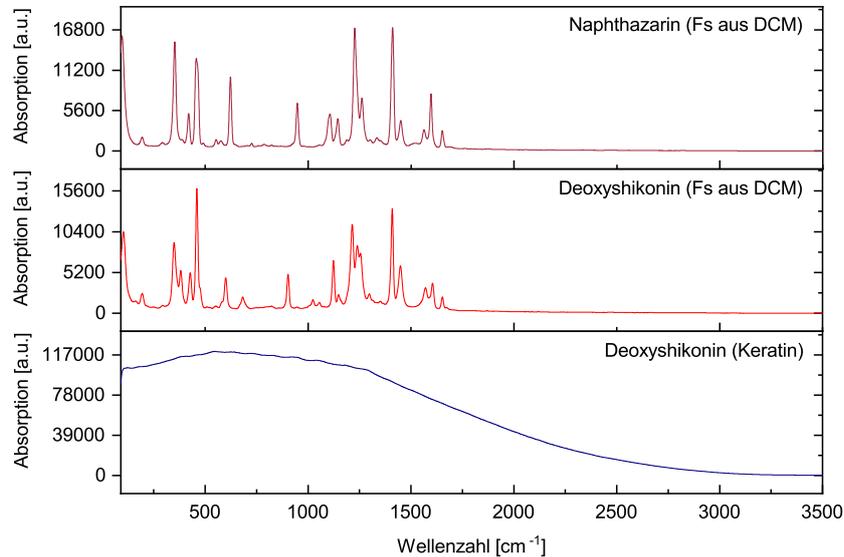


Abb. A.2.: Abgebildet sind die Ramanspektren von Naphthazarin (**104**) kristallisiert aus DCM (oben), Deoxyshikonin (**20**) kristallisiert aus DCM (mitte) und Deoxyshikonin (**20**) nach Permeation ins Keratin (unten).

A.4. Zusatzdaten zur eingesetzten Lampe



Abb. A.3.: **Links:** Foto der beschriebenen Lampe. Mit Hilfe des Steuermoduls konnten die Intensität und die Bestrahlungsdauer genau gesteuert werden. **Rechts:** Abgebildet ist die Lampe auf ihrem Metallgestell, welches für die Bestrahlung von Mikrotiterplatten verwendet wurde.

A.5. Emissionsspektrum der eingesetzten Lampe



LED-Belichtungsaufbau für
Mikrotiterplatten 530 nm

LED-Typ: 8 x Nichia NCSG219-V1

Rank: B13-B15

typ. gesamte optische Leistung:

1000 mW (25 %) 2200 mW (50 %)

3400 mW (75 %) 4600 mW (100 %)

Emissionscharakteristik:

Spektrometer: Ocean Optics USB 4000

Peakwellenlänge: 515 nm (25%) - 519 nm (100 %)

FWHM: 37 nm (100 %)

Spektrum:

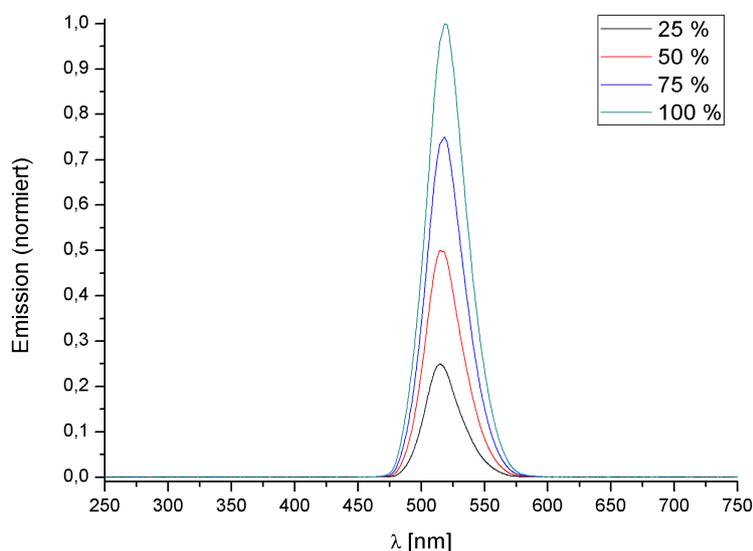
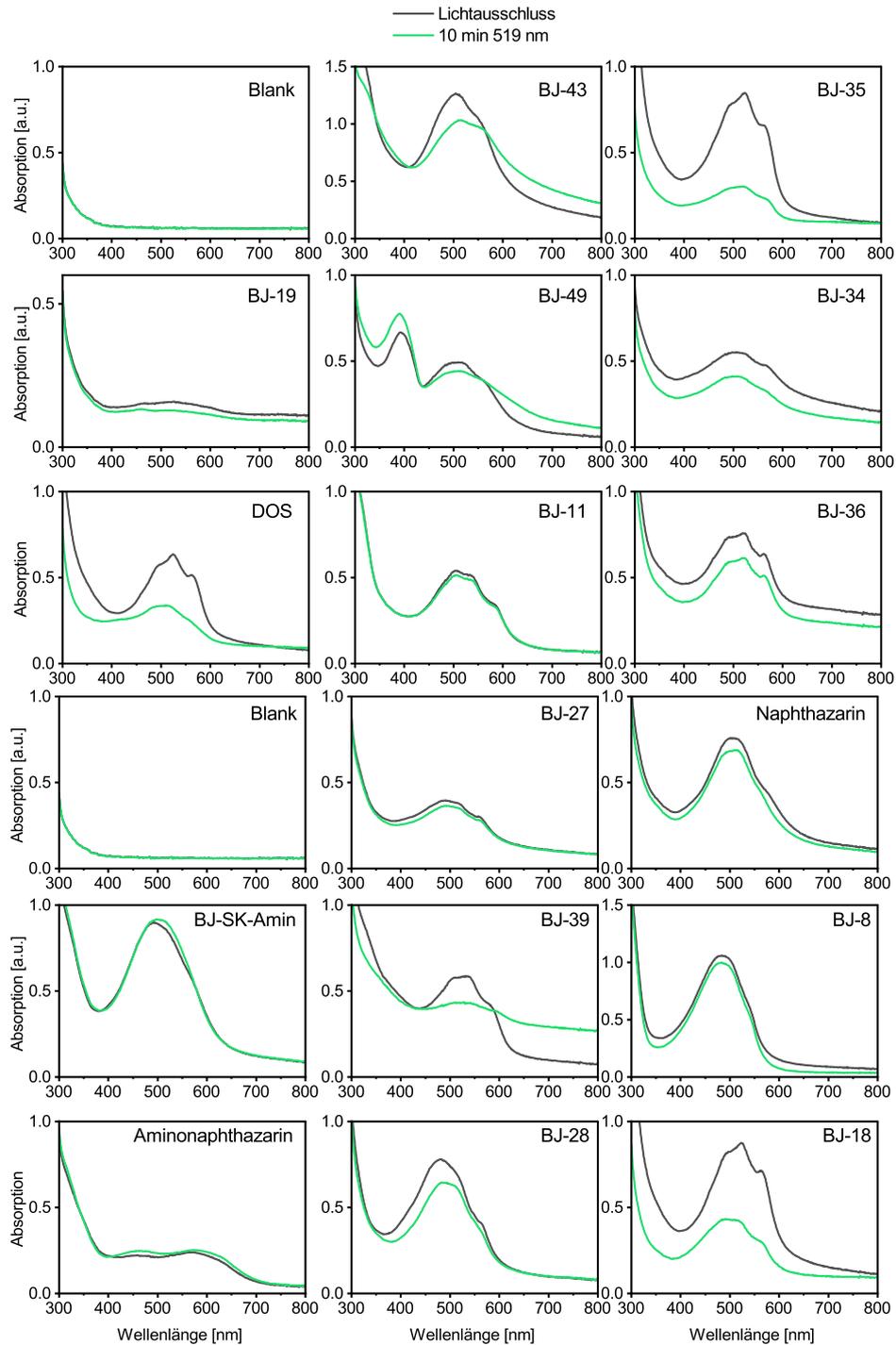


Abb. A.4.: Abgebildet ist das Emissionsspektrum der in den Bestrahlungsversuchen verwendeten Lampe. Ihre Peakwellenlänge bei 100 % Intensität liegt bei 519 nm.

A.6. UV/Vis-Spektren der synthetisierten Zielverbindungen

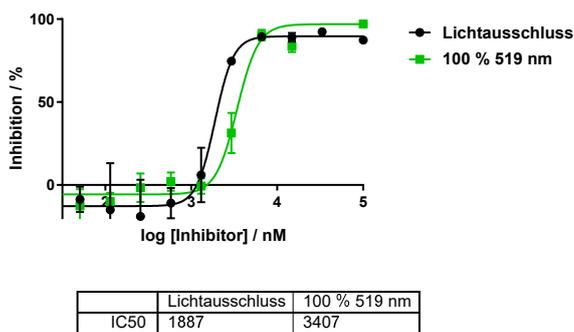
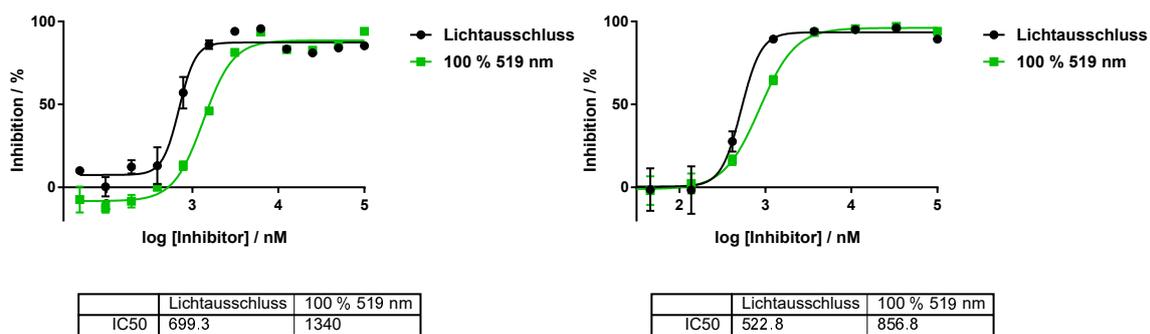
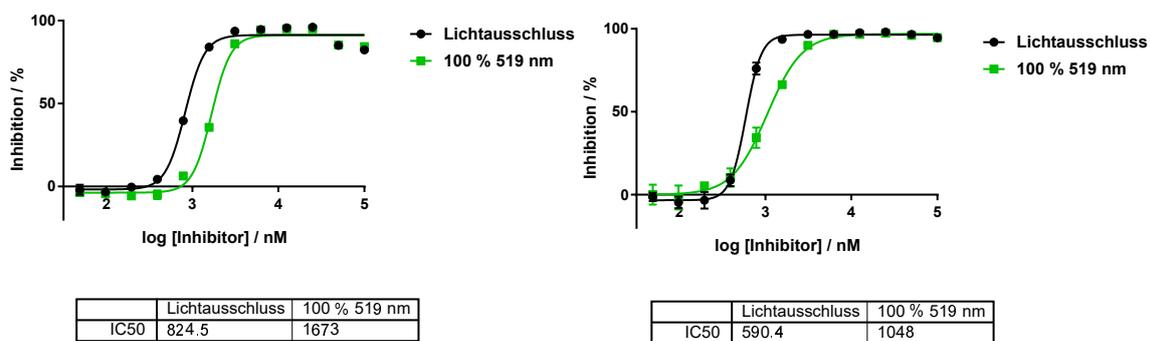
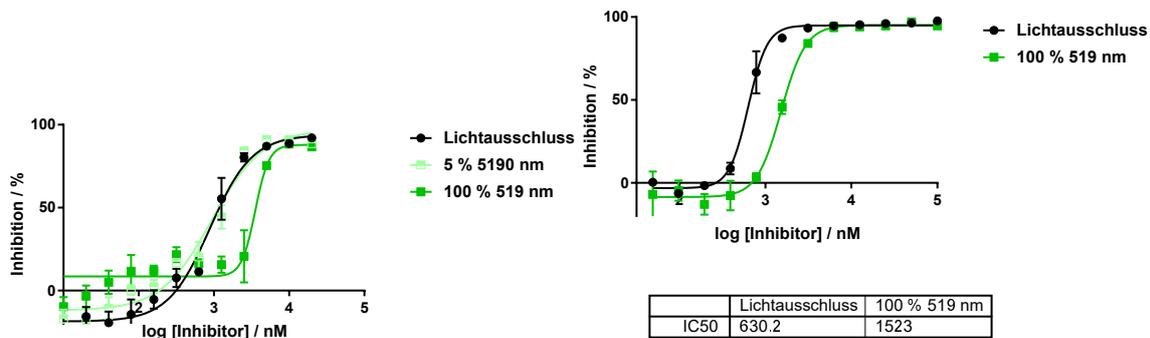
Nachfolgend abgebildet sind die UV-Spektren der Naphthazarinderivate unter Lichtausschluss (schwarz) und nach Bestrahlung (grün) mit Licht einer Wellenlänge von 519 nm (10 min, 4600 mW, 6.5 mW/cm² Nennleistung).



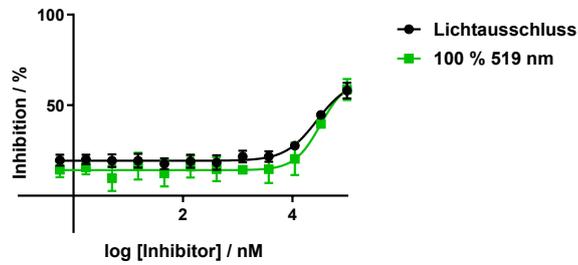
A.7. Dosis-Wirkungs-Kurven der Testsubstanzen gegen *C. albicans*

In Kap.6 wurde eine Auswahl an Dosis-Wirkungs-Kurven gezeigt. Nachfolgend sind auch die Kurven, die nur mit IC_{50} -Wert erwähnt wurden.

Nystatin (31)

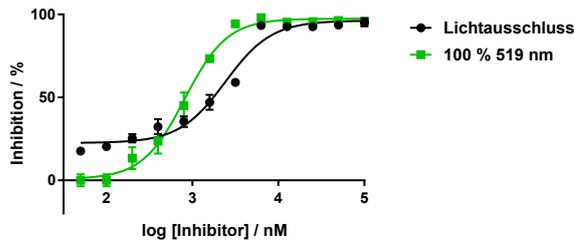


Amorolfin-HCl (100)

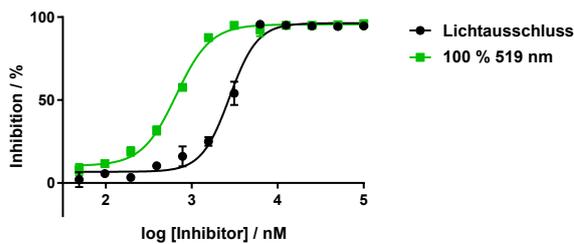
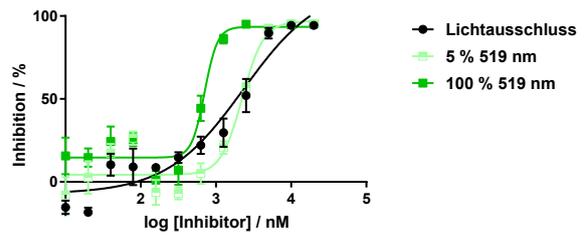


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	28086	32717

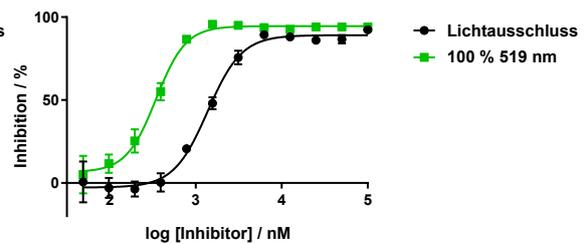
Naphthazarin (12)



	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	2421	814.1

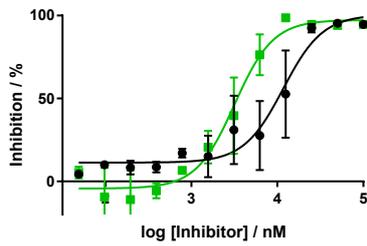


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	2749	659.8

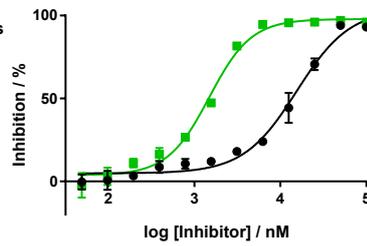


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	1376	344.7

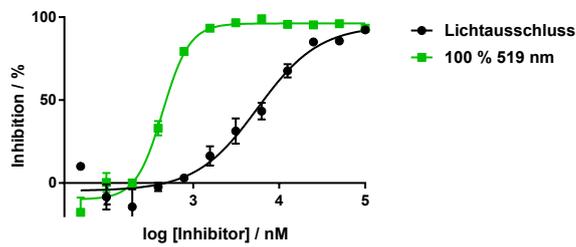
BJ-18 (82)



	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	11708	3183

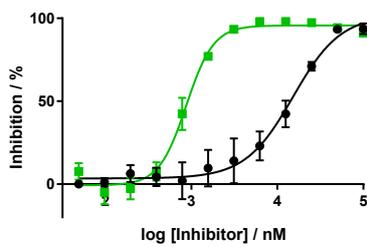


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	15496	1491

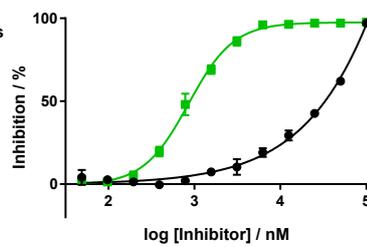


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	5596	441.9

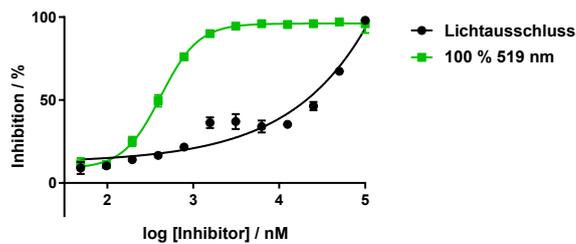
BJ-34 (85)



	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	15235	871.5

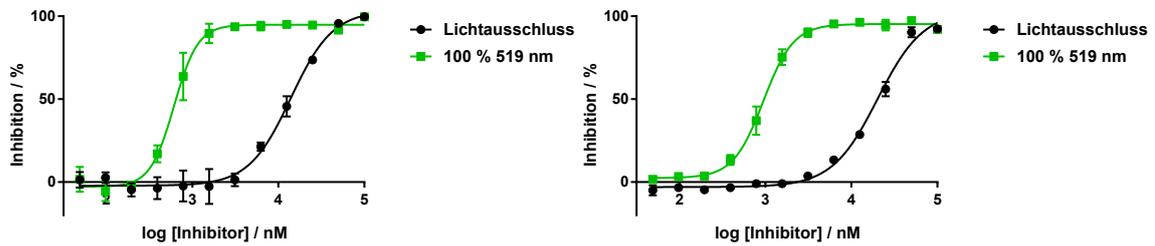


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 2034099	853.3



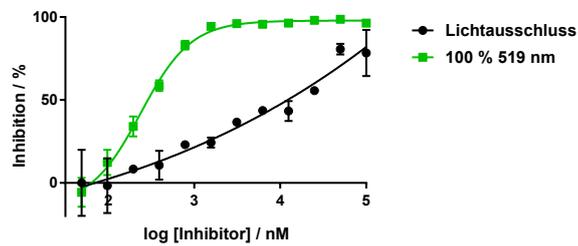
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 2457516637585	420.4

BJ-35 (86)



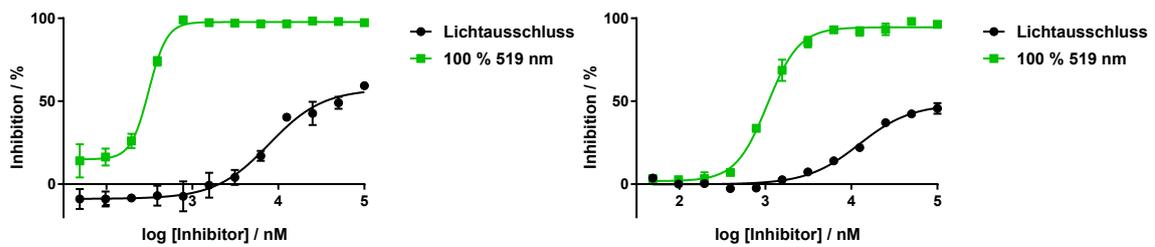
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	13954	612.3

	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	20147	945.9



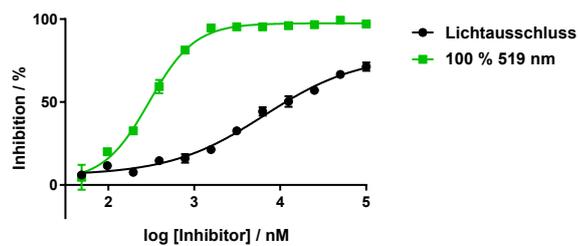
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 2866435957	237.8

BJ-36 (89)



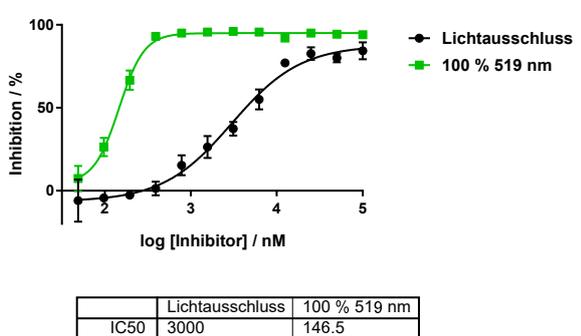
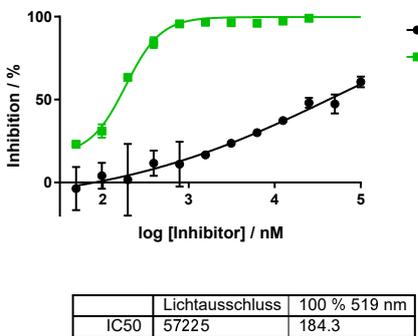
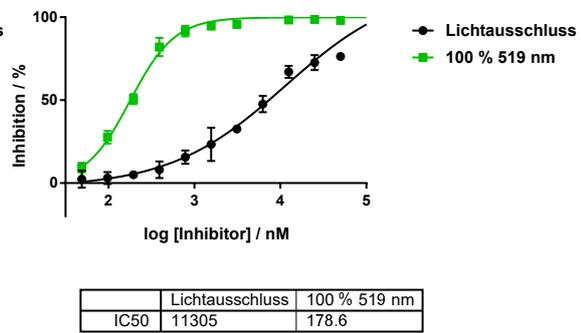
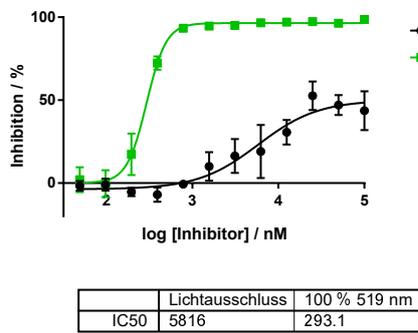
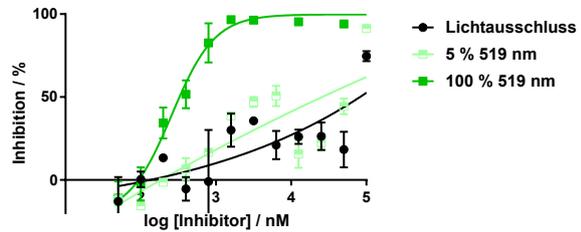
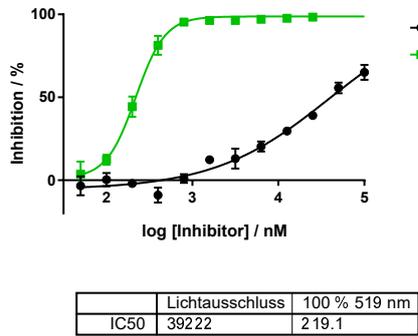
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	7830	310.7

	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	12327	1057

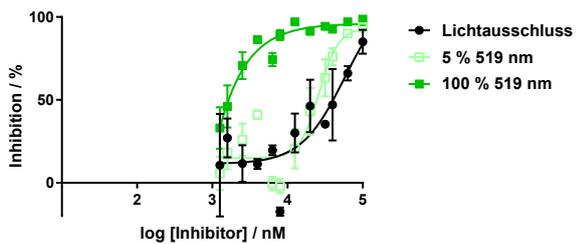
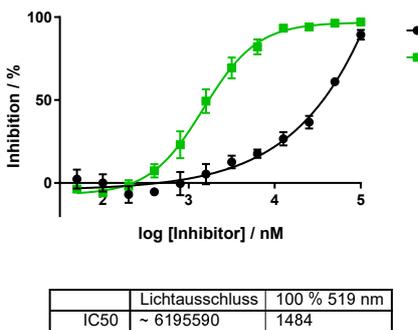


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	6526	298.8

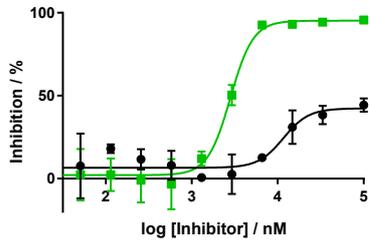
Deoxyshikonin (20)



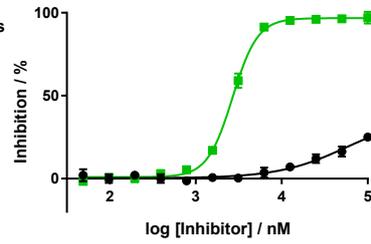
Shikonin (19)



BJ-27 (84)

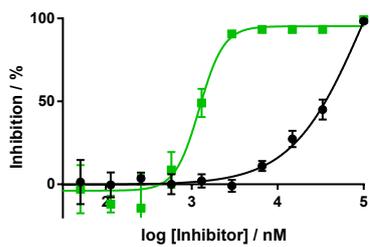


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	11654	2815

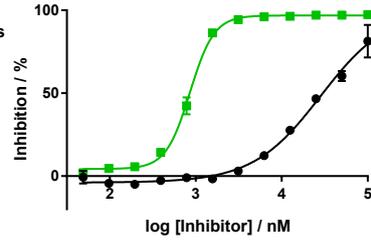


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	56542	2676

BJ-28 (88)

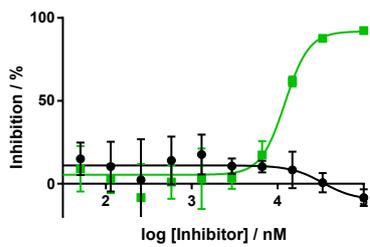


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	101525	1227

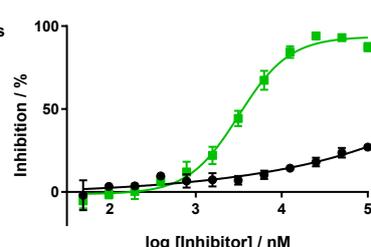


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	28388	857

BJ-19 (80)

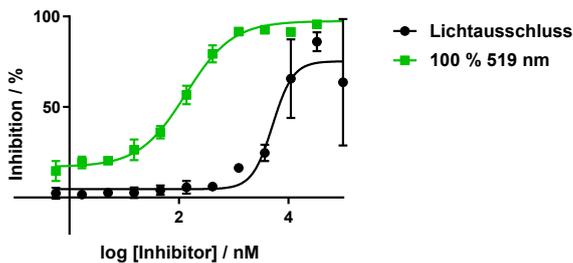


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	33458	12125



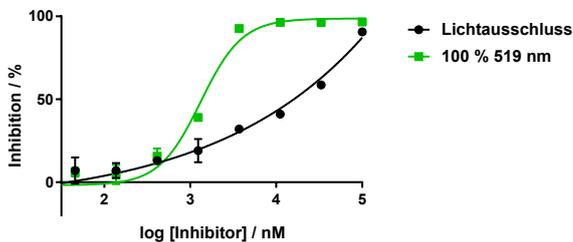
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 1.903e+014	3167

BJ-39 (91)



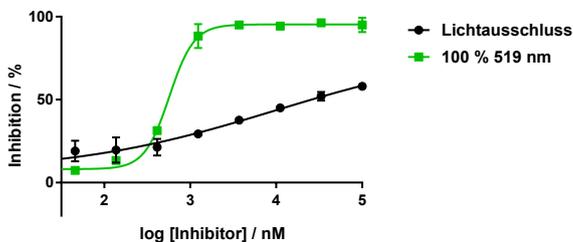
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	5148	134.2

BJ-SK-Amin (92)



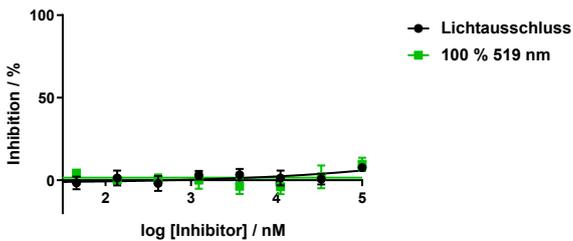
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 4.298e+017	1320

BJ-49 (96)



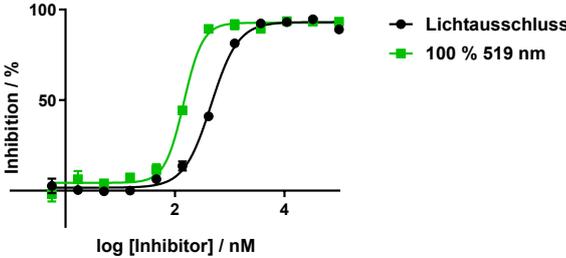
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	9641	570

BJ-8 (25)



	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 62448956773171	~ 0.8339

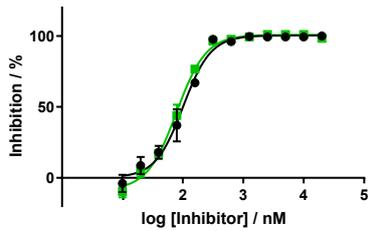
BJ-11 (44)



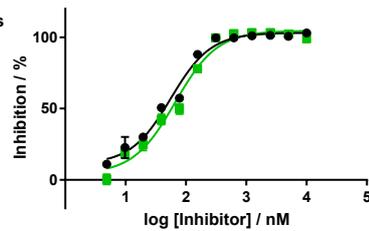
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	457.8	144.8

A.8. Dosis-Wirkungs-Kurven der Testsubstanzen gegen *T. rubrum*

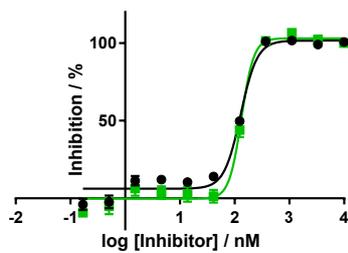
Clotrimazol (103)



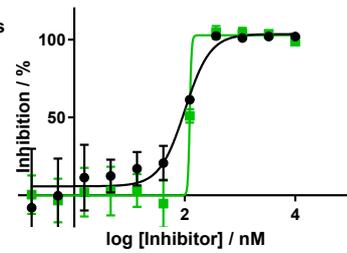
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	101.1	78.6



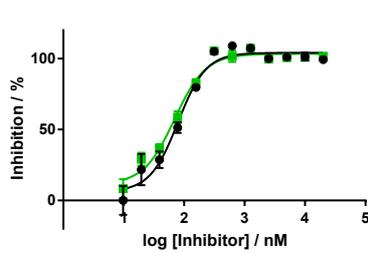
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	56.05	66.56



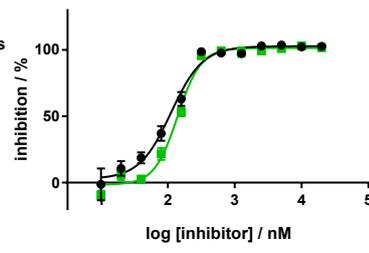
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	128.8	133



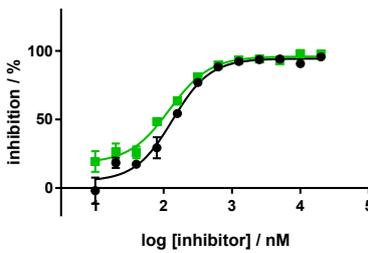
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	100.8	~ 123.5



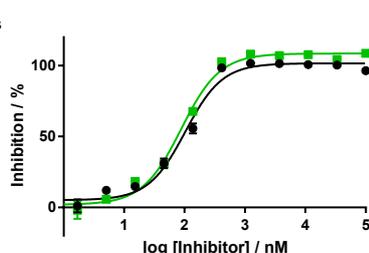
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	78.95	69.45



	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	111.8	140.3

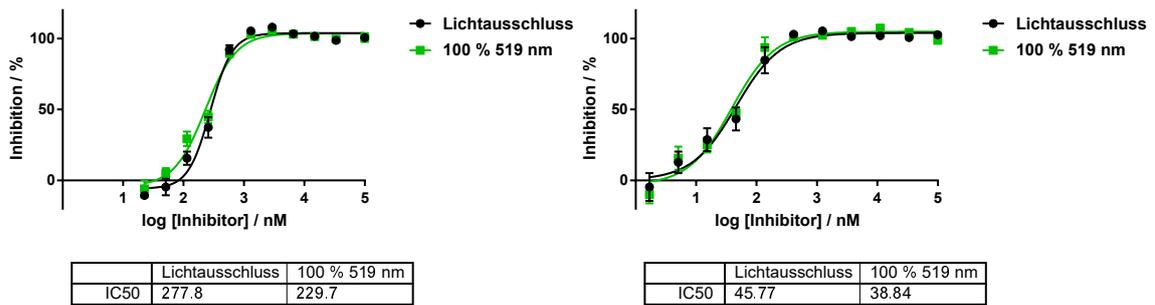
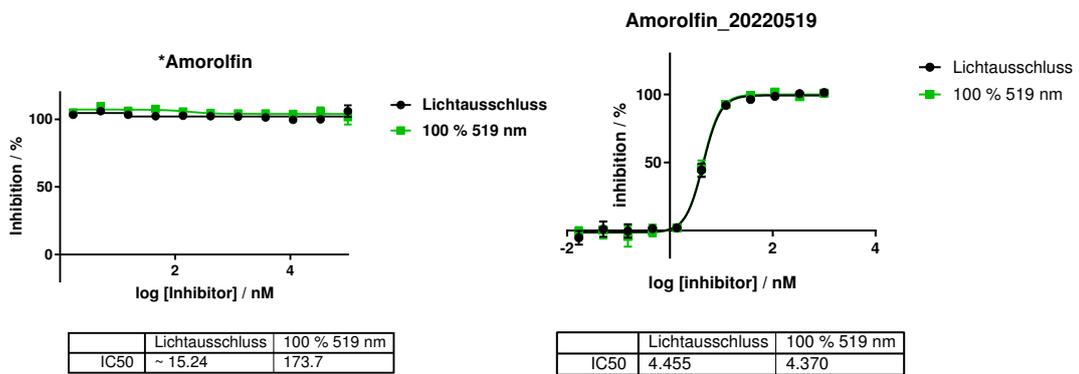


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	135.2	121.7

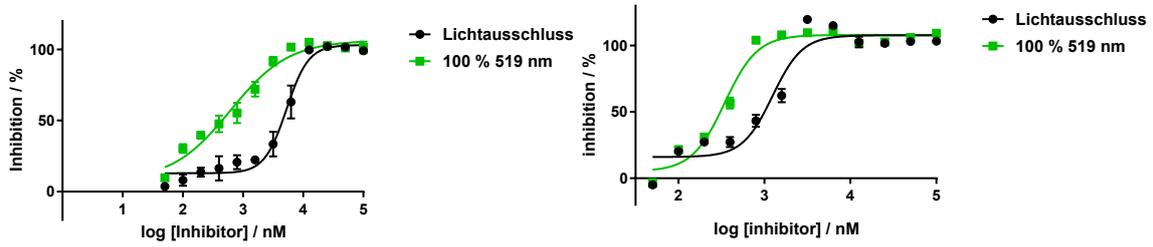


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	102.8	87.73

Amorolfin-HCl (100)

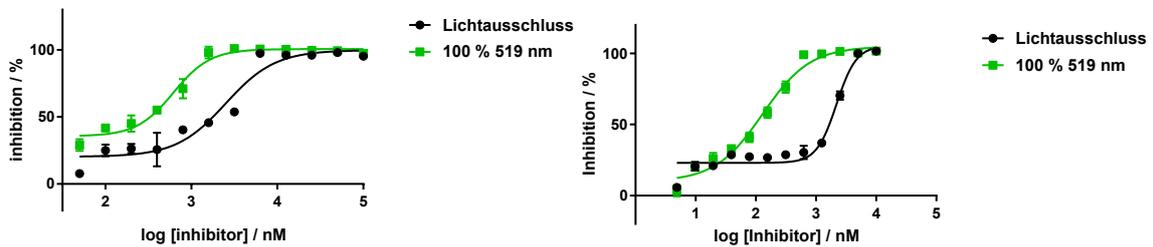


Naphthazarin (12)



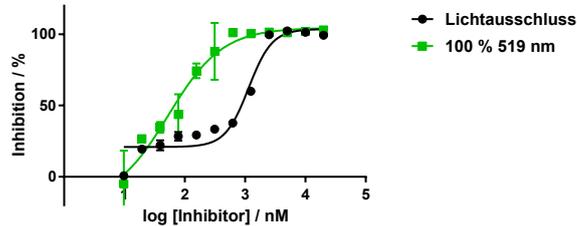
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	5296	619.4

	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	1239	343.8



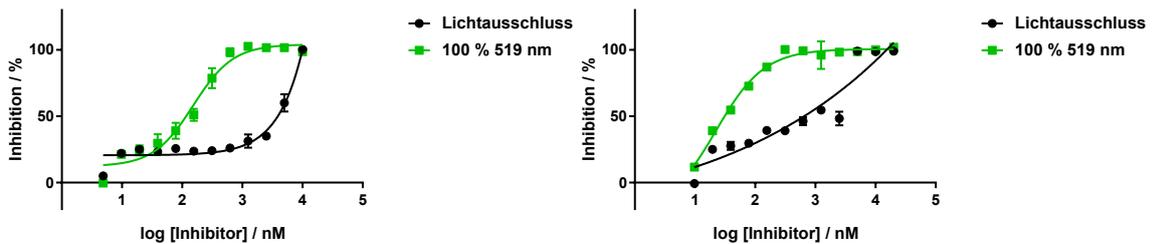
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	2509	617.7

	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	2191	129.7



	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	1145	53.5

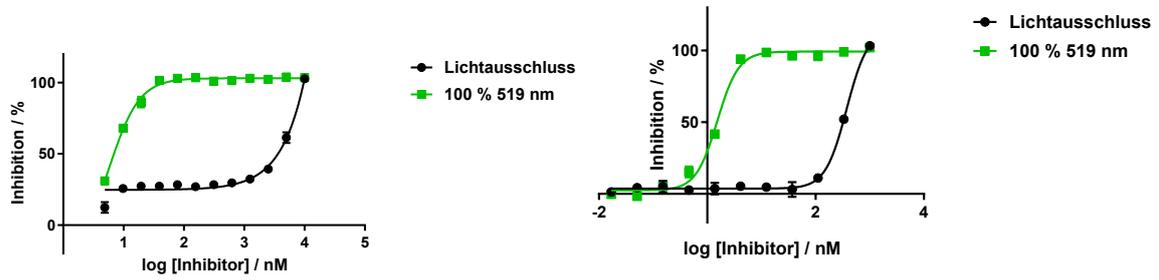
BJ-18 (82)



	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 4659265	153.1

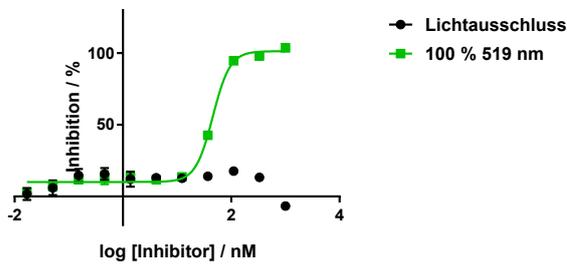
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 1.444e+015	22.21

BJ-34 (85)

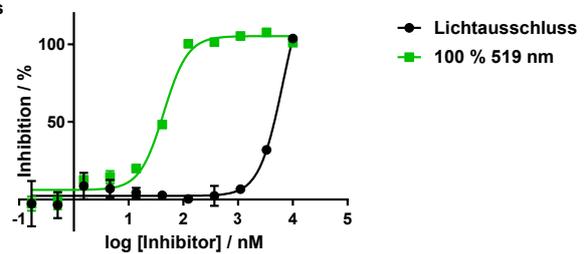


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 3222077	5.739

	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	374.9	1.531

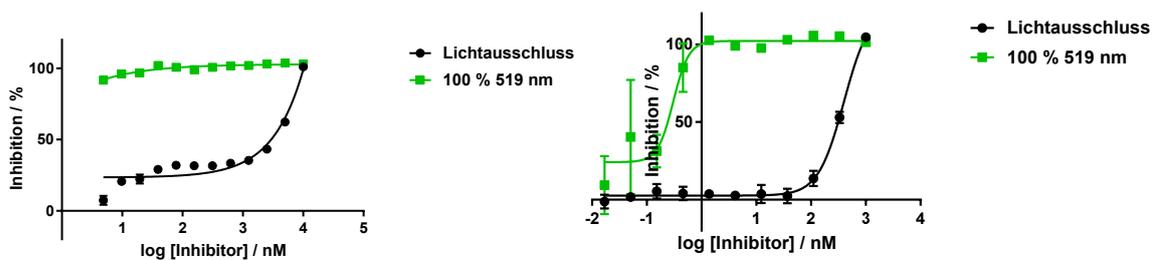


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50		45.72



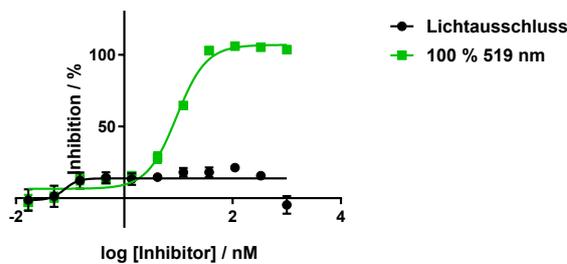
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	6684	43.76

BJ-35 (86)

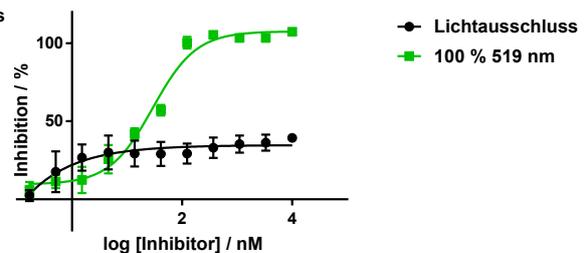


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 121957853	~ 4.215e-005

	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	400	0.3043

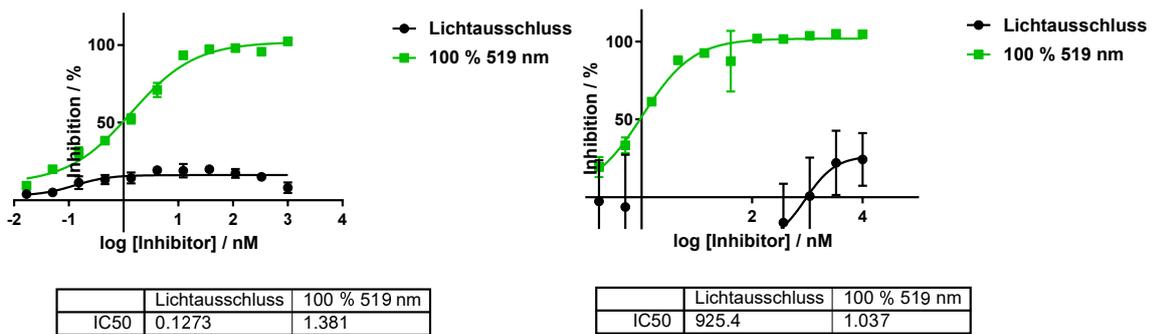
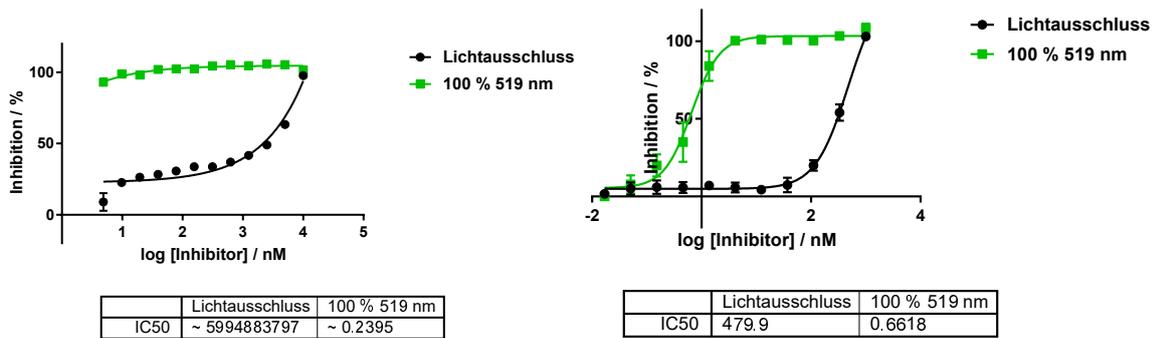


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	0.07929	9.248

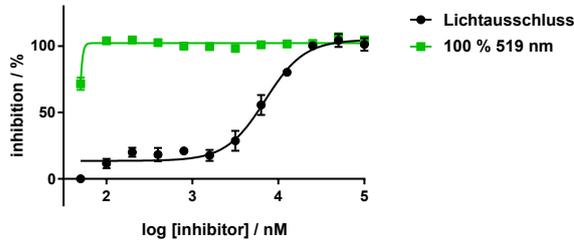


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 1.088e-006	29.39

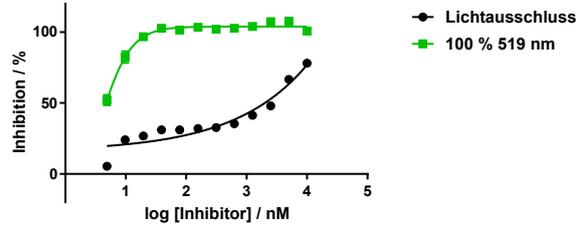
BJ-36 (89)



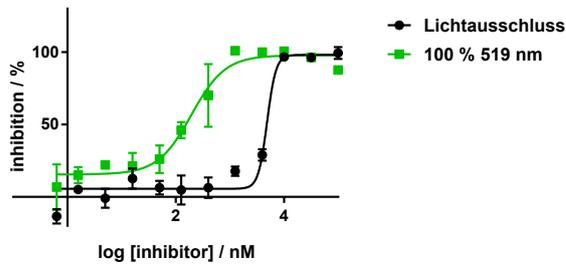
Deoxyshikonin (20)



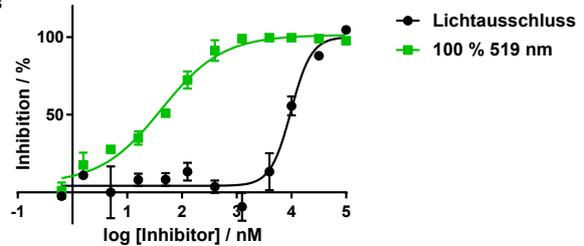
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	7020	~ 45.77



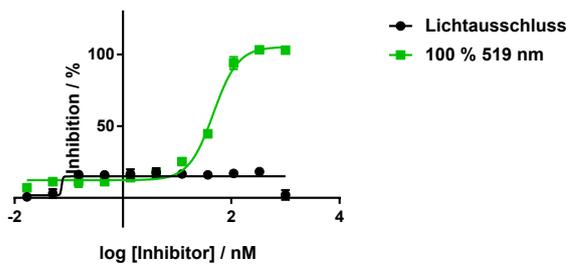
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 9491793023253	3.75



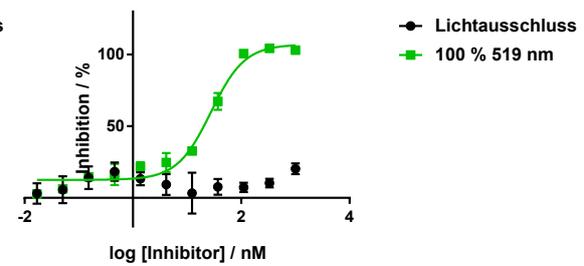
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	4872	195



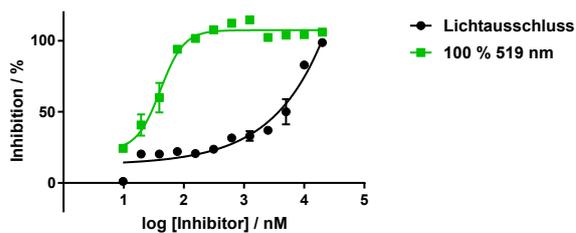
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	9793	42.2



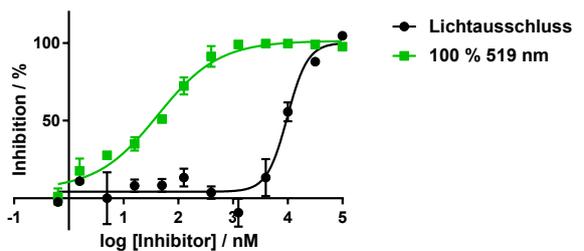
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 0.0739	46.85



	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50		27.59

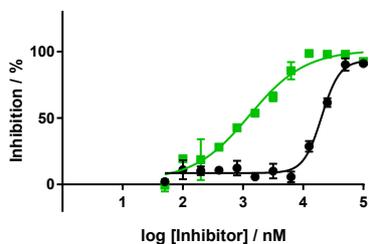


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~ 2737857022	40.68

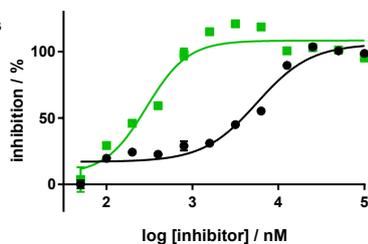


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	9793	42.2

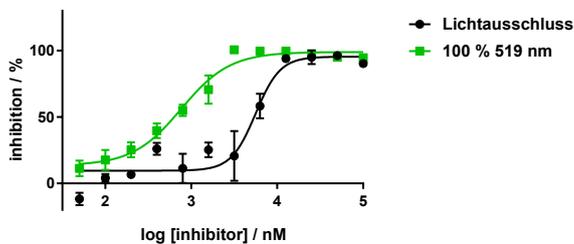
Shikonin (19)



	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	20292	1287

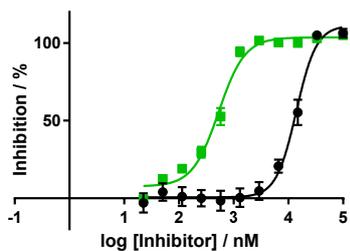


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	5637	291.3

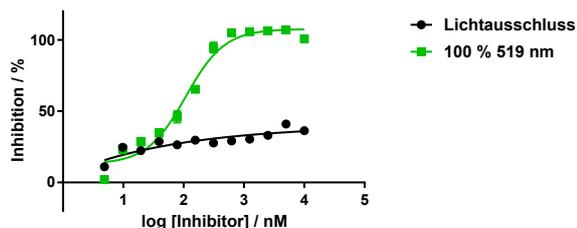


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	5602	766.1

BJ-27 (84)

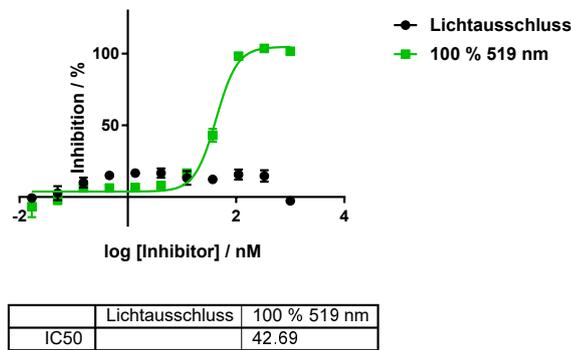
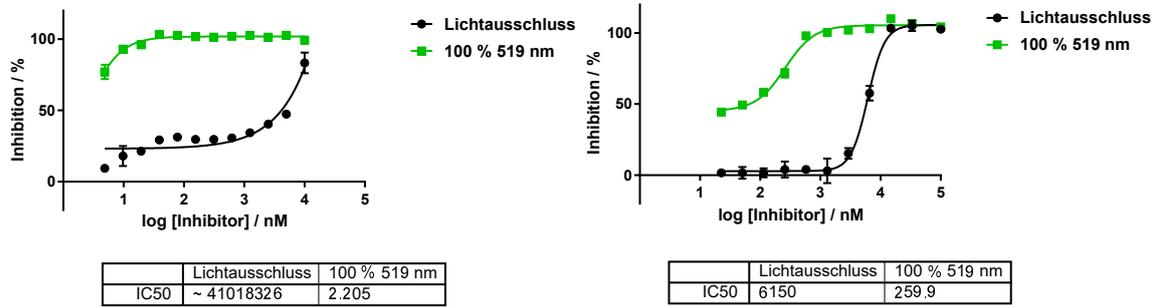


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	13942	532.8

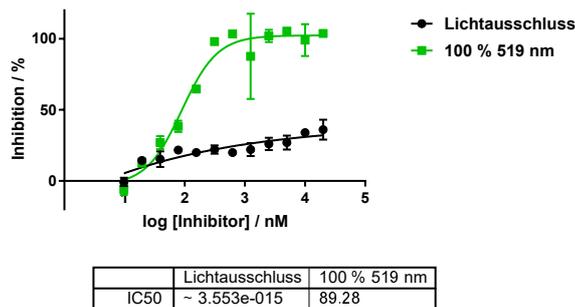
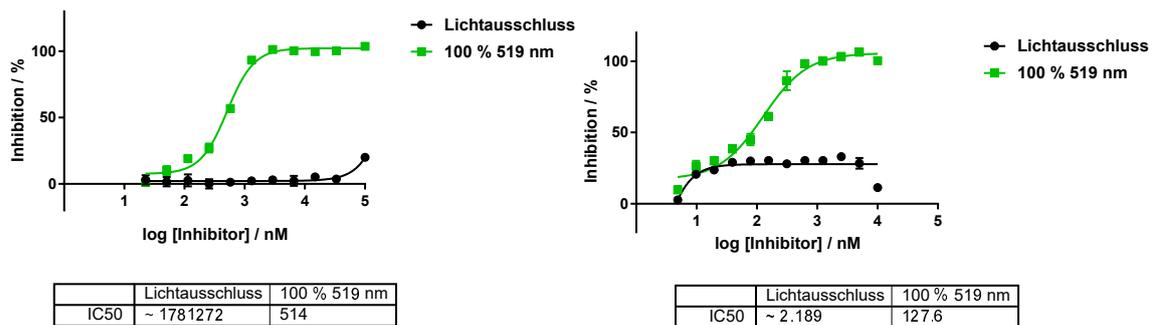


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	~2.647e-013	108.6

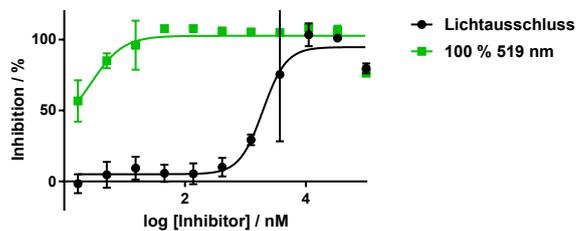
BJ-28 (88)



BJ-19 (80)

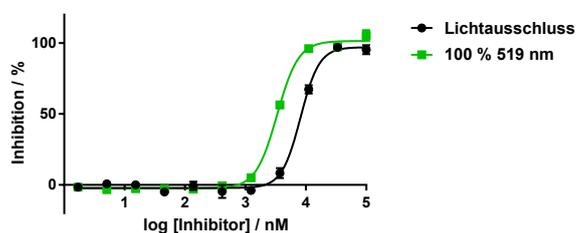


BJ-39 (91)



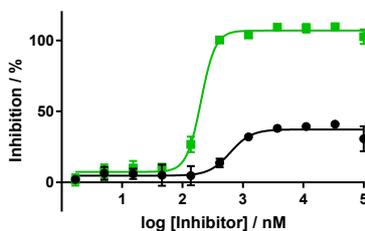
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	1940	2.857

BJ-SK-Amin (92)

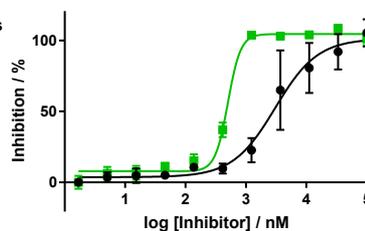


	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	8142	3338

BJ-49 (96)



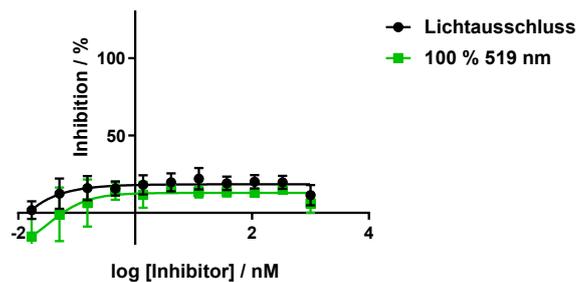
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	616.2	202.1



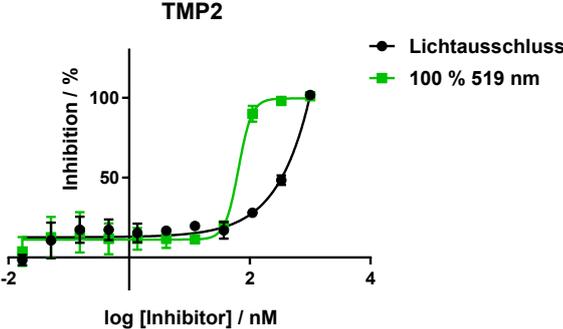
	Lichtausschluss	100 % 519 nm
IC50	3050	502.4

BJ-8 (25)

TMP1



BJ-11 (44)



Danksagung

Ich möchte mich bei einigen Personen bedanken, die mir in den Jahren beim Erreichen dieses Ziels geholfen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Peifer bedanken, der mir die Möglichkeit bot, dieses spannende und innovative Thema zu bearbeiten. Neben tollen wissenschaftlichen Gesprächen, konnte man immer einen Schnack am Rande führen und der Spaß kam nie zu kurz. Danke für den Input und die schöne Zusammenarbeit. Ich bin gespannt, was die Zukunft noch mit sich bringt!

Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Deniz Tasdemir bedanken, dass sie das Zweitgutachten dieser Arbeit übernommen hat und dass sie ihre Einrichtungen sowie Geräte für die biologischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt hat. Thank you very much for the opportunity!

In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Arlette Wenzel-Storjohann aus dem AK Tasdemir bedanken, die für mich die Arbeit in der Zellkultur übernommen hat und bei noch so komischen Versuchsdurchführungen nicht aufgab.

Ein riesiges Dankeschön geht natürlich auch an den gesamten Arbeitskreis! Die Zusammensetzung veränderte sich zwar im Laufe der Zeit, doch das tolle Arbeitsklima blieb immer gleich. Vielen Dank - Lydia Witt, Linda Heintze, Dorian Schmidt, Alex Döbber, Theo Rodat, Miriam Schehr, Boris Pinchuk, Stefan Kirschner, Julia Ewert, Joana Baier, Clemens Woitaske und Melanie Krebs. Ihr habt mich sehr herzlich in den AK aufgenommen und es macht Spaß, mit euch zu arbeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen F3-Praktikanten Sascha Koller und Joana Baier, die mich in der Synthese der Naphthazarine unterstützt haben. Der historisch-angehauchten Chemie werdet ihr so schnell nicht wieder begegnen!

Ein weiterer Dank geht an Dr. Anja Steffen-Heins, die mir freundlicherweise die Arbeitstechniken am ESR-Gerät zeigte.

Desweiteren möchte ich mich beim Team der Zentralen Mikroskopie dafür bedanken, dass ich meine Rinderhufmembranen dort anfertigen durfte.

Ich möchte mich auch bei Martin Schütt bedanken, der immer ein offenes Ohr für Laborprobleme und gute Musik hatte und auch hier und da ein Extra-NMR am Rande maß. Ich werde die herrlichen Gespräche zwischendurch und die lustige Zeit im Praktikum des 2. Semesters vermissen! Apropos 2. Semester.. Vielen Dank Tamara, Andre, Dorian, Björn, Britta, Philipp, Stefan, Sven und Basti für die witzigen und teilweise auch nervenaufreibenden Momente (Stichwort: Frozen-Soundtrack) im

Labor.

Ein Dankeschön geht auch an Kalle Bock, der immer für technische Angelegenheiten und Angelgespräche zur Verfügung stand, sowie Sven Wichmann, der mir in HPLC-Angelegenheiten oft weiterhalf. Auch möchte ich mich bei Dirk Böhme bedanken, der mir freundlicherweise sein Werkzeug für die Anfertigung der Membranen bereitstellte.

Meinen Freunden, die mich während dieser Zeit tatkräftig unterstützt haben, möchte ich natürlich auch danken.

Mein Größter Dank gilt meiner Familie! Meinen Eltern Katrin und Frank und meinem Bruder Nils möchte ich besonders danken, denn ohne ihre Unterstützung wäre ich nicht so weit gekommen und das alles wäre nicht möglich gewesen! Auch meiner Schwiegerfamilie Karen, Michael und Kathleen möchte ich für die tolle Unterstützung und das Mitfiebern danken!

Bekanntlich kommt die Beste zum Schluss! Ohne die Unterstützung meiner Frau Annika hätte ich diese Arbeit nicht geschafft! Vielen Dank für deine Unterstützung, deine lieben Worte und diese wundervolle Zeit mit dir. Ich freue mich auf alles was noch kommt!

Literatur

- [1] V. Sherrow, *For appearance' sake [eBook - ABC-Clio via NC Live]: The historical encyclopedia of good looks, beauty, and grooming*, Greenwood, Phoenix, Ariz., **2001**.
- [2] L. Roome, *Mehndi: The timeless art of henna painting*, St. Martin's Press, New York, N.Y., **2014**.
- [3] Revlon, **2022**.
- [4] <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/nail-polish-market>, Nail Polish Market Size & Share Report, 2022-2030, **03.06.2022**.
- [5] A. A. Jacobsen, A. Tosti in *Onychomycosis*, (Hrsg.: A. Tosti, T. C. Vlahovic, R. Arenas), Springer International Publishing, Cham, **2017**, S. 11–19.
- [6] A. Sparavigna, M. Setaro, L. Frisenda, *Journal of Plastic Dermatology* **2008**, 4.
- [7] A. K. Gupta, C. W. LYNDE, H. C. JAIN, R. G. SIBBALD, B. E. ELEWSKI, C. R. DANIEL, G. N. WATTEEL, R. C. Summerbell, *The British journal of dermatology* **1997**, 136, 786–789.
- [8] A. Chacon, K. Franca, A. Fernandez, K. Nouri, *International journal of dermatology* **2013**, 52, 1300–1307.
- [9] S. Murdan, *The Drug Delivery Companies Report* **2004**.
- [10] H. P. Baden, *The Journal of investigative dermatology* **1970**, 55, 115–122.
- [11] C. Jimenez-Gonzalez, J. A. Mata-Marin, C. I. Arroyo-Anduiza, I. d. J. Ascencio-Montiel, J. L. Fuentes-Allen, J. Gaytan-Martinez, *European journal of dermatology : EJD* **2013**, 23, 378–381.
- [12] R. Assadamongkol, R. Lertwattanak, T. Wannachalee, S. Bunyaratavej, C. Leeyaphan, L. Matthapan, *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* **2016**, 99, 659–664.
- [13] A. K. Gupta, N. Stec, R. C. Summerbell, N. H. Shear, V. Piguet, A. Tosti, B. M. Piraccini, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* **2020**, 34, 1972–1990.
- [14] B. M. Piraccini, A. Alessandrini, *Journal of fungi (Basel Switzerland)* **2015**, 1, 30–43.
- [15] M. Augustin, M. A. Radtke, K. Herberger, T. Kornek, H. Heigel, I. Schaefer, *Dermatology (Basel Switzerland)* **2013**, 227, 10–13.

- [16] M. A. Ghannoum, R. A. Hajjeh, R. Scher, N. Konnikov, A. K. Gupta, R. Summerbell, S. Sullivan, R. Daniel, P. Krusinski, P. Fleckman, P. Rich, R. Odom, R. Aly, D. Pariser, M. Zaiac, G. Rebell, J. Leshner, B. Gerlach, G. F. Ponce-De-Leon, A. Ghannoum, J. Warner, N. Isham, B. Elewski, *Journal of the American Academy of Dermatology* **2000**, *43*, 641–648.
- [17] Jayatilake, J. A. M. S., W. M. Tilakaratne, G. J. Panagoda, *Mycopathologia et mycologia applicata* **2009**, *168*, 165–173.
- [18] A. K. Gupta, C. Drummond-Main, E. A. Cooper, W. Brintnell, B. M. Piraccini, A. Tosti, *Journal of the American Academy of Dermatology* **2012**, *66*, 494–502.
- [19] N. Salakshna, S. Bunyaratavej, L. Matthapan, K. Lertrujiwanit, C. Leeyaphan, *Journal of the American Academy of Dermatology* **2018**, *79*, 1145–1146.
- [20] M. R. Vander Straten, M. M. Balkis, M. A. Ghannoum, *Dermatologic Therapy* **2002**, *15*, 89–98.
- [21] D. Roseeuw, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **1999**, *12*, S6–S9.
- [22] T. Angelo, L. N. Borgheti-Cardoso, G. M. Gelfuso, S. F. Taveira, T. Gratieri, *Medical Mycology* **2017**, *55*, 461–475.
- [23] J. H. Ólafsson, *Antibiotic and Antifungal Therapies in Dermatology*, Springer International Publishing AG, Cham, **2016**.
- [24] B. E. Elewski, P. Rich, A. Tosti, D. M. Pariser, R. Scher, R. C. Daniel, A. K. Gupta, *Journal of drugs in dermatology : JDD* **2013**, *12*, s96–103.
- [25] A. Shemer, *Dermatologic therapy* **2012**, *25*, 582–593.
- [26] B. E. ELEWSKI, *International journal of dermatology* **1997**, *36*, 754–756.
- [27] A. K. Gupta, R. R. Mays, *Skin appendage disorders* **2018**, *4*, 208–216.
- [28] B. Sigurgeirsson, J. H. Olafsson, J. B. Steinsson, C. Paul, S. Billstein, E. G. V. Evans, *Archives of dermatology* **2002**, *138*, 353–357.
- [29] A. Tosti, B. M. Piraccini, C. Stinchi, M. D. Colombo, *Dermatology (Basel Switzerland)* **1998**, *197*, 162–166.
- [30] E. Epstein, *Archives of dermatology* **1998**, *134*, 1551–1554.
- [31] S. Murdan, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2008**, *5*, 1267–1282.
- [32] G. Achten, J. André, M. Laporte, *Seminars in dermatology* **1991**, *10*, 54–64.
- [33] H. B. Gunt, G. B. Kasting, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2007**, *32*, 254–260.
- [34] D. de Berker, B. Mawhinny, L. Sviland, *The British journal of dermatology* **1996**, *134*, 1083–1086.
- [35] S. Murdan, *International journal of pharmaceuticals* **2002**, *236*, 1–26.
- [36] K. A. Walters, G. L. Flynn, *International journal of cosmetic science* **1983**, *5*, 231–246.
- [37] R. W. Goldblum, S. DERBY, A. B. LERNER, *The Journal of investigative dermatology* **1953**, *20*, 13–18.

- [38] O. D. Vellar, *The American journal of clinical nutrition* **1970**, *23*, 1272–1274.
- [39] L. Sirota, R. Straussberg, P. Fishman, F. Dulitzky, M. Djaldetti, *Pediatric dermatology* **1988**, *5*, 184–186.
- [40] Y. Kobayashi, M. Miyamoto, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1999**, *51*, 271–278.
- [41] G. V. GUPCHUP, J. L. ZATZ, *Journal of cosmetic science* **1999**, *50*, 363–385.
- [42] H. P. Baden, J. Kubilus, *The Journal of investigative dermatology* **1983**, *81*, 220–224.
- [43] R. C. Marshall, *The Journal of investigative dermatology* **1983**, *80*, 519–524.
- [44] S. G. Parker, B. L. Diffey, *The British journal of dermatology* **1983**, *108*, 11–16.
- [45] A. R. Young, *Physics in medicine and biology* **1997**, *42*, 789–802.
- [46] M. Helmdach, A. Thielitz, E. M. Röpke, H. Gollnick, *Skin pharmacology and applied skin physiology* **2000**, *13*, 111–119.
- [47] M. Gniadecka, O. Faurskov Nielsen, D. H. Christensen, H. C. Wulf, *The Journal of investigative dermatology* **1998**, *110*, 393–398.
- [48] R. H. H. Neubert, C. Gensbügel, A. Jäckel, S. Wartewig, *Die Pharmazie* **2006**, *61*, 604–607.
- [49] D. MERTIN, B. C. LIPPOLD, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1997**, *49*, 30–34.
- [50] A. Elezovic, A. Elezović, J. Hadziabdic, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* **2020**, *77*, 43–56.
- [51] PermeGear, **2022**.
- [52] D. MERTIN, B. C. LIPPOLD, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1997**, *49*, 866–872.
- [53] S. M. Baswan, S. K. Li, G. B. Kasting, *Pharmaceutical development and technology* **2016**, *21*, 255–260.
- [54] R. H. Khengar, S. A. Jones, R. B. Turner, B. Forbes, M. B. Brown, *Pharmaceutical research* **2007**, *24*, 2207–2212.
- [55] J. H. Kim, C. H. Lee, H. K. Choi, *Pharmaceutical research* **2001**, *18*, 1468–1471.
- [56] D. MERTIN, B. C. LIPPOLD, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1997**, *49*, 241–245.
- [57] S. Naumann, J.-P. Meyer, A. Kiesow, Y. Mrestani, J. Wohlrab, R. H. H. Neubert, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2014**, *180*, 60–70.
- [58] A. Täuber, C. C. Müller-Goymann, *International journal of pharmaceutics* **2015**, *489*, 73–82.
- [59] D. Monti, L. Saccomani, P. Chetoni, S. Burgalassi, M. F. Saettone, F. Mailland, *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2005**, *31*, 11–17.
- [60] D. Miron, R. Cornelio, J. Troleis, J. Mariath, A. R. Zimmer, P. Mayorga, E. E. S. Schapoval, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2014**, *51*, 20–25.
- [61] D. J. Sheehan, C. A. Hitchcock, C. M. Sibley, *Clinical microbiology reviews* **1999**, *12*, 40–79.

- [62] M. Ameen, *Clinics in Dermatology* **2010**, *28*, 197–201.
- [63] A. Polak, *Medical Mycology* **1983**, *21*, 205–213.
- [64] M. Iorizzo, B. M. Piraccini, A. Tosti, *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* **2010**, *8*, 875–879.
- [65] S. J. Brown, *The Annals of pharmacotherapy* **2009**, *43*, 1684–1691.
- [66] A. Y. Zhang, W. L. Camp, B. E. Elewski, *Dermatologic Clinics* **2007**, *25*, 165–83, vi.
- [67] C. Grover, A. Khurana, *Mycoses* **2012**, *55*, 541–551.
- [68] K. Foley, A. K. Gupta, S. Versteeg, R. Mays, E. Villanueva, D. John, *The Cochrane database of systematic reviews* **2020**, *1*, CD012093.
- [69] A. C. Williams, B. W. Barry, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 128–137.
- [70] P. Chouhan, T. R. Saini, *Journal of drug delivery* **2014**, *2014*, 950358.
- [71] N. H. Leon, *Textile Progress* **1975**, *7*, 1–70.
- [72] E. Alberdi, C. Gómez, *Photodermatology photoimmunology & photomedicine* **2019**, *35*, 69–77.
- [73] G. S. Shadel, T. L. Horvath, *Cell* **2015**, *163*, 560–569.
- [74] M. Herb, M. Schramm, *Antioxidants (Basel Switzerland)* **2021**, *10*, DOI [10.3390/antiox10020313](https://doi.org/10.3390/antiox10020313).
- [75] I. O. L. Bacellar, T. M. Tsubone, C. Pavani, M. S. Baptista, *International journal of molecular sciences* **2015**, *16*, 20523–20559.
- [76] A. Jablonski, *Nature* **1933**, *131*, 839–840.
- [77] S. P. Stratton, D. C. Liebler, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12911–12920.
- [78] T. J. Dougherty, *Seminars in surgical oncology* **1989**, *5*, 6–16.
- [79] C. J. Gomer in *Future Directions and Applications in Photodynamic Therapy*, SPIE, **2017**, S. 1030601.
- [80] S. Mallidi, S. Anbil, A.-L. Bulin, G. Obaid, M. Ichikawa, T. Hasan, *Theranostics* **2016**, *6*, 2458–2487.
- [81] B. Meffert, H. Meffert, *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering* **2000**, *45*, 98–104.
- [82] G. Zonios, A. Dimou, I. Bassukas, D. Galaris, A. Tsolakidis, E. Kaxiras, *Journal of biomedical optics* **2008**, *13*, 014017.
- [83] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, S. Bienz, L. Bigler, T. Fox, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 8., überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York, **2012**.
- [84] Q. Xiao, J. Wu, X. Pang, Y. Jiang, P. Wang, A. W. Leung, L. Gao, S. Jiang, C. Xu, *Current medicinal chemistry* **2018**, *25*, 839–860.
- [85] J. Zhang, C. Jiang, J. P. Figueiró Longo, R. B. Azevedo, H. Zhang, L. A. Muehlmann, *Acta pharmaceutica Sinica. B* **2018**, *8*, 137–146.

- [86] T. Smijs, Z. Dame, E. de Haas, J.-B. Aans, S. Pavel, H. Sterenborg, *Photochemistry and Photobiology* **2014**, *90*, 189–200.
- [87] L. W. Figueiredo Souza, S. V. T. Souza, A. C. C. Botelho, *Dermatologic therapy* **2014**, *27*, 43–47.
- [88] Y. Gilaberte, C. Aspiroz, M. P. Martes, V. Alcalde, A. Espinel-Ingroff, A. Rezusta, *Journal of the American Academy of Dermatology* **2011**, *65*, 669–671.
- [89] D. Watanabe, C. Kawamura, Y. Masuda, Y. Akita, Y. Tamada, Y. Matsumoto, *Archives of dermatology* **2008**, *144*, 19–21.
- [90] A. P. Da Silva, C. Kurachi, V. S. Bagnato, N. M. Inada, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2013**, *10*, 328–330.
- [91] C. Diederich, M. Leypold, R. Breinbauer, W. Blankenfeldt, *Nachrichten aus der Chemie* **2014**, *62*, 975–980.
- [92] N. R. Glasser, S. E. Kern, D. K. Newman, *Molecular microbiology* **2014**, *92*, 399–412.
- [93] K. Imato, K. Ohira, M. Yamaguchi, T. Enoki, Y. Ooyama, *Materials Chemistry Frontiers* **2020**, *4*, 589–596.
- [94] K. Wolff, *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* **1979**, *104*, 1543–1546.
- [95] A. E. Alegria, A. Ferrer, G. Santiago, E. Sepúlveda, W. Flores, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1999**, *127*, 57–65.
- [96] J. R. Widhalm, D. Rhodes, *Horticulture research* **2016**, *3*, 16046.
- [97] B. Hazra, M. Das Sarma, U. Sanyal, *Journal of Chromatography B* **2004**, *812*, 259–275.
- [98] D. Iarussi, P. Indolfi, F. Casale, P. Coppolino, M. A. Tedesco, M. T. Di Tullio, *Current medicinal chemistry* **2001**, *8*, 1649–1660.
- [99] H. Kappus, *Biochemical Pharmacology* **1986**, *35*, 1–6.
- [100] K. T. Potts, E. B. Walsh, *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 1199–1202.
- [101] B. M. Shashikumar, A. Savitha, R. Reddy, Raghunatha S., *TATTOO: The Invaluable Compendium for Dermatologists*, 1/e, JP Medical Ltd, Jaypee Brothers Medical Publisher (P) Ltd., **2018**.
- [102] V. Gold, *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Research Triangle Park, NC, **2019**.
- [103] P. Babula, V. Adam, L. Havel, R. Kizek, *Current Pharmaceutical Analysis* **2009**, *5*, 47–68.
- [104] *Plant secondary metabolism*, (Hrsg.: D. S. Seigler), Springer US, Boston, MA, **1999**.
- [105] U. Mabona, A. Viljoen, E. Shikanga, A. Marston, S. van Vuuren, *Journal of ethnopharmacology* **2013**, *148*, 45–55.
- [106] S. R. de Paiva, M. R. Figueiredo, T. V. Aragão, M. A. C. Kaplan, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **2003**, *98*, 959–961.
- [107] S. V. Nair, G. Baranwal, M. Chatterjee, A. Sachu, A. K. Vasudevan, C. Bose, A. Banerji, R. Biswas, *International journal of medical microbiology : IJMM* **2016**, *306*, 237–248.

- [108] H. Hussain, K. Krohn, V. U. Ahmad, G. A. Miana, I. R. Green, *Arkivoc* **2008**, 2007, 145–171.
- [109] H. Miao, L. Zhao, C. Li, Q. Shang, H. Lu, Z. Fu, L. Wang, Y. Jiang, Y. Cao, *Biological & pharmaceutical bulletin* **2012**, 35, 1956–1963.
- [110] D. K. Palit, H. Pal, T. Mukherjee, J. P. Mittal, *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions* **1990**, 86, 3861.
- [111] T. Y. Toribara, A. L. Underwood, *Analytical Chemistry* **1949**, 21, 1352–1356.
- [112] K. A. Idriss, M. M. S. Saleh, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **1993**, 124, 1089–1098.
- [113] C. J. P. Spruit, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1949**, 68, 309–324.
- [114] M. C. Rath, H. Pal, T. Mukherjee, *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions* **1996**, 92, 1891.
- [115] I. Singh, R. T. Ogata, R. E. Moore, C. Chang, P. J. Scheuer, *Tetrahedron* **1968**, 24, 6053–6073.
- [116] B. Siewert, H. Stuppner, *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2019**, 60, 152985.
- [117] S. R. Flom, P. F. Barbara, *The Journal of Physical Chemistry* **1985**, 89, 4489–4494.
- [118] D. Jacquemin, C. Peltier, I. Ciofini, *Chemical Physics Letters* **2010**, 493, 67–71.
- [119] S. Bratan, F. Strohbusch, *Journal of Molecular Structure* **1980**, 61, 409–414.
- [120] V. P. Glazunov, A. Y. Tchizhova, M. I. Shuvalova, V. P. Anufriev, *Russian Chemical Bulletin* **2001**, 50, 88–94.
- [121] G. Fabriciova, J. Garcia-Ramos, P. Miskovsky, S. Sanchez-Cortes, *Vibrational Spectroscopy* **2002**, 30, 203–212.
- [122] A. Jezierska, K. Błaziak, S. Klahm, A. Lüchow, J. J. Panek, *International journal of molecular sciences* **2021**, 22, DOI 10.3390/ijms22158033.
- [123] W.-I. Shiau, E. N. Duesler, I. C. Paul, D. Y. Curtin, W. G. Blann, C. A. Fyfe, *Journal of the American Chemical Society* **1980**, 102, 4546–4548.
- [124] D. Y. Curtin, I. C. Paul, *Chemical Reviews* **1981**, 81, 525–541.
- [125] C. A. Tsipis, M. P. Sigalas, V. P. Papageorgiou, M. N. Bakola-Christianopoulou, *Canadian Journal of Chemistry* **1983**, 61, 1500–1504.
- [126] J. R. de La Vega, J. H. Busch, J. H. Schauble, K. L. Kunze, B. E. Haggert, *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 3295–3299.
- [127] P. D. Cradwick, D. Hall, *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **1971**, 27, 1990–1997.
- [128] F. H. Herbstein, M. Kapon, G. M. Reisner, M. S. Lehman, R. B. Kress, R. B. Wilson, W.-i. Shiau, Duesler, E. N., Paul, I. C., D. Y. Curtin, *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences* **1985**, 399, 295–319.
- [129] S. O. Paul, C. Schutte, P. J. Hendra, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1990**, 46, 323–329.

- [130] D. Hadži, N. Sheppard, *Trans. Faraday Soc.* **1954**, *50*, 911–918.
- [131] Y. H. Mariam, R. N. Musin, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2001**, *549*, 123–136.
- [132] M. Savko, S. Kaščáková, P. Mojzeš, D. Jancura, P. Miškovský, J. Uličný, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2007**, *803*, 79–87.
- [133] T. H. Smith, H. Y. Wu, *The Journal of Organic Chemistry* **1982**, *47*, 1974–1976.
- [134] H. Laatsch, *Liebigs Annalen der Chemie* **1990**, *1990*, 1151–1152.
- [135] C. J. Burns, M. Gill, S. Saubern, *Australian Journal of Chemistry* **1991**, *44*, 1427.
- [136] C. J. Burns, M. Gill, *Australian Journal of Chemistry* **1991**, *44*, 1447.
- [137] A. Y. Yakubovskaya, N. D. Pokhilo, N. P. Mishchenko, V. F. Anufriev, *Russian Chemical Bulletin* **2007**, *56*, 819–822.
- [138] H. A. Anderson, R. H. Thomson, *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1966**, 426.
- [139] H. A. Anderson, J. W. Mathieson, R. H. Thomson, *Comparative Biochemistry and Physiology* **1969**, *28*, 333–345.
- [140] R. S. TWIGG, *Nature* **1945**, *155*, 401–402.
- [141] T. A. Unger, *Pesticide Synthesis Handbook*, William Andrew, Norwich, **1996**.
- [142] A. M. Clark, T. M. Jurgens, C. D. Hufford, *Phytotherapy Research* **1990**, *4*, 11–14.
- [143] M. Z. Roussin, *Compt. rend.* **1861**, 1033.
- [144] W. Stockar, Diss., ETH Zurich, **1942**.
- [145] H. E. Fierz-David, W. Stockar, *Helvetica Chimica Acta* **1943**, *26*, 92–98.
- [146] M. Badolato, G. Carullo, M. C. Caroleo, E. Cione, F. Aiello, F. Manetti, *ACS medicinal chemistry letters* **2019**, *10*, 402–406.
- [147] E. A. Couladouros, A. T. Strongilos, V. P. Papageorgiou, Z. F. Plyta, *Chemistry - A European Journal* **2002**, *8*, 1795.
- [148] G. A. Guerrero-Vásquez, F. A. D. Galarza, J. M. G. Molinillo, C. K. Z. Andrade, F. A. Macías, *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, *2016*, 1599–1605.
- [149] J. S. Driscoll, G. F. Hazard, H. B. Wood, A. Goldin, *Cancer chemotherapy reports. Part 2* **1974**, *4*, 1–362.
- [150] R. E. Moore, P. J. Scheuer, *The Journal of Organic Chemistry* **1966**, *31*, 3272–3283.
- [151] K. C. Nicolaou, D. Hepworth, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 839–841.
- [152] F. Fariña, R. Martínez-Utrilla, M. C. Paredes, V. Stefani, *Synthesis* **1985**, *1985*, 781–784.
- [153] K. Zahn, P. Ochwat, *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **1928**, *462*, 72–97.
- [154] R. Huot, P. Brassard, *Canadian Journal of Chemistry* **1974**, *52*, 838–842.
- [155] M. Neumeyer, R. Brückner, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2017**, *56*, 3383–3388.

- [156] J. Zhang, Y. Liu, D. Shi, G. Hu, B. Zhang, X. Li, R. Liu, X. Han, X. Yao, J. Fang, *European journal of medicinal chemistry* **2017**, *140*, 435–447.
- [157] E. M. Levin, J. F. Kinney, R. D. Wells, J. T. Benedict, *Journal of research of the National Bureau of Standards. Section A Physics and chemistry* **1974**, *78A*, 505–507.
- [158] V. L. Novikov, N. N. Balaneva, O. P. Shestak, V. P. Anufriev, V. P. Glazunov, *Russian Chemical Bulletin* **2016**, *65*, 993–1003.
- [159] Sicherheitsdatenblatt Aluminiumchlorid, Sigma Aldrich, **17.03.2022**.
- [160] M. Kawasaki, F. Matsuda, S. Terashima, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5713–5725.
- [161] F. Dallacker, J. Jacobs, W. Coerver, *Zeitschrift für Naturforschung B* **1983**, *38*, 1000–1007.
- [162] S. Arima, Y. Yamada Konda, K. Takeda, H. Takayanagi, Y. Harigaya, *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2001**, *49*, 1340–1342.
- [163] A.-H. Zhao, D.-F. Xu, W. Zhuo, Z. Rao, S.-S. Li, *Journal of Chemical Research* **2007**, *2007*, 647–648.
- [164] J.-C. Kim, J.-C. Jung, O.-S. Park, *Synthetic Communications* **2000**, *30*, 1023–1033.
- [165] V. Sharma, G. T. Kelly, C. M. H. Watanabe, *Organic letters* **2008**, *10*, 4815–4818.
- [166] L. Horner, H. Hoffmann, H. G. Wippel, *Chemische Berichte* **1958**, *91*, 61–63.
- [167] W. S. Wadsworth, W. D. Emmons, *Journal of the American Chemical Society* **1961**, *83*, 1733–1738.
- [168] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, 3. Auflage, Springer Spektrum, Heidelberg und Berlin, **2004**.
- [169] S. T. Aiwale, P. Sardi, S. Dallavalle, *Synthetic Communications* **2013**, *43*, 1455–1459.
- [170] Eyjólfsson, *Acta Chemica Scandinavica* **1970**, 3075–3078.
- [171] M. P. Cooke, *Tetrahedron Letters* **1981**, *22*, 381–384.
- [172] J. Maury, L. Feray, M. P. Bertrand, *Organic letters* **2011**, *13*, 1884–1887.
- [173] G. A. Elöve, J. H. Schauble, *Magnetic Resonance in Chemistry* **1987**, *25*, 194–200.
- [174] K. Takagi, *Dyes and Pigments* **1984**, *5*, 241–251.
- [175] A. Arnone, L. Merlini, G. Nasini, O. V. de Pava, *Synthetic Communications* **2007**, *37*, 2569–2577.
- [176] *Advances in Molten Salt Chemistry: Volume 1*, (Hrsg.: J. Braunstein, G. Mamantov, G. P. Smith), Springer US, Boston, MA, **1971**.
- [177] H. F. Johnstone, H. C. Weingartner, W. E. Winsche, *Journal of the American Chemical Society* **1942**, *64*, 241–244.
- [178] C. O. Kangani, B. W. Day, *Organic letters* **2008**, *10*, 2645–2648.
- [179] I. Vejnovic, C. Huonder, G. Betz, *International journal of pharmaceuticals* **2010**, *397*, 67–76.
- [180] M. M. A. Elsayed, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2015**, *199*, 132–144.

- [181] S.-F. Ng, J. J. Rouse, F. D. Sanderson, V. Meidan, G. M. Eccleston, *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 1432–1441.
- [182] F. Pittrof, J. Gerhards, W. Erni, G. Klecak, *Clinical and experimental dermatology* **1992**, *17 Suppl 1*, 26–28.
- [183] R. Pradhan, P. Dandawate, A. Vyas, S. Padhye, B. Biersack, R. Schobert, A. Ahmad, F. H. Sarkar, *Current drug targets* **2012**, *13*, 1777–1798.
- [184] R. Sleven, E. Lanckacker, G. Boulet, P. Delputte, L. Maes, P. Cos, *Journal of microbiological methods* **2015**, *112*, 73–75.
- [185] D. Monti, L. Saccomani, P. Chetoni, S. Buralassi, S. Tampucci, F. Mailland, *British Journal of Dermatology* **2011**, *165*, 99–105.
- [186] X. Hui, S. J. Baker, R. C. Wester, S. Barbadillo, A. K. Cashmore, V. Sanders, K. M. Hold, T. Akama, Y.-K. Zhang, J. J. Plattner, H. I. Maibach, *Journal of pharmaceutical sciences* **2007**, *96*, 2622–2631.
- [187] A. Polak, *Mycoses* **1993**, *36*, 101–103.
- [188] L. E. Jurdana, K. P. Ghiggino, K. W. Nugent, I. H. Leaver, *Textile Research Journal* **1995**, *65*, 593–600.
- [189] C. Choe, J. Schleusener, J. Lademann, M. E. Darvin, *Mechanisms of ageing and development* **2018**, *172*, 6–12.
- [190] S. Murdan, G. Milcovich, G. S. Goriparthi, *Skin pharmacology and physiology* **2011**, *24*, 175–181.
- [191] R. S. Bottei, P. L. Gerace, *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1961**, *23*, 245–251.
- [192] H. Baumann, H. R. Hensel in *Metallkomplexfarbstoffe*, Fortschritte der Chemischen Forschung, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **1967**, S. 643–783.
- [193] Z. F. Plyta, T. Li, V. P. Papageorgiou, A. S. Mellidis, A. N. Assimopoulou, E. N. Pitsinos, E. A. Couladouros, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 3385–3390.
- [194] S. Murdan in *Topical Nail Products and Ungual Drug Delivery*, CRC Press, **2012**, S. 18–53.
- [195] C. Ren, L. Fang, T. Li, M. Wang, L. Zhao, Z. He, *International journal of pharmaceutics* **2008**, *350*, 43–47.
- [196] A. Ahad, M. Aqil, K. Kohli, H. Chaudhary, Y. Sultana, M. Mujeeb, S. Talegaonkar, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2009**, *19*, 969–988.
- [197] Hahn Medical Systems, **06.06.2022**.
- [198] A. Fahr, *Pharmazeutische Technologie: Für Studium und Beruf*, 12. völlig neu bearbeitete Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **2015**.
- [199] E. Malinauskyte, P. A. Cornwell, L. Reay, N. Shaw, J. Petkov, *Biopolymers* **2020**, *111*, e23401.
- [200] A. Lund, M. Shiotani, S. Shimada in *Principles and applications of ESR spectroscopy*, (Hrsg.: A. Lund, M. Shiotani, S. Shimada), Springer, Dordrecht und Heidelberg, **2011**, S. 3–28.
- [201] I. J. Sud, D. S. Feingold, *The Journal of investigative dermatology* **1981**, *76*, 438–441.

- [202] A. L. Pfeifer Barbosa, A. Wenzel-Storjohann, J. D. Barbosa, C. Zidorn, C. Peifer, D. Tasdemir, S. S. Çiçek, *Journal of ethnopharmacology* **2019**, 233, 94–100.
- [203] S. S. Bharate, V. Kumar, R. A. Vishwakarma, *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **2016**, 19, 461–469.
- [204] E. Ghelardi, F. Celandroni, S. A. Gueye, S. Salvetti, S. Senesi, A. Bulgheroni, F. Mailland, *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2014**, 58, 2825–2829.
- [205] M. Monod, M. Feuermann, K. Salamin, M. Fratti, M. Makino, M. M. Alshahni, K. Makimura, T. Yamada, *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2019**, 63, DOI 10.1128/AAC.00863-19.
- [206] M. V. Martin, R. Dinsdale, *British Journal of Oral Surgery* **1982**, 20, 294–298.
- [207] A. Alonso, M.-A. Urbaneja, F. M. Goñi, F. G. Carmona, F. G. Cánovas, J. C. Gómez-Fernández, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1987**, 902, 237–246.
- [208] L. Laouar, K. C. Lowe, B. J. Mulligan, *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, 18, 433–438.
- [209] Q.-Z. Lv, L. Yan, Y.-Y. Jiang, *Virulence* **2016**, 7, 649–659.
- [210] C. S. Foote, J. S. Valentine, A. Greenberg, J. F. Liebman, *Active Oxygen in Chemistry*, Springer, Dordrecht, **1996**.
- [211] T. A. Dix, J. Aikens, *Chemical research in toxicology* **1993**, 6, 2–18.
- [212] K. A. Walters, G. L. Flynn, J. R. Marvel, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1985**, 37, 771–775.
- [213] T. Yogo, Y. Urano, Y. Ishitsuka, F. Maniwa, T. Nagano, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 12162–12163.
- [214] W. Li, L. Li, H. Xiao, R. Qi, Y. Huang, Z. Xie, X. Jing, H. Zhang, *RSC Advances* **2013**, 3, 13417.
- [215] P. Yuster, S. I. Weissman, *The Journal of Chemical Physics* **1949**, 17, 1182–1188.
- [216] D. S. McClure, *The Journal of Chemical Physics* **1949**, 17, 905–913.
- [217] S. A. Yazdanparast, R. C. Barton, *Journal of medical microbiology* **2006**, 55, 1577–1581.
- [218] Lusiana, S. Reichl, C. C. Müller-Goymann, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2013**, 84, 599–605.
- [219] Evonik, **2022**.
- [220] T. M. Paris, S. A. Allan, B. J. Udell, P. A. Stansly, *PloS one* **2017**, 12, e0189228.
- [221] F. Raubitschek, *Sabouraudia* **1961**, 1, 87–90.
- [222] E. Sotiriou, T. Koussidou-Eremonti, G. Chaidemenos, Z. Apalla, D. Ioannides, *Acta dermatovenereologica* **2010**, 90, 216–217.
- [223] B. M. Piraccini, G. Rech, A. Tosti, *Journal of the American Academy of Dermatology* **2008**, 59, S75–6.
- [224] Y. Kumagai, Y. Shinkai, T. Miura, A. K. Cho, *Annual review of pharmacology and toxicology* **2012**, 52, 221–247.

- [225] P. Klein, F. Barthels, P. Johe, A. Wagner, S. Tenzer, U. Distler, T. A. Le, P. Schmid, V. Engel, B. Engels, U. A. Hellmich, T. Opatz, T. Schirmeister, *Molecules (Basel Switzerland)* **2020**, 25.
- [226] Y. J. You, X. G. Zheng, K. Yong, B. Z. Ahn, *Archives of pharmacal research* **1998**, 21, 595–598.
- [227] I. Y. Bakunina, E. A. Koltsova, N. D. Pokhilo, O. P. Shestak, A. Y. Yakubovskaya, T. N. Zvyagintseva, V. F. Anufriev, *Chemistry of Natural Compounds* **2009**, 45, 69–73.
- [228] R. G. Harvey, Q. Dai, C. Ran, T. M. Penning, *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, 69, 2024–2032.
- [229] M. W. Davies, C. N. Johnson, J. P. Harrity, *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 3525–3532.
- [230] *Structure-Activity Relationships of Anti-Tumour Agents*, (Hrsg.: D. N. Reinhoudt, T. A. Connors, H. M. Pinedo, K. W. van de Poll), Springer Science+Business Media B.V, Dordrecht, **1983**.
- [231] A. L. LORINCZ, S. H. SUN, *Archives of dermatology* **1963**, 88, 393–402.
- [232] E. A. Couladouros, Z. F. Plyta, V. P. Papageorgiou, *The Journal of organic chemistry* **1996**, 61, 3031–3033.