

# **Effiziente Synthese von Dronabinol und weiterer cannabinoider Derivate und deren pharmakologische Charakterisierung**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Marcus Rudolf Götz

aus Albstadt

Mai 2018



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

29.05.2018

Gutachter/in der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

2. Gutachter/in: Prof. Dr. Michael Decker

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer/in: Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

2. Prüfer/in: Prof. Dr. Michael Decker

3. Prüfer/in: Prof. Dr. Petra Högger

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

02.08.2018

Doktorurkunde ausgehändigt am:

\_\_\_\_\_

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgender Form veröffentlicht:

#### **Posterpräsentationen:**

Götz, M. R.; Holzgrabe, U.; Koch, O.; Fiebich, B.; Muñoz, E. Effects of novel semi-synthetic cannabinoids on CB1 and CB2 receptors through binding and signalling I. International Cannabinoid Research Society Symposium, **2014**, Baveno, Italien.

Götz M. R.; Fernández-Ruiz, J.; Fiebich, B.; Gajfulin, M.; Garcia-Toscano, L.; Koch, O.; Muñoz, E.; Pazos, M. R.; Winkler, M.; Holzgrabe, U. Effects of novel semi-synthetic cannabinoids on CB1 and CB2 receptors through binding and signalling II. International Cannabinoid Research Society Symposium, **2016**, Bukovina, Polen.

#### **Patent:**

Koch, O.; Götz, M. R.; Looft, J.; Vössing, T. Mixtures of cannabinoid compounds, their preparation and use: (-)-trans-Cannabidiol, Tetrahydrocannabidiol and their derivatives. EP2842933B1, **2015**.

#### **Patentanmeldungen:**

Koch, O.; Götz, M. R.; Looft, J.; Vössing, T. Mixtures of cannabinoid compounds, their preparation and use: (-)-trans-Cannabidiol, Tetrahydrocannabidiol and their derivatives. CN105517989A, ES2547354T3, JP2016531919A, US2015336874A1, WO2015032519A1, **2015**.

Koch, O.; Götz, M. R. Mixtures of cannabinoid compounds, their preparation and use: (-)-trans-Cannabidivarin, Tetrahydrocannabidivarin and their derivatives. EP15156750A1, **2015**.

Erfurt, H.; Weber, M.; Niemeyer, H. J.; Götz, M. R.; Winkler, M. Method for purifying cannabinoid compounds. PCT/EP2016/060905, **2016**.

## Danksagung

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe für die wissenschaftliche Anleitung, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung dieser externen Dissertation.

Der Symrise AG, insbesondere Herrn Dr. Heinz-Jürgen Bertram, für die Möglichkeit, die Klaviatur des Unternehmens für die Entwicklung von Arzneistoffen verwenden zu dürfen. Herrn Dr. Torsten Kulke, der diese Arbeit immer unterstützt hat, aber leider viel zu früh verstorben ist.

Herrn Dr. Oskar Koch, ohne dessen große Erfahrung und tatkräftige Mithilfe das Gesamtprojekt „Mary Jane“ kein Erfolg geworden wäre. Deine Versiertheit und praktische Hilfe, Oskar, waren mir ein Antrieb, diese Entwicklung zu einem erfolgreichen Ende zu führen. Herrn Dr. Walter Dilk und Herrn Bernd Hölscher für die Synthese von Vorstufen und Startmaterialien, sowie Herrn Rüdiger Wittlake und Frau Nikola Bast für die analytische Unterstützung, Herrn Harry Erfurt für die Unterstützung in allen Trenntechnikangelegenheiten, Herrn Apotheker Jörg Thilo Fischer und Herrn Dr. Matthias Winkler danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit. Den Mitgliedern der Arbeitsgruppen der Genannten möchte ich für ihre praktische Arbeit danken.

Herrn Dr. Jens Schmitz und Herrn Dr. Ludwig Höllein vom Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, die diese Arbeit mit ihrer analytischen Expertise unterstützt haben.

Die Zellassays zur pharmakologischen Charakterisierung neuer Cannabinoide wurden dankenswerterweise von der Firma VivaCell, Freiburg, Herrn Dr. Bernd Fiebich, und der Firma VivaCell España SL in Zusammenarbeit mit dem Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Abteilung Zellbiologie, Physiologie und Immunologie, in Cordoba, Spanien, Prof. Eduardo Muñoz, zur Verfügung gestellt. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Fiebich, Prof. Muñoz und Frau Dr. Carmen Navarrete durchgeführt. Ich danke Bernd, Eduardo und Carmen sowie den Firmen VivaCell GmbH, Freiburg, und VivaCell Biotechnology España SL für die Zusammenarbeit und die Möglichkeit, in ihren Labors in Freiburg und Cordoba zu arbeiten.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. José Javier Fernández Ruiz und seinen Mitarbeitern Laura García-Toscano und Dr. M. Ruth Pazos vom Instituto Universitario de Investigación

Neuroquímica, CIBERNED y IRYCIS, Abteilung Biochemie und Molekularbiologie der medizinischen Fakultät, Universidad Complutense de Madrid, für die Zusammenarbeit bei den funktionellen Studien an neuen Cannabinoiden.

Herrn Prof. Dr. Christian W. Lehmann vom Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Abteilung Chemische Kristallographie und Elektronenmikroskopie, danke ich für die röntgenkristallographischen Untersuchungen.

# Widmung

*Meiner Mutter*

*Margit Götz*





---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Cannabinoide	1
1.1.1	Verwendung als Arzneistoffe	1
1.1.2	Pharmakologie	4
1.1.3	Vorkommen	7
1.2	Dronabinol	7
1.2.1	Physikochemische Parameter von Dronabinol	9
1.2.2	Regulatorische Einordnung	9
1.2.3	Synthese	12
1.2.3.1	Synthese über CBD	12
1.2.3.2	Andere Synthesewege	18
1.2.3.2.1	Caren	18
1.2.3.2.2	Verbenol	19
1.2.3.2.3	Isopiperitenol	20
1.2.3.2.4	Citral	20
1.2.3.2.5	Isopren	21
1.2.3.2.6	Stereodivergente Synthese	22
1.3	Cannabidiol (CBD)	23
1.3.1	Regulatorische Einordnung	23
1.3.2	Synthese	25
1.4	Cannabidivarin (CBDV)	25
1.4.1	Regulatorische Einordnung	26
1.4.2	Synthese	28
1.5	Marktübersicht	28
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1	Cannabidiol	32
3.1.1	Menthadienol G	32
3.1.2	Olivetolcarbonsäuremethylester	35
3.1.3	Kontinuierliche Synthese von Cannabidiol	36
3.1.4	Synthese und Definition der Reaktionsparameter	38
3.1.5	Optimierung der Reaktionsparameter	40
3.1.6	Verunreinigungsprofil	42
3.2	Synthese und Reinigung von Dronabinol	48
3.2.1	Synthese und Definition der Reaktionsparameter	50
3.2.2	Optimierung der Reaktionsparameter	52
3.2.2.1	Art des Lösungsmittels und Konzentration der Reaktanden	52

3.2.2.2	Optimierung des Katalysator-Komplexes in MTBE.....	55
3.2.2.3	Vergrößerung des Ansatzes und Optimierung des Katalysator-Komplexes in Dichlormethan.....	58
3.2.2.4	Feinabstimmung.....	61
3.2.3	Verunreinigungsprofil .....	65
3.2.4	Reinigung von Dronabinol mittels Simulated Moving Bed Chromatography .....	65
3.2.5	Gehalt.....	70
3.2.6	Ergänzung zu den physikochemischen Eigenschaften von Dronabinol .....	70
3.3	Cannabidivarin .....	72
3.3.1	Divarincarbonsäuremethylester und Divarin.....	72
3.3.2	Kontinuierliche Synthese von Cannabidivarin .....	73
3.3.3	Optimierung der Reaktionsparameter.....	74
3.3.4	Reinheit.....	76
3.3.5	Verunreinigungen in der Mutterlauge von CBDV .....	77
3.4	Synthese neuer Cannabinoide.....	77
3.5	Zellassay-basierte pharmakologische Charakterisierung neuer Cannabinoide .....	80
3.5.1	Bindungsaffinität von CBD- und CBDV-Derivaten zu CB1- und CB2-Rezeptoren .....	80
3.5.1.1	Bindungsaffinität von Cannabidiol-Derivaten.....	81
3.5.1.2	Bindungsaffinität von Cannabidivarin-Derivaten.....	82
3.5.1.3	Korrelation zwischen Struktur und Bindungsaffinität .....	83
3.5.2	Messung der intrinsischen Aktivität in einem CB1- bzw. CB2-Rezeptor-transfizierten Hamster-ovarial-Zellmodell .....	84
3.5.2.1	Zytotoxizität in CHO-Zellen.....	86
3.5.2.2	Intrinsische Aktivität von CBD-Derivaten .....	87
3.5.2.3	Intrinsische Aktivität von Cannabidivarin-Derivaten.....	91
3.5.3	Korrelation zwischen Struktur und intrinsischer Aktivität an CB1- und CB2-Rezeptoren .....	93
3.5.4	Effekte auf CB2-Rezeptor exprimierende Zellen des Immunsystems .....	94
3.5.4.1	Jurkat-T-Zellen .....	94
3.5.4.1.1	Zytotoxizität in Jurkat-T-Zellen.....	95
3.5.4.1.2	Effekte auf Jurkat-T-Zellen.....	95
3.5.4.2	IL-17-vermittelte M1-Polarisation von RAW264.7-Makrophagen.....	97
3.5.4.2.1	Zytotoxizität in RAW264.7-Makrophagen.....	98
3.5.4.2.2	Effekte auf die IL-17-induzierte Polarisation von Makrophagen .....	99
3.5.4.3	Primäre humane Monozyten .....	102
3.5.4.3.1	Zytotoxizität in primären humanen Monozyten .....	102
3.5.4.3.2	Effekte auf humane Monozyten.....	104

---

3.5.5	Korrelation zwischen Struktur und Wirkung auf CB2-Rezeptor exprimierende Immunzellen .....	108
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>109</b>
<b>5</b>	<b>Summary .....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Experimentalteil .....</b>	<b>113</b>
6.1	Methoden und Materialien .....	113
6.1.1	Analytik .....	113
6.1.1.1	Flüssigchromatographie (LC) .....	113
6.1.1.1.1	Analytik von Cannabidiol und Cannabidivarin sowie neuer Cannabinoide .....	113
6.1.1.1.2	Analytik von Dronabinol .....	116
6.1.1.1.3	LC-MS/MS .....	119
6.1.1.2	Gaschromatographie (GC) .....	120
6.1.1.2.1	GC-FID .....	120
6.1.1.2.2	GC-MS .....	120
6.1.1.2.3	Chirale GC .....	121
6.1.1.3	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie (FTIR) .....	122
6.1.1.4	Röntgeneinkristallstrukturanalyse .....	122
6.1.1.5	Refraktionsindex .....	122
6.1.1.6	Spezifische Drehung .....	122
6.1.1.7	NMR-Spektroskopie .....	123
6.1.2	Synthese .....	124
6.1.2.1	OptiMax 1001 .....	124
6.1.3	Präparative HPLC .....	124
6.1.4	Reinigung mittels SMB-Chromatographie .....	124
6.1.5	Verwendete Chemikalien .....	125
6.1.5.1	Menthadienol G .....	126
6.1.5.2	Resorcin-Derivate .....	128
6.1.5.2.1	Olivetolcarbonsäuremethylester (OM) .....	128
6.1.5.2.2	Divarincarbonsäuremethylester (DM) .....	128
6.2	Kontinuierliche Synthese von Cannabidiol .....	129
6.2.1	Schritt 1: Kupplung im kontinuierlichen Verfahren .....	129
6.2.2	Schritt 2: Umesterung .....	130
6.2.3	Schritt 3: Verseifung und Decarboxylierung .....	131
6.2.4	Röntgeneinkristallstrukturanalyse von CBD .....	132
6.2.5	Verunreinigungsprofil .....	133
6.2.5.1	3-(2-Hydroxyethoxy)-2-[(1R,6R)-6-isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl]-5-pentyl-phenol (11) .....	133

6.2.5.2	5-(1-Ethoxy-1-methylethyl)-2-methyl-9-pentyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-2,6-methano-1-benzoxocin-7-ol (12) .....	134
6.2.5.3	Benzoxocin-10-carbonsäuremethylester, Methyl-(2R,5R,6R)-7-hydroxy-2-methyl-9-pentyl-5-(prop-1-en-2-yl)-3,4,5,6-tetrahydro-2H-2,6-methano-1-benzoxocin-10-carboxylat (13).....	134
6.2.5.4	Methyl-(6aS,10aS)-1-hydroxy-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-2-carboxylat (14).....	135
6.2.5.5	4-[(1R,6R)-6-Isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl]-5-pentyl-benzen-1,3-diol (16) .....	136
6.2.5.6	2-[(1R,6S)-6-Isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl]-5-pentyl-benzen-1,3-diol (18) .....	136
6.2.5.7	Dronabinol und (+)-trans- $\Delta^9$ -THC (19) .....	137
6.2.5.8	2,4-Bis(6-isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl)-5-pentyl-benzen-1,3-diol (20).....	137
6.3	Synthese und Reinigung von Dronabinol.....	138
6.3.1	Synthese von Dronabinol.....	138
6.3.2	Reinigung von Dronabinol .....	139
6.4	Synthese von Cannabidivarin .....	140
6.4.1.1	Schritt 1: Kupplung im kontinuierlichen Verfahren .....	140
6.4.1.2	Schritt 2: Umesterung .....	141
6.4.1.3	Schritt 3: Verseifung und Decarboxylierung .....	141
6.4.2	Röntgeneinkristallstrukturanalyse von CBDV .....	142
6.4.3	Isolierung von CBDV aus der Mutterlauge .....	143
6.5	Synthesen neuer Cannabinoide.....	144
6.5.1	2-Hydroxyethylcannabidiolat (2-HEC, 31) .....	144
6.5.2	2-Hydroxypentylcannabidiolat (2-HPC, 32) .....	144
6.5.3	Glycerylcannabidiolat (GCBD, 33).....	145
6.5.4	Cyclohexylcannabidiolat (CHC, 34) .....	146
6.5.5	Hexylcannabidiolat (HC, 35).....	147
6.5.6	N-Methylsulfonylcannabidiolat (NMSC, 36).....	148
6.5.7	2-Hydroxyethylcannabidivarinolat (2-HECBVDV, 37) .....	150
6.5.8	Cyclohexylcannabidivarinolat (CHCBVDV, 38).....	152
6.5.9	Hexylcannabidivarinolat (HCBVDV, 39).....	153
6.6	Zellassay-basierte pharmakologische Charakterisierung neuer Cannabinoide .....	155
6.6.1	Bindungsaffinität von CBD- und CBDV-Derivaten zu CB1- und CB2-Rezeptoren .....	155
6.6.2	Messung der intrinsischen Aktivität in einem CB1-, bzw. CB2-Rezeptor-transfizierten Hamster-ovarial-Zellmodell .....	156
6.6.3	Zytotoxizität in CHO-Zellen, Jurkat-T-Zellen und RAW264.7-Makrophagen (MTT-Assay) .....	157

6.6.4	Jurkat-T-Zellen .....	157
6.6.5	IL-17-vermittelte M1-Polarisation von RAW264.7-Makrophagen.....	158
6.6.6	Primäre humane Monozyten.....	159
6.6.7	Zytotoxizität in primären humanen Monozyten (alamarBlue <sup>®</sup> -Assay).....	160
<b>Anhang</b>	.....	<b>161</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	.....	<b>165</b>
<b>Literatur</b>	.....	<b>168</b>









# 1 Einleitung

## 1.1 Cannabinoide

Seit der Entdeckung des endogenen Cannabinoid-Systems mit seiner funktionellen Bedeutung für die Regulation und Modulation des Immun- sowie des Nervensystems ist das Interesse an natürlichen und künstlichen Cannabinoiden stetig gewachsen.

### 1.1.1 Verwendung als Arzneistoffe

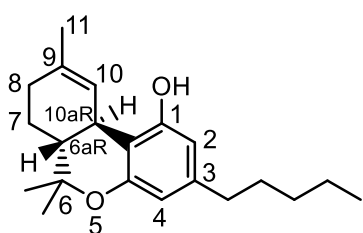


Abb. 1: Dronabinol

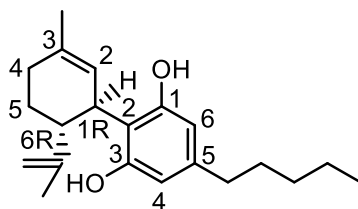


Abb. 2: (-)-trans-Cannabidiol

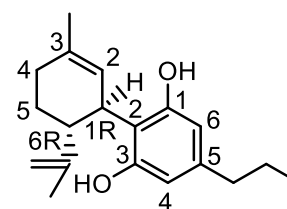


Abb. 3: (-)-trans-Cannabidivarin

Dronabinol (Abb. 1) ist zur Behandlung von Übelkeit und Erbrechen im Zusammenhang mit Krebs-assoziiierter Chemotherapie und zur Behandlung von Anorexie und damit verbundenem Gewichtsverlust bei Patienten mit erworbener Immundefizienz (engl. AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome) zugelassen. Die Anzahl an positiven Humanstudien zu diesen Anwendungsfeldern ist am höchsten (Tab. 1). Schmerzzustände und Muskelspasmen sind weitere Indikationen, in denen Dronabinol von Ärzten verschrieben werden kann.

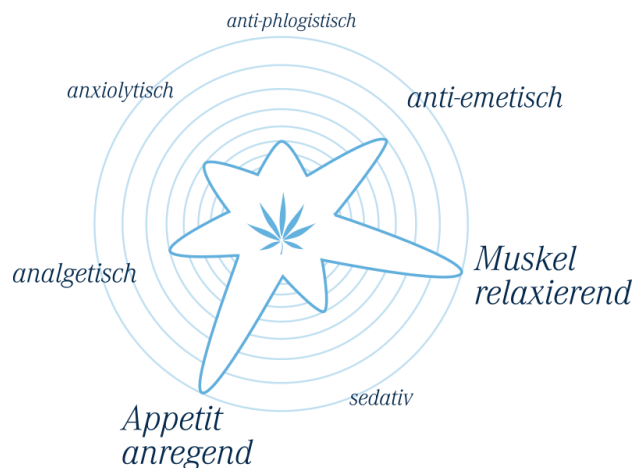
Tab. 1: Humanstudien zu Dronabinol, abgeändert nach Grotenhermen und Vahl<sup>1</sup>

Indikation	Anzahl der randomisierten kontrollierten Studien (manche dreiarmlig)	Positive Ergebnisse	Negative Ergebnisse
Spastizität	n = 5 bei multipler Sklerose	n = 3	n = 2
	n = 2 bei Paraplegie	n = 2	–
Übelkeit und Erbrechen im Zusammenhang mit Zytostatika	n = 19	n = 18	n = 1

## Einleitung

Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust	n = 5 bei HIV/AIDS	n = 5	–
	n = 3 bei verschiedenen Tumorerkrankungen	n = 3	–
	n = 1 bei Alzheimer	n = 1	–
Chronische Schmerzen	n = 4 bei neuropathischen Schmerzen oder Schmerzen bei multipler Sklerose	n = 3	n = 1
	n = 4 bei chronischen Schmerzen (Krebs, Rheuma, Fibromyalgie)	n = 3	n = 1

In Abb. 4 sind die Effekte von Dronabinol unter Angabe des jeweiligen Ausprägungsgrades aufgeführt. Bei systemischer Verwendung stehen die appetitanregende und die muskelrelaxierende Wirkung von Dronabinol im Vordergrund. Die antiemetische Wirkung ist ebenfalls gut erforscht. Die analgetische Wirkung könnte eine zukünftige Anwendung in der Schmerztherapie erlauben. Weniger ausgeprägt sind die anxiolytische und die sedative Wirkung, die eher anderen Cannabinoiden zugesprochen werden können. Das komplexe Wirkspektrum, das sich daraus ergibt, kann vom Heilberufler in verschiedenen Anwendungsfeldern verwendet werden.



**Abb. 4:** Effekte von Dronabinol nach Likar und Pipam<sup>2</sup>

Diskutiert werden weiterhin folgende Wirkungen und Anwendungsgebiete<sup>3</sup>:

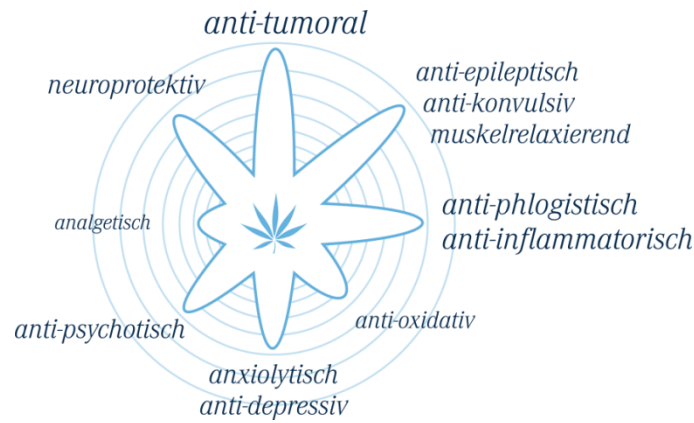
- Senkung des Augeninnendrucks zur Behandlung des Glaukoms
- Bronchodilatatorische Wirkung zur Behandlung von Asthma
- Antikonvulsive Wirkung im Zusammenhang mit Epilepsie

---

Bei der Beschreibung dieser Anwendungsgebiete ist zu beachten, dass sie weithin auf die Wirkung von Tetrahydrocannabinol (THC) aus Pflanzenmaterialien (aus der Gattung *Cannabis*) zurückgeführt werden. Dabei wird oft nicht zwischen dessen Isomeren differenziert, sondern THC als Oberbegriff oder Summenparameter verwendet. Die Verabreichung geschieht meist durch Rauchen von Pflanzenteilen oder Zubereitungen aus der Pflanze. Beispielsweise besteht Marihuana überwiegend aus zerkleinerten Teilen der ganzen Pflanze, wobei die weiblichen Blütenstände wegen ihres hohen Gehalts an THC bevorzugt werden; zudem können in Marihuana Samenkörner enthalten sein.<sup>3</sup> Fünf- bis sechsmal stärker wirksam als Marihuana ist Haschisch, das im Wesentlichen das wirkstoffreiche Harz der weiblichen Blütenstände enthält.<sup>3</sup>

Durch die Verbrennung der Pflanzenteile und den verbreiteten Konsum als Mischungen mit Tabak werden gesundheitsschädliche Vielstoffgemische inhaliert. Marihuana-Rauch enthält Teer, Ammoniak, Blausäure, Stickstoffmonoxid, polyzyklische Aromaten und aromatische Amine.<sup>4</sup> Problematisch sind daher insbesondere die Verabreichung an Asthmatiker oder Kinder und generell die Verabreichung über einen längeren Zeitraum (z.B. in der Krebstherapie). Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Behandlungsergebnisse häufig variabel sind, da der Gehalt von der Spezies der Pflanze, deren Erntezeitpunkt etc. abhängig ist. Die Dosis ist dadurch schwer einzuschätzen.

(-)-trans-Cannabidiol (CBD, Abb. 2) gewinnt neben Dronabinol in jüngster Zeit immer mehr an Beachtung. In Abb. 5 sind die Wirkungen von CBD als Grad ihrer Ausprägung aufgetragen. In den USA hat die Food and Drug Administration (FDA) CBD unter dem Orphan-Drug-Status zur Behandlung von Glioblastoma multiforme (einem malignen primären Hirntumor beim Menschen) und zur Behandlung von schweren epileptischen Erkrankungen, genauer dem Lennox-Gastaut- und dem Dravet-Syndrom, zugelassen. Bei systemischer Gabe wirkt CBD neuroprotektiv anxiolytisch und antipsychotisch. Bei topischer Anwendung sind seine entzündungshemmenden und antioxidativen Effekte ausschlaggebend.



**Abb. 5:** Effekte von CBD nach Booz<sup>5</sup>, Massi et al.<sup>6</sup>, Notcutt et al.<sup>7</sup>, Englund et al.<sup>8</sup>

Weiterhin wird CBD zur Verwendung in den folgenden Feldern erforscht:

- Epilepsie bei Erwachsenen
- Angststörungen
- Schlafstörungen
- Bewegungsstörungen im Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen (Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer)
- Neuropathische Schmerzen
- Durch Chemotherapie induzierte periphere Neuropathien
- Verminderung der Abhängigkeit von Kokain, Amphetaminen und Opioiden

Ein Stoff, der in Zukunft ebenfalls an Bedeutung gewinnen könnte, ist (-)-trans-Cannabidivarin (CBDV, Abb. 3). Wegen seiner antikonvulsiven Eigenschaften<sup>9</sup> befindet er sich derzeit in der klinischen Phase 2 für die Behandlung der Epilepsie sowie zur Anwendung bei Störungen des autistischen Spektrums.<sup>10</sup> In Bezug auf die Behandlung der Epilepsie zeigte die bisher größte Humanstudie an 162 Patienten mit unzureichend behandelten fokalen epileptischen Anfällen jüngst jedoch keine Wirksamkeit verglichen mit der Placebogruppe. Die Reduktion an Anfällen war jedoch in beiden Gruppen mit ca. 40% sehr hoch.<sup>11</sup>

### 1.1.2 Pharmakologie

Die Cannabinoid-Rezeptoren CB1 und CB2 gelten als Wirkorte für Cannabinoide. Obwohl auch ein potentieller CB3-Rezeptor diskutiert wird, wird davon ausgegangen, dass die Hauptwirkungen durch CB1 und CB2 vermittelt werden. Dronabinol, endogene Cannabinoide und eine Vielzahl von synthetischen Cannabinoiden binden an die genannten Rezeptoren und

---

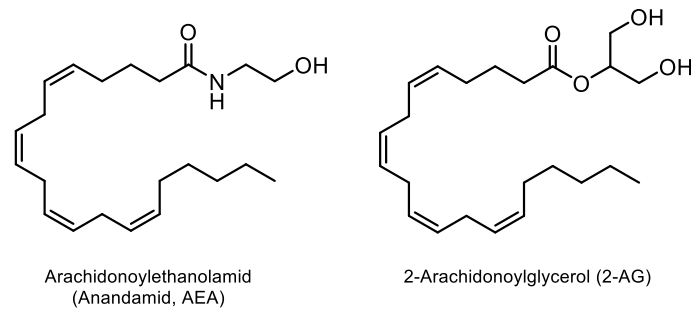
üben auf diese Weise – vermittelt über in der Zellmembran lokalisierte G-Proteine – Effekte auf die Zellen aus.<sup>12</sup>

CB1 und CB2 sind Mitglieder der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Sie gehören zur Klasse A der heptahelikalen Transmembranproteine.<sup>13</sup> Die  $G_{i/o}$ -Rezeptoren hemmen über das heterotrimere G-Protein die Adenylatcyclase und aktivieren die Mitogen-aktivierte Proteinkinase.<sup>14,15</sup> CB1 kann zudem über Ionenkanäle des A-Typs Kaliumströme und über N- und P/Q-Typ-Kanäle Calciumströme modulieren. Weiterhin kann CB1 über  $G_s$ -Proteine Signale übertragen.<sup>16,17,18,19</sup>

CB1-Rezeptoren verfügen sowohl über eine orthosterische als auch über eine oder mehrere allosterische Bindungsstellen, die als potentielle Wirkorte für Liganden infrage kommen.<sup>20,21,22</sup> CB1-Rezeptoren werden hauptsächlich an den terminalen Enden von zentralen und peripheren Nervenzellen gefunden, wo sie üblicherweise eine Hemmung von exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmittern vermitteln.<sup>14,23,24</sup> In höchster Dichte kommt sie in den Basalganglien, im Hippocampus und im Cerebellum vor. Durch die Verteilung der Rezeptoren im zentralen Nervensystem und deren Aktivierung können verschiedene kognitive Prozesse beeinflusst werden (z.B. die Aufmerksamkeit und das Gedächtnis) sowie verschiedene motorische Funktionen und die Schmerzwahrnehmung.<sup>9</sup> Es gibt außerdem Hinweise dafür, dass CB1-Rezeptoren von nicht-neuronalen Zellen (einschließlich Immunzellen)<sup>14</sup> exprimiert werden, und dass CB2-Rezeptoren auf verschiedensten Zellen innerhalb und außerhalb des Gehirns zu finden sind.<sup>25,26,27,28,29,30,31</sup>

CB2-Rezeptoren sind vornehmlich in Immunzellen lokalisiert. Werden sie aktiviert, modulieren sie z.B. die Zellmigration und die Ausschüttung von Zytokinen innerhalb und außerhalb des Gehirns.<sup>14,32</sup> CB2-Rezeptoren sind aber auch in Zellen zu finden, die am Knochenaufbau und -abbau beteiligt sind.<sup>33</sup>

Endogene Agonisten, die an die Cannabinoid-Rezeptoren binden (Endocannabinoide), sind Arachidonoyl ethanolamid (Anandamid) und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) (Abb. 6).<sup>32</sup>



**Abb. 6:** Endocannabinoide: Anandamid und 2-AG

Von besonderem pharmazeutischen Interesse ist Dronabinol, das ein starker intrinsischer Ligand sowohl an CB1- als auch an CB2-Rezeptoren ist. Die Aktivität an beiden Rezeptoren macht das Wirkprofil komplex.<sup>14</sup> Dronabinol ist in den USA seit 1985 als Wirkstoff im Arzneimittel Marinol<sup>®</sup> zur Behandlung von Anorexie, die bei Patienten im Verlauf einer AIDS-Therapie vorkommt, sowie von Nausea und Emesis, die im Zusammenhang mit der Chemotherapie bei Krebspatienten (sog. Tumorkachexie) stehen, zugelassen. In Deutschland ist als Fertigarzneimittel seit Mai 2011 ein Extrakt aus *Cannabis sativa* unter dem Namen Sativex<sup>®</sup> zugelassen.

Pflanzlich gewonnene Extrakte enthalten vornehmlich (-)-trans- $\Delta^9$ -THC (Dronabinol) und CBD. Da diese Cannabinoide synthetisch zugänglich sind, könnte gemutmaßt werden, dass eine synthetische Replik des Extraktes ein ähnliches Wirkprofil haben würde. Dem entgegen steht der postulierte Multiplizitäts-Effekt: Die Wirkung von Dronabinol ist zwar unzweifelhaft belegt, es verfestigt sich jedoch die noch unbelegte Meinung, dass die Wirkung von der Gesamtheit der in einem *Cannabis*-Extrakt oder in einer anderweitigen *Cannabis*-Präparation enthaltenen Inhaltsstoffe kommen soll. Dr. Mitch Earleywine schreibt: „Gegner von medizinisch verwendetem Marihuana verweisen oft auf Dronabinol, die synthetische Version eines der aktiven Inhaltsstoffe von Marihuana. Die Verwendung von nur einem aktiven Inhaltsstoff macht Dronabinol weniger wirksam als medizinisches Marihuana. Viele Erkrankungen sprechen besser auf eine Kombination von Inhaltsstoffen aus Marihuana an.“<sup>34</sup>

Für die pharmazeutische Verwendung werden qualitativ einwandfreie, wirksame und unbedenkliche Arzneimittel und Arzneistoffe benötigt. Synthetische Cannabinoide können diese Anforderungen erfüllen und haben den Vorteil, dass die wirksamen Grundstrukturen gezielt modifiziert werden können, um beabsichtigte Wirkungen zu erzielen oder Nebenwirkungen zu reduzieren. Beispielsweise werden CB2-Rezeptor-Agonisten als potentielle Medikamente gegen eine Reihe von Schmerzerkrankungen gesehen. Dies

---

beinhaltet die Behandlung von akuten Schmerzen, chronischen entzündungsbedingten Schmerzen und neuropathischen Schmerzen.<sup>35,36</sup> Ebenso könnten CB2-Agonisten hilfreich bei der Behandlung von neuroinflammatorischen oder neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. multipler Sklerose<sup>37,38</sup>, amyotropher Lateralsklerose<sup>39,40</sup> und der Huntington-Krankheit<sup>41</sup> sowie bei der Behandlung von Schlaganfall sein.<sup>42,43</sup>

Überdies werden CB2-Agonisten als zukünftige Therapeutika bei peripheren entzündlichen Erkrankungen wie Arteriosklerose<sup>44</sup> oder entzündlichen Darmerkrankungen<sup>45,46</sup>, Ischämie<sup>47</sup>, diabetischer Nephropathie<sup>48</sup> und Leberzirrhose gesehen.<sup>49,45,50</sup> Sowohl epidemiologische als auch präklinische Daten deuten darauf hin, dass die Aktivierung von CB2-Rezeptoren einen positiven Effekt bei Osteoporose haben könnten.<sup>51</sup> Auch in präklinischen Modellen für Krebserkrankungen haben sich CB2-Rezeptor-Agonisten als wirksam erwiesen.<sup>52,45,46</sup>

### 1.1.3 Vorkommen

Biologie, Konsum und Wirkung von *Cannabis* werden in unzähligen Publikationen beschrieben. Profunde Kompendien wurden z.B. von Pertwee<sup>9</sup> und Täschner<sup>3</sup> verfasst.  $\Delta$ 9-THC und phytochemisch verwandte Cannabinoide kommen natürlich in *Cannabis* (Hanf) vor, der zur Familie der Cannabidaceae gehört. Die botanische und chemotaxonomische Einteilung der Gattung *Cannabis* erfolgt auf zwei unterschiedliche Weisen: Während Schultes et al. drei Arten, *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* LAM. und *Cannabis ruderalis*, unterscheiden,<sup>53</sup> ordnen andere der Gattung nur eine Art, *Cannabis sativa* L., zu, welche die Unterarten *Cannabis sativa* ssp. *sativa* und ssp. *indica* umfasst.

Aus rechtlicher Sicht wird in einen Drogen- und einen Fasertyp unterschieden, wobei die Differenzierung aufgrund des mengenmäßigen Verhältnisses der Hauptcannabinoide CBD und  $\Delta$ 9-THC geschieht. Der Gehalt an Inhaltsstoffen ist abhängig von der Art und dem Wachstumsstadium der Pflanze. Dazu kommt noch die jahreszeitlich limitierte Verfügbarkeit des pflanzlichen Rohstoffes.

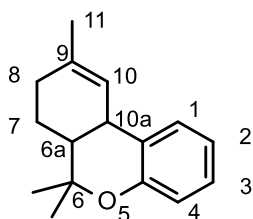
## 1.2 Dronabinol

Synonym zur Bezeichnung Dronabinol wird oft der Name  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol bzw. dessen Abkürzung  $\Delta$ 9-THC verwendet. Allerdings birgt dies die Gefahr zu übersehen, dass das chemisch eindeutig definierte und daher ausschließlich verwendete (-)-trans- $\Delta$ 9-

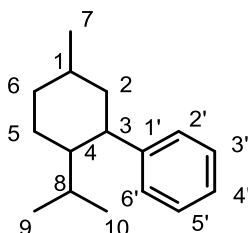
Tetrahydrocannabinol (nach der IUPAC-Nomenklatur (6aR,10aR)-6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo(c)chromen-1-ol genannt) ausschließlich das benannte 6aR,10aR-Enantiomer ist. Dahingegen kann  $\Delta^9$ -THC auch ein Racemat bezeichnen, weil die Bezeichnung nur Aufschluss über die Lage der Doppelbindung gibt, jedoch nichts über die Konfiguration der Stereozentren aussagt.

In der Fachliteratur sind unterschiedliche Nomenklaturen vorhanden, die in Bezug auf die Lage der Doppelbindung außerhalb des aromatischen Rings und die Lokalisierung der Reste für Verwirrung sorgen können. Nach der Benzopyran-Nummerierung (Abb. 7) ist die Lage der Doppelbindung zwischen C<sub>9</sub> und C<sub>10</sub> lokalisiert. Bei der Monoterpen-Nummerierung (Abb. 8) entspricht dies der Bezeichnung  $\Delta^1$ .<sup>3</sup>

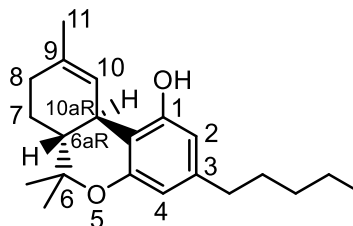
Der Name Dronabinol wird im weiteren Verlauf nur synonym für die vorstehend bezeichnete IUPAC-Bezeichnung verwendet.



**Abb. 7:** Benzopyran-Nummerierung



**Abb. 8:** Monoterpen-Nummerierung



**Abb. 9:** Dronabinol nach der Benzopyran-Nomenklatur mit den Stereozentren 6aR und 10aR

Die Summenformel lautet C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>. Die molare Masse beträgt 314,5 g/mol. Die dreidimensionale Struktur ist in Abb. 10 dargestellt.

Dronabinol hat eine spezifische Drehung von  $[\alpha]_D^{20} = -200$ , (10g/l) in EtOH (96%).<sup>54</sup> Der pK<sub>a</sub> wird mit 10,6<sup>55</sup> angegeben. Die Angaben zu logP sind mit 5,648<sup>56</sup> oder 6,97<sup>57</sup> uneinheitlich.



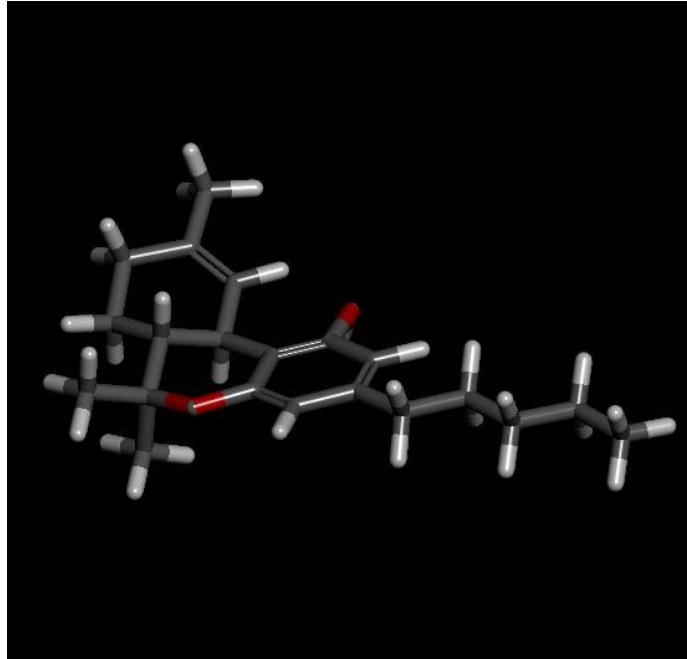


Abb. 10: 3D-Stabmodell von Dronabinol

### 1.2.1 Physikochemische Parameter von Dronabinol

Neben der komplexen Stereochemie stellt die physische Form des Wirkstoffes eine Herausforderung dar. Dronabinol ist bei 20 °C eine „fast farblose bis hellgelbe, an der Oberfläche bisweilen blass violette“<sup>54</sup> Substanz (siehe 3.2.5). Erst bei Temperaturen von ca. 80 °C ist es fließfähig genug, um dosiert zu werden.<sup>54</sup>

In Wasser ist Dronabinol praktisch unlöslich, in Ethanol (96 %) und in Glycerol (85 %) ist es leicht löslich.<sup>54</sup> Fette Öle eignen sich sehr gut, um Dronabinol in definierten Mengen zu lösen. Diese Lösungen können dann zu Fertigarzneimitteln formuliert werden.

### 1.2.2 Regulatorische Einordnung

In Deutschland wird Dronabinol in Anlage III des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG) aufgelistet und kann ohne Indikationseinschränkungen auf einem Betäubungsmittelrezept verschrieben werden. Da jedoch kein Fertigarzneimittel im Handel verfügbar ist, muss entweder ausnahmsweise eine Verschreibung von Dronabinol in Form von Marinol<sup>®</sup> und damit der Import aus dem Ausland erfolgen oder eine Rezepturherstellung in einer Apotheke nach anerkannten pharmazeutischen Regeln vorgenommen werden.

Marinol<sup>®</sup> wird peroral eingenommen. Die Anfangsdosis zur Stimulation des Appetits beträgt 2,5 mg Dronabinol pro Kapsel zweimal am Tag. Bei Übelkeit und Erbrechen im

Zusammenhang mit einer Chemotherapie wird die Dosierung individuell vom Arzt festgelegt. Die Tagesdosis wird dabei in vier bis sechs Einzeldosen aufgeteilt. Die maximale Dosis wird mit 10 mg pro Tag angegeben.<sup>58</sup>

Ölige Dronabinol-Tropfen (25 mg/ml) werden individuell und indikationsbezogen dosiert. Das Neue Rezeptur-Formularium gibt daher nur Dosierungen mit orientierendem Charakter an: „Als Appetitstimulans kann die zweimal tägliche Gabe von 2,5 mg Dronabinol ausreichen, als Antiemetikum werden 5 bis 20 mg 1 bis 3 Stunden vor der Chemotherapie, dann alle 2 bis 4 Stunden mit bis zu sechs Gaben pro Tag nach Ende der Chemotherapie eingenommen, als Muskelrelaxans und Analgetikum bei multipler Sklerose werden Tagesdosen von 2,5 bis 10 mg bei zweimal täglicher Gabe genannt.“<sup>59</sup>

Die Verschreibungshöchstmenge in Deutschland liegt bei 500 mg innerhalb von 30 Tagen. Bei Bedarf ist ein Einzelimport von Fertigarzneimitteln, die Dronabinol enthalten, aus dem Ausland möglich.<sup>60</sup> Dies geschieht gemäß § 73 Arzneimittelgesetz<sup>60</sup> und stellt für alle Beteiligten (Patient, Arzt, Apotheker und Krankenkasse) einen nicht zu unterschätzenden Aufwand dar, da der Stoff unter die Kontrolle des BtMG fällt und damit der Export aus dem Herkunftsland sowie der Import in das Zielland zusätzlich reglementiert sind.

Ein Extrakt aus *Cannabis sativa* namens Nabiximol ist als Fertigarzneimittel in Deutschland seit Mai 2011 unter dem Namen Sativex<sup>®</sup> zugelassen. Die Zulassung bezieht sich auf die Zusatzbehandlung zur Symptomverbesserung bei Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Spastik aufgrund von multipler Sklerose, die nicht angemessen auf ein anderes spasmolytisches Arzneimittel angesprochen haben. Der Extrakt besteht im Wesentlichen aus  $\Delta^9$ -THC und CBD und kann auf einem Betäubungsmittelrezept verordnet werden. Er wird als Spray an wechselnden Stellen in der Mundhöhle angewandt.<sup>61</sup>

Die US-amerikanische Drug Enforcement Agency (DEA) erklärt in einem Positionspapier aus dem Jahr 2009, dass Marihuana zu Recht unter Schedule 1 des Controlled Substance Act (CSA, 21 U.S.C. § 801 ff) eingeordnet sei.<sup>62</sup> Als sogenannte Schedule-1-Substanzen werden Wirkstoffe oder komplexe Gemische betrachtet, die ein hohes Missbrauchspotential und gleichzeitig keine anerkannte medizinische Verwendung in den Vereinigten Staaten haben und bei denen ein Mangel an Sicherheitsdaten für die Verwendung – selbst unter medizinischer Aufsicht – besteht. Das Positionspapier ist mit Versionen aus 2011 und 2013 weiterhin auf der Website der DEA zu finden.

Auch die FDA stellte am 30.09.2015 fest, dass sie keine Zulassung für die Vermarktung von medizinischem Marihuana oder einem davon abgeleiteten Produkt erteilt hat, da sie „bis dato nicht feststellen konnte, dass ein solches Produkt sicher und wirksam in irgendeiner Anwendung“<sup>63</sup> sei.

Die Verordnung Nr. 1164/89 der Europäischen Kommission bezeichnet Hanf mit einem  $\Delta$ 9-THC-Gehalt von bis zu 0,3% bezogen auf die Trockenmasse als Nutzhanf, wohingegen sogenannter Drogenhanf einen Gehalt von 5–15%  $\Delta$ 9-THC haben kann.

Tab. 2 und Tab. 3 zeigen die unterschiedlichen Cannabinoid-Gehalte in Marihuana bzw. in *Cannabis*-Pflanzen aus verschiedenen Ländern.

**Tab. 2:** Wirkstoffgehalt in sichergestelltem Marihuana nach Täschner<sup>3</sup>

Typ	THC-Gehalt [%]
Kolumbien	
„commercial“	1,0–2,5
„connoisseur“	2,5–4,0
„exceptional“	4,0–8,0
Mexiko	
„regular“	0,5–1,5
„fine“	1,5–3,0
„top-grade“	4,0–8,0
Hawaii	2,0–7,0
Thailand („sticks“)	2,0–8,0

**Tab. 3:** Wirkstoffgehalt in *Cannabis*-Pflanzen (Fasertyp) nach Täschner<sup>3</sup>

Ursprungsland	Gehalt [%]			Geschlecht
	THC	CBD	CBC	
Afghanistan	2,7	1,9	0,5	männl.
Afghanistan	2,6	4,6	0,3	männl.
Äthiopien	1,3	3,1	0,2	männl.
Frankreich	1,5	1,0	0,1	weibl.
Indien	1,0	3,4	0,3	
Libanon	1,1	1,7	0,1	weibl.
Mandschurei	1,1	1,9	0,2	weibl.
Thailand	2,0	2,4	0,1	weibl.
Thailand	1,4	1,3	0,1	weibl.
Türkei	1,6	2,8	0,2	männl.

Da aus den pflanzlichen Produkten unter anderem Rauschmittel wie Marihuana oder Haschisch hergestellt werden können, unterliegt sowohl der Anbau als auch die Gewinnung strengen betäubungsmittelrechtlichen Auflagen.

Zusammenfassend sind mit der Gewinnung von Dronabinol folgende Schwierigkeiten verbunden:

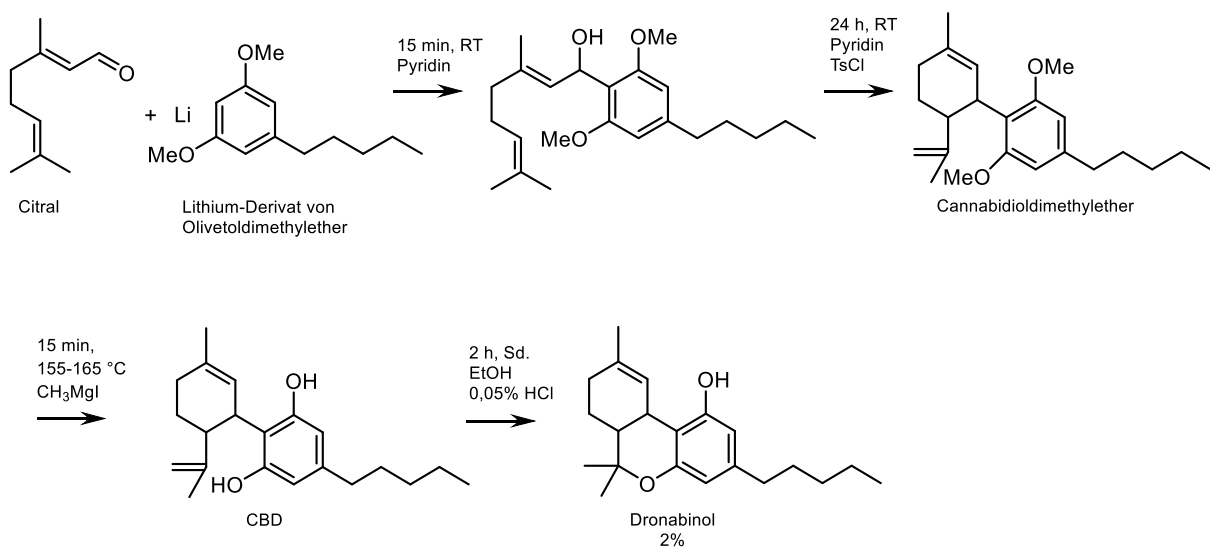
- Taxonomische Einordnung oft nicht eindeutig
- Notwendigkeit der Extraktion aus einer Vielzahl von Inhaltsstoffen
- Komplexe rechtliche Anforderungen an den Anbau des pflanzlichen Ausgangsmaterials
- Wachstumsabhängiger Gehalt an wertgebenden Inhaltsstoffen
- Jahreszeitlich limitierte Verfügbarkeit des Rohstoffes

All diese Gründe machen eine synthetische Darstellung von Dronabinol, CBD, CBDV und anderen naturidentischen Cannabinoiden notwendig.

### 1.2.3 Synthese

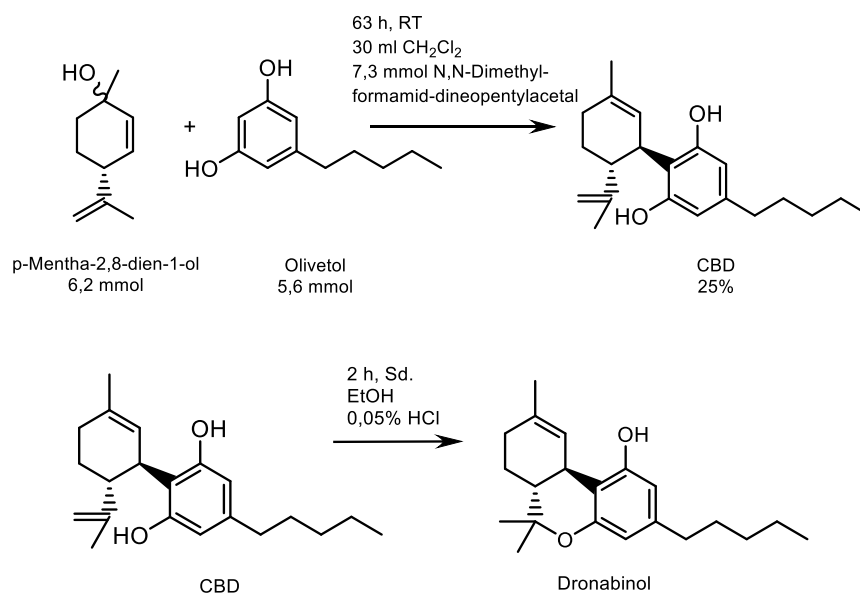
#### 1.2.3.1 Synthese über CBD

Gaoni und Mechoulam publizierten 1964 die Strukturaufklärung von Dronabinol<sup>64,3</sup> und veröffentlichten 1965 eine Totalsynthese (Abb. 11).<sup>65</sup> Sie bezeichneten den Stoff nach einer heute nicht mehr gebräuchlichen Nomenklatur als  $\Delta^1$ -Tetrahydrocannabinol. Mehrere chromatographische Zwischenschritte waren notwendig, um aus der unspezifischen Reaktion am Ende eine Ausbeute an Dronabinol von 2% zu erhalten.<sup>65</sup>



**Abb. 11:** Synthese von Dronabinol nach Mechoulam und Gaoni<sup>65</sup>

Petrzilka et al. beschrieben 1967 ein Verfahren zur synthetischen Herstellung von (-)-trans-CBD aus (+)-p-Menthadien-(1,8)-ol mit Olivetol.<sup>66</sup> Zuvor hatten Gaoni et al. bereits die Cyclisierung des natürlich gewonnenen CBD zu  $\Delta^9$ -THC beschrieben.<sup>64</sup> Im Verbund ergibt sich die in Abb. 12 dargestellte Synthesestrategie.

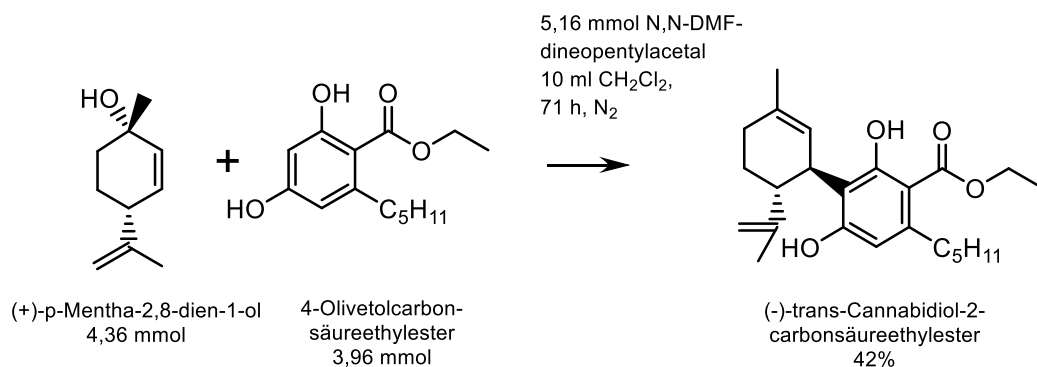


**Abb. 12:** Synthese von CBD nach Petrzilka et al.<sup>66</sup> und anschließende Synthese von Dronabinol nach Mechoulam und Gaoni<sup>64</sup>

Das Verfahren ist Synthese-strategisch anerkennenswert. Der kostspielige Katalysator, die langen Reaktionszeiten und die verbesserungswürdigen Ausbeuten machen es industriell jedoch kaum anwendbar.

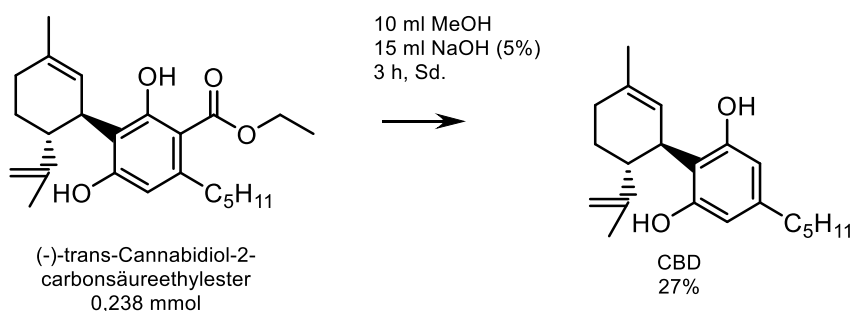
Gaoni et al. und Petrzilka et al. geben an, die weitere Synthese des Dronabinols durch Säurekatalyse zu vollziehen (Abb. 12). Razdan et al. nennen für die beschriebene Synthese eine Ausbeute von 17–22%. Für ihre eigene Ein-Schritt-Synthese aus denselben Edukten geben sie eine Ausbeute von 31% an.<sup>67</sup> Die Dronabinol-Synthese von Razdan et al. und wahrscheinlich auch die von Petrzilka et al. wurden mittels Gaschromatographie (GC) analysiert. Dabei besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit der Artefaktbildung, da thermische Cyclisierungs- und Decarboxylierungsprozesse das Ergebnis beeinflussen können, solange noch ringoffene Strukturen (z.B. Reste von CBD) oder Phenolester als Nebenprodukte auftreten. Daher müssen die in den 60er Jahren berichteten Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden. Der wesentliche Nachteil der Synthesen ist, dass sie zu komplexen Vielstoffgemischen führen, die mit hohem zeitlichen und monetären Aufwand chromatographisch getrennt werden müssen.

Petrzilka et al.<sup>68</sup> beschreiben einen teiloptimierten vollsynthetischen Weg, bei dem sie zur Erhöhung der Regioselektivität der elektrophilen Substitution am aromatischen Resorcin-Ring den Ethylester der Olivetolsäure verwenden (Abb. 13). Korte et al. hatten zuvor die Darstellung des dazu notwendigen 4-Olivetolcarbonsäureethylesters veröffentlicht.<sup>69</sup>



**Abb. 13:** Synthese von (-)-trans-Cannabidiol-2-carbonsäureethylester nach Petrzilka et al.<sup>68</sup>

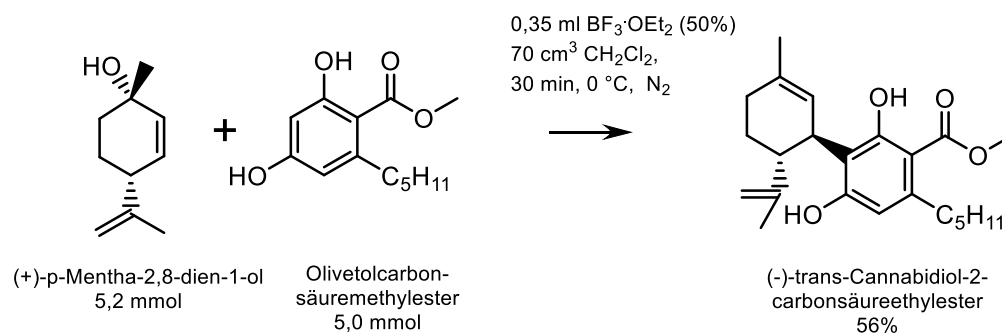
Anschließend wurde die Estergruppe von (-)-trans-Cannabidiol-2-carbonsäureethylester mit Natronlauge gespalten, wobei die erhaltene instabile Carbonsäure sofort decarboxylierte.<sup>68</sup> Im Labormaßstab ergab sich eine Ausbeute von 27% an CBD, das allerdings nicht kristallin zu gewinnen war, sondern als hellgelbes Öl anfiel (Abb. 14).<sup>68</sup>



**Abb. 14:** Synthese von CBD nach Petrzilka et al.<sup>68</sup>

Die modifizierte Synthese von Crombie et al. (Abb. 15) liefert den (-)-trans-Cannabidiol-2-carbonsäureethylester in Ausbeuten von 40%, wenn die Synthese mit p-Toluolsulfonsäure katalysiert wird. Bei Verwendung der Lewis-Säure BF<sub>3</sub>-Etherat werden sogar Ausbeuten von 39–56% erzielt.<sup>70</sup>

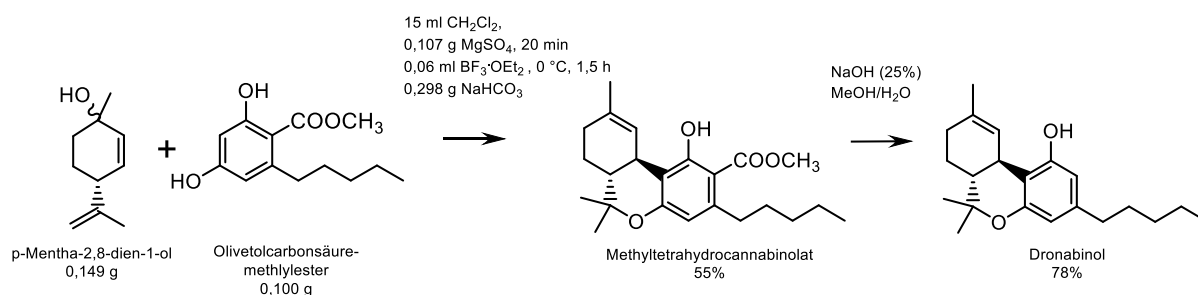
Ob cis- oder trans-(+)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol eingesetzt wird, ist irrelevant, da durch die Eliminierung des chiralen Zentrums an C<sub>1</sub> durch Wasserabspaltung, nur die Chiralität an C<sub>4</sub> erhalten bleibt.<sup>70</sup>



**Abb. 15:** Synthese von (-)-trans-Cannabidiol-2-carbonsäuremethylester nach Crombie et al.<sup>70</sup>

Crombie et al. zeigen damit eine teiloptimierte vollsynthetische Variante als eine Option für die industrielle Herstellung auf.

Angelehnt daran wurde von Chan und Chaly<sup>71</sup> ein Syntheseverfahren für Dronabinol beschrieben (Abb. 16), in welchem zunächst Olivetolcarbonsäuremethylester und p-Mentha-2,8-dien-1-ol in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  mittels  $\text{BF}_3$ -Etherat als Lewis-Säure zu Methyltetrahydrocannabinolat umgesetzt wird, welches anschließend mittels Natronlauge unter Zusatz von MeOH verseift und zu Dronabinol decarboxyliert wird. Während Crombie et al. den Grundstein für eine effiziente Synthese von Dronabinol gelegt haben, weisen Chan und Chaly auf eine Erhöhung der Ausbeute des Kondensationsproduktes auf 78% hin. Bei der Synthese kommt es jedoch zu erhöhtem Aufwand durch die chromatographische Isolierung von Methyltetrahydrocannabinolat.



**Abb. 16:** Synthese von Dronabinol nach Chan und Chaly<sup>71</sup>

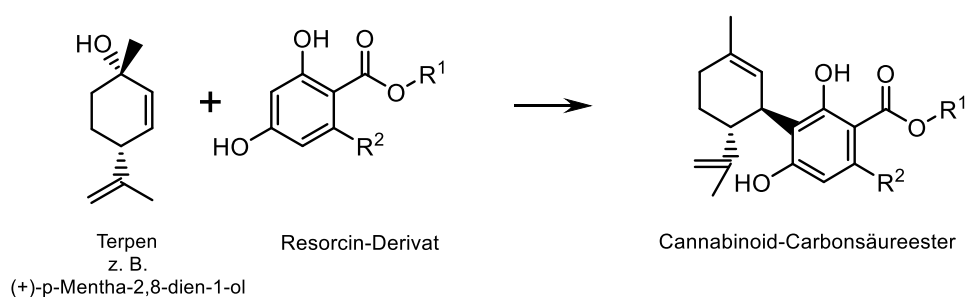
Die Patentanmeldung EP2578561 beschreibt ebenfalls die Umsetzung von Menthadienol oder dessen Derivaten mit 6-Alkyl-2,4-dihydroxybenzoesäureestern. Als bevorzugte Lewis-Säure-Katalysatoren werden Metall-Triflate wie z.B. Scandium- oder Zinktrifluorsulfonat verwendet.

Das Patent US5342971 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Dronabinol und verwandten Dibenzo[b,d]pyranen. Diese werden durch Erhitzen eines Dihydroxybenzoesäure-Derivates in Gegenwart eines Lewis-Säure-Katalysators und eines inerten unpolaren Lösungsmittels, in welchem zwar die Dihydroxybenzoesäure löslich, der Lewis-Säure-Katalysator jedoch unlöslich oder sehr geringfügig löslich ist, hergestellt. Die Patentschrift nennt als Beispiel für die Anwendung dieser Synthese die Herstellung von Intermediaten, die für die Synthese von Dronabinol und verwandten Dibenzo[b,d]pyranen verwendet werden können.<sup>72</sup>

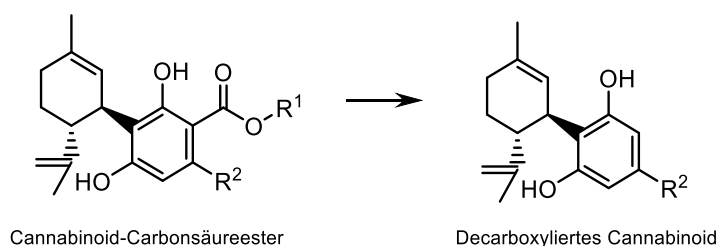
In der Patentschrift WO2006/136273 wird ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung von Dronabinol aus CBD durch Cyclisierung beschrieben. Die Besonderheit dabei ist, dass das in organische Lösungsmittel vorgelegte CBD in Gegenwart eines Molekularsiebs unter Erhitzen zu Dronabinol cyclisiert wird. In dieser Patentschrift wird festgestellt, dass das verwendete Molekularsieb neben trocknenden auch starke katalytische Eigenschaften hat, die bei der Umsetzung im Vordergrund stehen. Cyclisierungen, die nur in Gegenwart eines Lewis-Säure-Katalysators ausgeführt werden, seien deutlich langsamer und liefern schlechtere Ausbeuten an Dronabinol.<sup>72</sup>

Bis auf die Synthese von Chan und Chaly ist allen Verfahren gemeinsam, dass sie in drei wesentliche Schritte gegliedert werden können:

### I. Kupplung eines geeigneten Terpens mit einem Resorcin-Derivat

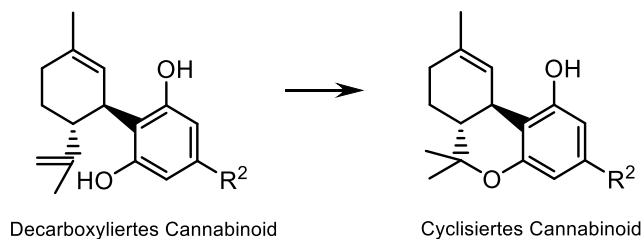


### II. Verseifung und Decarboxylierung der Estergruppe im Resorcin-Derivat





### III. Cyclisierung des Intermediats



Durch diese Synthesestrategie können Cannabinoide mit Modifikationen an  $R^1$  und  $R^2$  dargestellt werden.

Die oben bezeichneten Verfahren haben Schwächen gemeinsam, die insbesondere bei der großtechnischen Synthese zum Tragen kommen. Diese sind im Einzelnen:

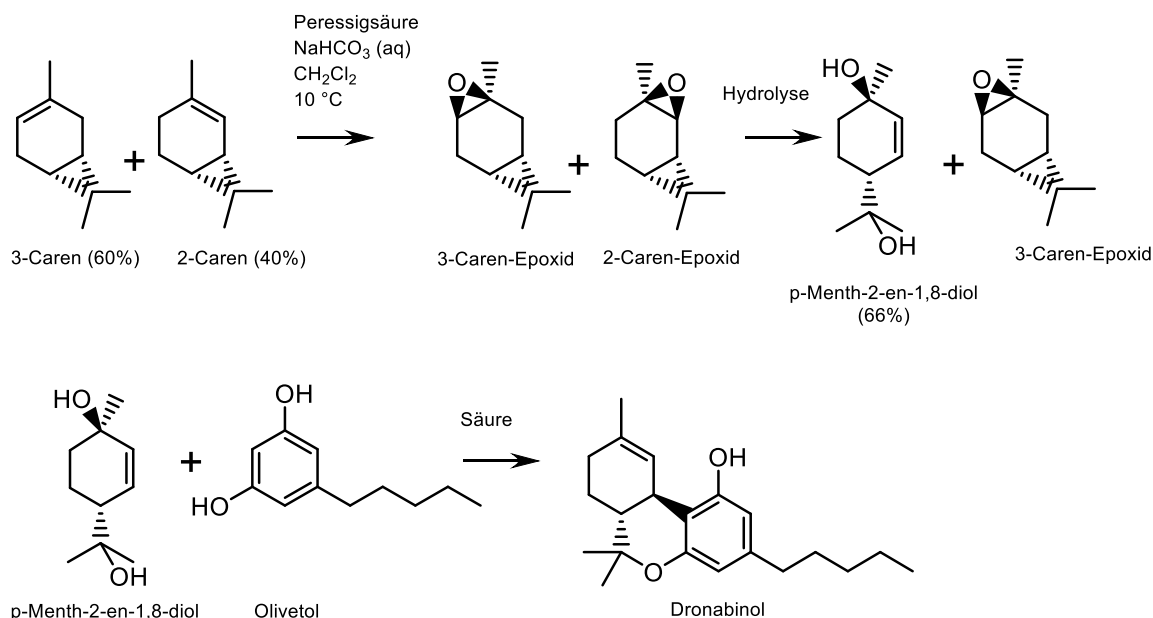
- Notwendigkeit einer starken Kühlung der Reaktion (Schritt I) sowie lange Reaktionsdauern, was die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens hinsichtlich des Energieverbrauches einerseits und der relativ langen Arbeitszeit andererseits negativ beeinflusst.
- Verwendung von leicht flüchtigem Methylenchlorid (Schritte I und III), welches als gesundheitsschädlich und potentiell karzinogen eingestuft wird und hohe Sicherheitsvorkehrungen im Industrielabor und in der Produktion notwendig macht. Dies verschlechtert ebenfalls die Wirtschaftlichkeit und die ökologische Verträglichkeit des Verfahrens.
- Hohe Verdünnung und damit schlechte Raum-Zeit-Ausbeute (Schritte I und III).

### 1.2.3.2 Andere Synthesewege

#### 1.2.3.2.1 Caren

Die Synthese von Dronabinol via p-Menth-2-en-1,8-diol und Olivetol (Abb. 15 und Abb. 16) geht auf die Darstellung des Terpenbausteins aus (+)-3-Caren zurück (Abb. 17). Letzteres ist aus Terpentinöl von *Pinus sylvestris* gut verfügbar. Der Ausgangsstoff lässt sich in einer Äquilibrierungsreaktion in ein Isomerengemisch aus 3- und 2-Caren überführen. Anschließend wird mit Peressigsäure epoxidiert, wonach bei der anschließenden Hydrolyse laut Cabaj et al. nur das 2-Caren-Epoxid zum p-Menth-2-en-1,8-diol ringöffnet (Ausbeute 66% bezogen auf das 2-Caren). Die Hydrolyse wird in einem Gemisch aus Ethylacetat und verdünnter Essigsäure durchgeführt, wobei das p-Menth-2-en-1,8-diol nach Abdestillieren des Ethylacetats und Zugabe großer Mengen n-Heptan als Feststoff ausfällt und durch Filtration isoliert werden kann.<sup>73</sup>

Die Umsetzung von p-Menth-2-en-1,8-diol mit Olivetol zum CBD wurde von Autoren<sup>74</sup> mit Ausbeuten von 68% beschrieben, was angesichts der Tatsache, dass die Substitution bezüglich 2- und 4-Position gegenüber dem zuvor beschriebenen Olivetolester wenig selektiv ist, allerdings bezweifelt werden muss (vgl. Abb. 17).



**Abb. 17:** Synthese von Dronabinol aus 3-Caren via p-Menth-2-en-1,8-diol

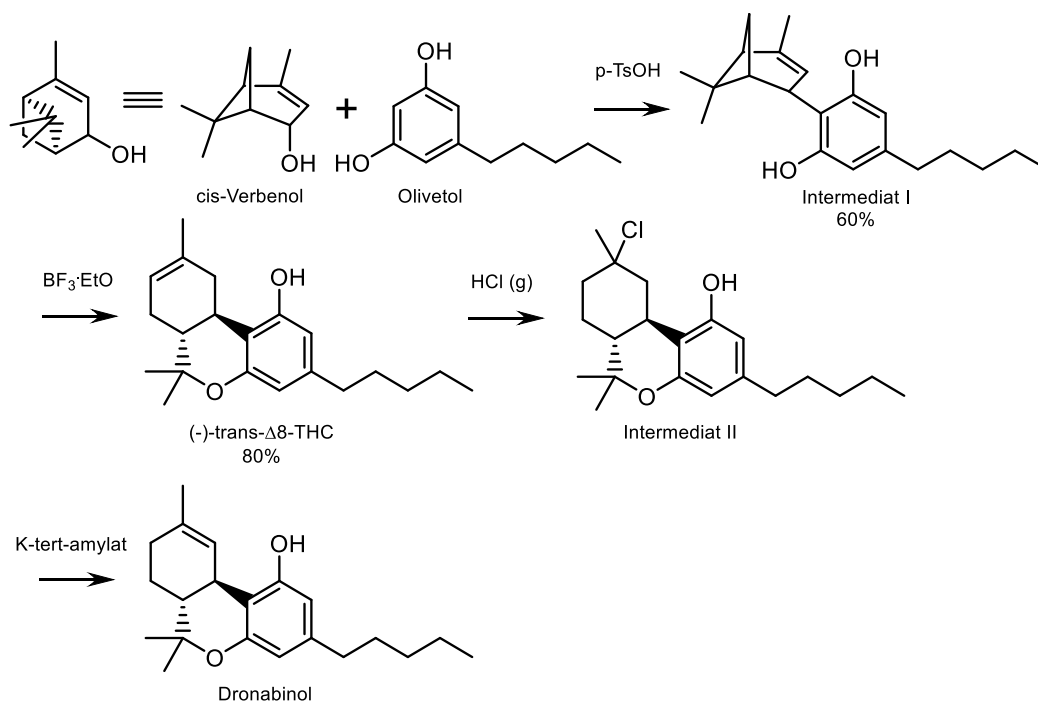
Der Ausgangsstoff ist ein natürlich vorkommender Rohstoff, der wegen des Isomeren-Gleichgewichts nur zu 40% ausgenutzt werden kann. Weiterhin umfasst die Synthese dieses Terpen-Bausteins drei Stufen. Auch der hohe Lösungsmiteinsatz ist von Nachteil.

### 1.2.3.2 Verbenol

Als weiterer Ausgangsstoff wird in der Literatur<sup>75,76</sup> cis-Verbenol aus natürlichem (-)- $\alpha$ -Pinen beschrieben, das ebenfalls mittels säurekatalysierter Reaktion mit Olivetol zu tricyclischen Cannabinoiden umsetzbar ist.

Mit Hilfe von p-Toluolsulfonsäure erhält man in Methylenechlorid zunächst in einer Ausbeute von 60% das Intermediat I, welches durch Behandlung mit  $\text{BF}_3$  zum (-)- $\Delta^8$ -THC cyclisiert. Durch Addition von gasförmigem Chlorwasserstoff an die Doppelbindung und anschließende Eliminierung von Chlorwasserstoff mit Hilfe von Kalium-tert-amylat ergibt sich Dronabinol. Laut den Autoren führt das Racemat von cis- und trans-Verbenol zum gleichen Ergebnis (Abb. 18).

Der Ausgangsstoff ist wiederum ein natürlicher Rohstoff, die Umsetzung führt allerdings zum falschen Cannabinoid-Isomer ((-)-trans- $\Delta^8$ -THC). Die anschließend beschriebene Isomerisierung ist für technische Zwecke indiskutabel.



**Abb. 18:** Synthese von Dronabinol aus cis-Verbenol nach Machoulam et al.<sup>75</sup>

### 1.2.3.2.3 Isopiperitenol

Cardillio et al. publizierten in den 1970er Jahren eine Umsetzung von Isopiperitenol mit Olivetol zu CBD.<sup>77</sup> Als Produkt ergab sich außerdem das an Position 4 substituierte 4-Cannabidiol, man erhält allerdings nur eine Ausbeute von 10% an (Abb. 19).

Der Ausgangsstoff für das Isopiperitenol war natürliches (+)-Limonen, das in großen Mengen zu geringen Preisen verfügbar ist. Die Synthese ist aber aufgrund der geringen Ausbeute unwirtschaftlich. Das Auftreten des an Position 4 substituierten Produktes ließe sich möglicherweise durch den Einsatz von Olivetolester anstelle von Olivetol verhindern, da der Ester an Position 6 des Resorcin-Rings zum einen eine sterische Hemmung bedeuten würde und zum anderen eine meta-dirigierende Wirkung hätte.

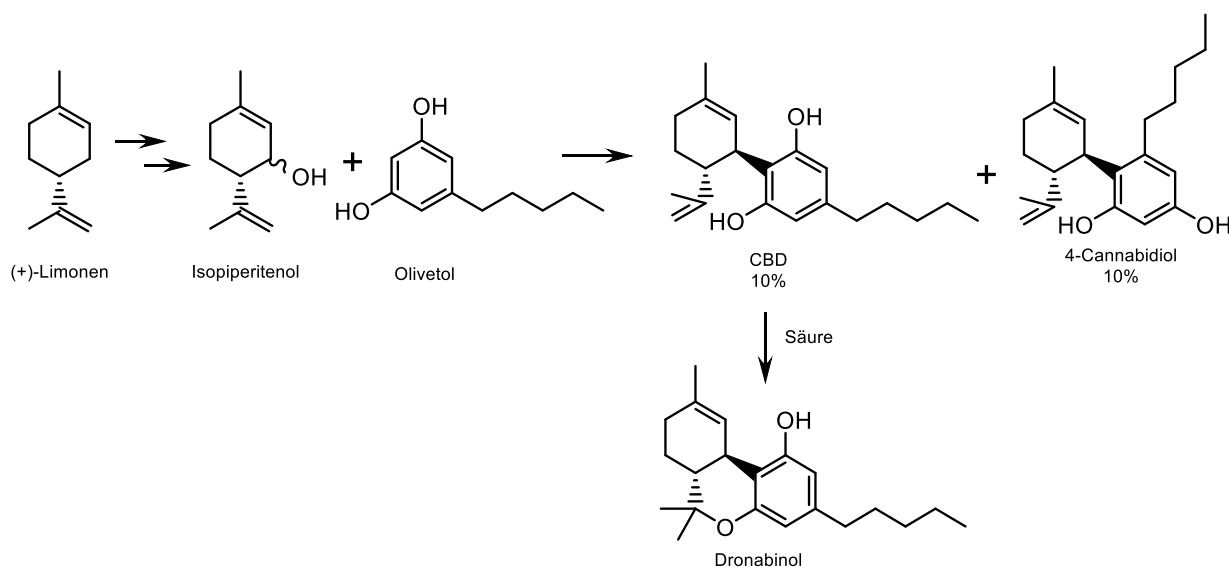


Abb. 19: Synthese von Dronabinol über Isopiperitenol nach Cardillio et al.<sup>77</sup>

### 1.2.3.2.4 Citral

Eine weitere „biomimetische“ Verfahrensweise – da ähnlich der Biosynthese in *Cannabis* (Abb. 24) – wurde in den 1960er Jahren von Mechoulam et al. publiziert.<sup>75</sup> In Anlehnung an das natürlich vorkommende Cannabigerol (CBG) wurde dazu Citral in Methylenchlorid mit Olivetol unter Zugabe von wenig  $\text{BF}_3$ -Etherat umgesetzt, was zu einer Mischung aus racemischem trans- $\Delta^9$ -THC sowie racemischem cis- $\Delta^9$ -THC führte (Abb. 20).

Dabei wird wahrscheinlich ein zum CBG analoges Intermediat I durchlaufen, welches in der Folgereaktion unter Totalverlust der Selektivität cyclisiert.

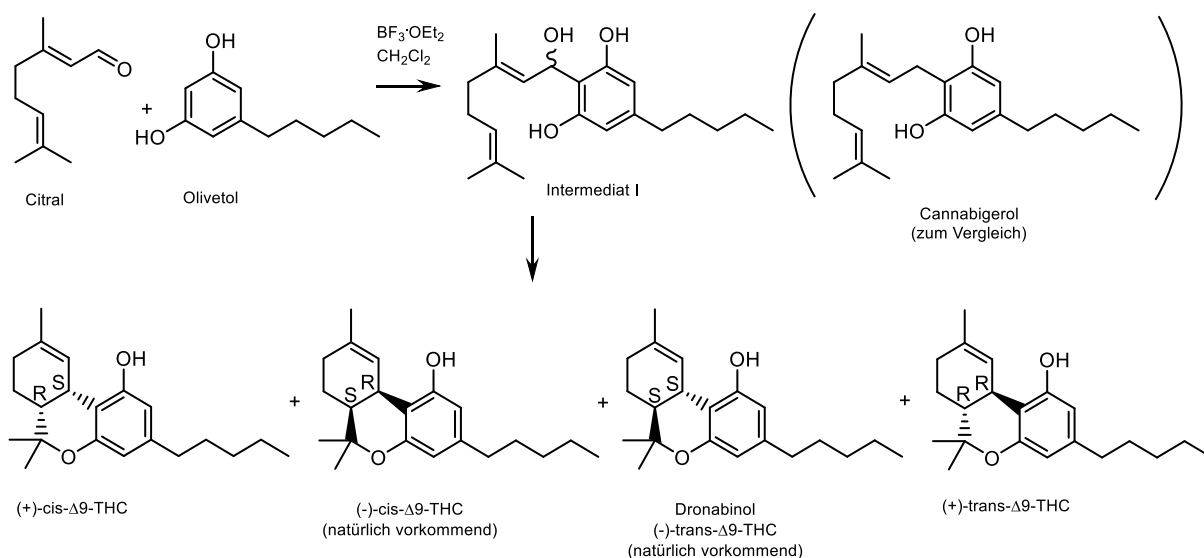


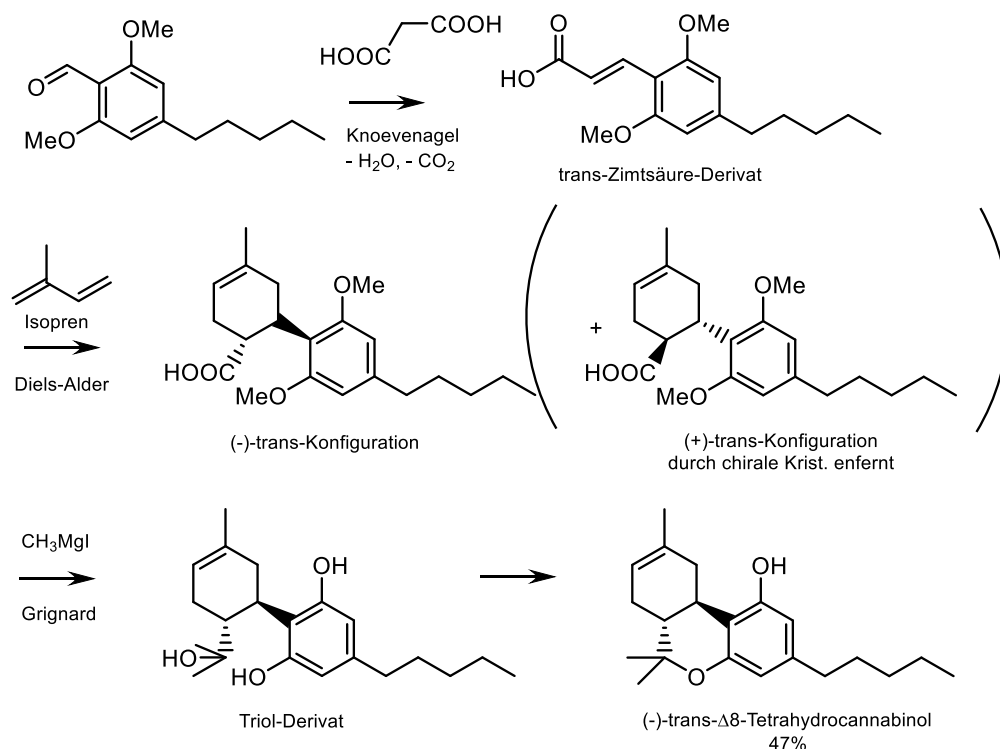
Abb. 20: Synthese von  $\Delta^9$ -THC-Derivaten aus Citral nach Mechoulam et al.<sup>75</sup>

### 1.2.3.2.5 Isopren

Abschließend sei noch der zu obiger Synthese etwas abweichende Syntheseweg von Jen et al. mittels Diels-Alder-Reaktion erwähnt.<sup>78</sup>

Mit dem über eine Knoevenagel-Reaktion zugänglichen trans-Zimtsäure-Derivat wird durch eine Diels-Alder-Reaktion mit Isopren das entsprechende Terpen-Gerüst generiert. Dabei ist zwar aufgrund der Stereospezifität der Reaktion die trans-Ringverknüpfung gewährleistet, allerdings entsteht das Racemat des Isomers (-)-trans- $\Delta^8$ -THC. Die Trennung der Enantiomeren erfolgt mittels fraktionierter Kristallisation mit (+)-1,1'-Naphthylethylamin.

Abschließend wird mittels Grignard-Reagenz O-demethyliert sowie die tertiäre Alkohol-Gruppe generiert. Der Ringschluss des entstehenden Triol-Derivates führt zum (-)-trans- $\Delta^8$ -THC (Abb. 21). Die Isomerisierung zu Dronabinol könnte wie unter 1.2.3.2.2 vollzogen werden.



**Abb. 21:** Synthese von (-)-trans- $\Delta$ 8-THC durch Diels-Alder-Addition nach Jen et al.<sup>78</sup>

Auch in der neueren Literatur werden derartige Diels-Alder-Reaktionen zur Herstellung von Cannabinoid-Strukturen beschrieben.<sup>79,80,81</sup>

Weitere THC-Derivate wurden jüngst von Gläser et al. vorgestellt. Auch hier spielt die Diels-Alder-Reaktion eine Rolle.<sup>82,83</sup> Unter den heute existierenden industriellen Rahmenbedingungen ist diese Synthesevariante wie die vorgenannten eher von akademischem Interesse.

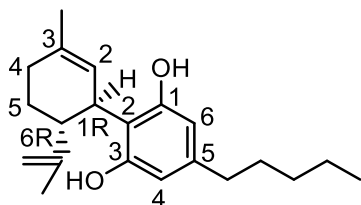
### 1.2.3.2.6 Stereodivergente Synthese

Jüngst haben Schaffroth et al. mit einer stereodivergenten Synthese einen gleichzeitigen Zugang zu Dronabinol und dessen Stereoisomeren eröffnet. Zwar waren auch zuvor schon enantioselektive Darstellungen von Dronabinol beschrieben worden, jedoch gewährleistet die Vorgehensweise von Schaffroth den Zugang zu (-)- $\Delta$ 9-cis-THC, das neben dem (-)- $\Delta$ 9-trans-THC in natürlicher Form nur in sehr geringen Mengen vorkommt.<sup>84</sup> Der Einsatz von zwei chiralen Katalysatoren (Phosphor-Olefin-Komplex und Di- $\mu$ -chlorobis[(1,2,5,6- $\eta$ )cycloocta-1,5-dien]diiridium) schließen die Nutzung zur wirtschaftlichen Herstellung von Dronabinol jedoch beim jetzigen Stand der Technik aus.

### 1.3 Cannabidiol (CBD)

CBD ist – wie Dronabinol – durch die Lage seiner Stereozentren charakterisiert. Die hier verwendete Abkürzung CBD wird ausschließlich für (–)-trans-Cannabidiol verwendet. CBD kann einerseits als eigenständiger Wirkstoff betrachtet werden und ist andererseits die Schlüsselsubstanz für eine effiziente Synthese von Dronabinol. Gemäß der IUPAC-Nomenklatur wird es als 2-[(1R,6R)-3-Methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzen-1,3-diol bezeichnet. Diese Bezeichnung verwendet die Benzopyran-Nomenklatur. CBD kommt nur in geringen Mengen in *Cannabis* vor. Dabei ist CBD „das wichtigste nicht-psycho trope Cannabinoid [...] Es ist kein Cannabinoid-Rezeptor-Agonist.“<sup>1</sup>

Die Summenformel lautet  $C_{21}H_{30}O_2$ . Die molare Masse beträgt 314,5 g/mol.



**Abb. 22:** (–)-trans-CBD nach der IUPAC-Nomenklatur mit den Stereozentren 1R und 6R

CBD ist bei 20 °C und 1013 hPa kristallin und wird vom Deutschen Arzneimittel-Codex (DAC) als ein „weißes bis fast weißes Pulver“ beschrieben. In Ethanol (96%), Ether und Methanol ist es leicht löslich, in Wasser praktisch unlöslich. Seine Schmelztemperatur liegt bei 65–69 °C.<sup>85</sup>

#### 1.3.1 Regulatorische Einordnung

CBD fällt in Deutschland nicht unter die Regelungen des BtMG. Allerdings ist zu beachten, dass bei der Herstellung von CBD Tetrahydrocannabinole (z. B.  $\Delta^9$ -THC oder  $\Delta^8$ -THC) als Verunreinigungen vorkommen können. Da das BtMG in Anlage I (zu § 1 Abs. 1) nur eine Obergrenze für Tetrahydrocannabinole, für *Cannabis sativa*, nicht aber für synthetisch hergestellte Cannabinoide angibt, ist eine analoge Betrachtung zur Wahrung der Gleichbehandlung sinnvoll. Demnach ist „*Cannabis* (Marihuana, Pflanzen und Pflanzenteile der zur Gattung *Cannabis* gehörenden Pflanzen) ausgenommen [...] b) wenn sie aus dem Anbau in Ländern der Europäischen Union mit zertifiziertem Saatgut von Sorten stammen, die am 15. März des Anbaujahres in dem [...] genannten gemeinsamen Sortenkatalog für

landwirtschaftliche Pflanzenarten aufgeführt sind, oder ihr Gehalt an Tetrahydrocannabinol 0,2 Prozent nicht übersteigt und der Verkehr mit ihnen (ausgenommen der Anbau) ausschließlich gewerblichen oder wissenschaftlichen Zwecken dient, die einen Missbrauch zu Rauschzwecken ausschließen.“ Es wäre empfehlenswert, eine entsprechende Regelung für synthetische Cannabinoid-Derivate in das BtMG aufzunehmen.

Pacifico et al. konnten ein Maximum von 4,37% (m/m) an CBD in einem Experiment mit drei Varietäten von *Cannabis* detektieren.<sup>86</sup> Die drei getesteten Varietäten gehörten jeweils zu einem der Hauptchemotypen (I, II und III). Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Ergebnissen von Hanus und Subova, die ein Maximum von ca. 4% (m/m) in der Trockenmasse der Varietät *Rastislavice* fanden.<sup>87</sup>

Small und Beckstead beschreiben die Chemotypen wie folgt: „Chemotyp I ist der ‚Drogen-Typ‘, mit einem THC-Gehalt von über 0,30% der Trockenmasse und einem CBD-Gehalt von unter 0,50% (z. B. mit einem kleinen Verhältnis von CBD zu THC). Chemotyp II, der ‚Intermediär-Typ‘, enthält sowohl CBD als auch THC in nahezu äquivalenten Mengen (typischerweise 0,5–2%); Chemotyp III, der ‚Faser-Typ‘, hat hauptsächlich CBD und einen Gehalt von unter 0,30% an THC (häufig unter der Detektionsgrenze).“<sup>88</sup>

Schon diese Beschreibung zeigt die Unschärfe der Berechnungen aus Pflanzenmaterial, die zu den bereits bei Dronabinol genannten Nachteilen der Gewinnung aus Pflanzenmaterialien hinzukommt.

Hanus und Subova geben weiterhin ein Verhältnis von 2,76:4,41 von Frisch- zu Trockenmaterial an. Der Mittelwert (MW) kann demnach mit 3,56 kalkuliert werden. Obwohl die „Extrahierbarkeit von frischem und trockenem Drogenmaterial nicht mit dem Verhältnis zwischen der Masse von beiden korreliert“<sup>87</sup>, kann daraus eine Näherung berechnet werden:

$$\text{CBD Gehalt frisch} = \frac{\text{CBD Gehalt trocken}}{3,56} = \frac{4}{3,56} = 1,12\%$$

Daher kann man ermessen, dass für eine Menge von 1 kg CBD – bei idealer (100%iger) Extraktion – 89,3 kg frisches Pflanzenmaterial benötigt werden. Riegler-Nurscher schätzt den Ertrag an frischem Pflanzenmaterial aus industriell verwendetem *Cannabis*, der durch Maschinen gerntet werden kann, auf 300 kg pro Hektar.<sup>89</sup> Für die industrielle Gewinnung von CBD bedeutet das, dass für 100 kg CBD ca. 8930 kg frisches Pflanzenmaterial benötigt



---

werden. Um dieses anzupflanzen, wären  $8930 \text{ kg} \div 300 \text{ kg/ha} = 29,77 \text{ ha}$  notwendig; diese Fläche entspricht 41,7 Fußballfeldern.

Betrachtet man diesen Landverbrauch, so wird klar, dass eine wirtschaftliche Gewinnung von synthetischen Cannabinoiden über die Zwischenstufe CBD auch aus ökologischer Perspektive sinnvoll ist. Selbst wenn die entstehende Biomasse als Seitenstrom eine sinnvolle Verwendung finden könnte – was nach Zerkleinerung und Extraktion unwahrscheinlich erscheint –, bliebe es dennoch bei der Notwendigkeit des Einsatzes von immensen Mengen von Lösungsmitteln und vor allem Adsorbentien zur chromatographischen Reinigung des Vielstoffgemisches. Der Energieeintrag zur Konzentrationssteigerung und zur späteren Reinigung des Lösungsmittels wäre entsprechend hoch.

### 1.3.2 Synthese

Schon 1950 schrieb Loewe: „Cannabidiol, das im Haschischharz höchstens in kleiner Menge vorkommt, wurde von Adams 1940 in Extrakten aus frischen Ernten nordamerikanischen Hanfs als ähnlich bedeutender Anteil (33 %) des Rohöls entdeckt, als Menthadienylolivetol identifiziert und synthetisiert.“<sup>60</sup>

Durch den in 1.2.3.1 beschriebenen zweiten Schritt der Synthese (von Dronabinol) wird CBD als Schlüsselintermediat hergestellt.

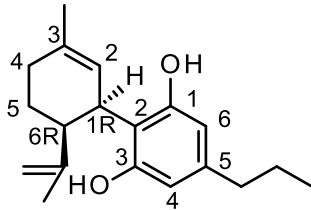
Petrzilka et al. beschreiben die „Synthese von Haschisch-Inhaltsstoffen“. Darin werden die absolute Konfiguration von (–)-trans-CBD sowie die Synthese von CBD-Carbonsäureestern und daraus gewonnenem isomerenreinen (–)-trans-CBD beschrieben (Abb. 13 und Abb. 14).<sup>68</sup>

In der Literatur sind weitere Synthesevarianten beschrieben. Sie haben alle gemeinsam, dass sie CBD als wesentliches Intermediat für die Synthese von THC bzw. Dronabinol verwenden. Hervorhebenswert ist das bereits beschriebene Verfahren von Crombie et al.<sup>70</sup> (Abb. 15), das z. B. in den Patentschriften von Herlt et al.<sup>91</sup> und Steup et al.<sup>92</sup> als Grundlage dient.

## 1.4 Cannabidivarin (CBDV)

Auch CBDV kann wie CBD und Dronabinol durch die Lage seiner Stereozentren näher definiert werden. Die hier verwendete Abkürzung CBDV wird ausschließlich für (–)-trans-Cannabidivarin verwendet, welches nach der IUPAC-Nomenklatur als 2-[(1R,6R)-

6-Isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl]-5-propyl-benzen-1,3-diol bezeichnet wird. Diese Bezeichnung verwendet die Benzopyran-Nomenklatur, die eigentlich für die Nummerierung des 3-Ring-Systems verwendet wird.



**Abb. 23:** (-)-trans-CBDV nach der IUPAC-Nomenklatur

Die Summenformel lautet  $C_{19}H_{26}O_2$ . Die molare Masse beträgt 286,6 g/mol.

CBDV ist bei 20 °C und 1013 hPa eine weiße bis gelbliche kristalline Substanz. Die spezifische Drehung beträgt laut Literatur  $[\alpha]_D^{20,0} = -139,5^\circ$  ( $CHCl_3$ ).<sup>93</sup>

### 1.4.1 Regulatorische Einordnung

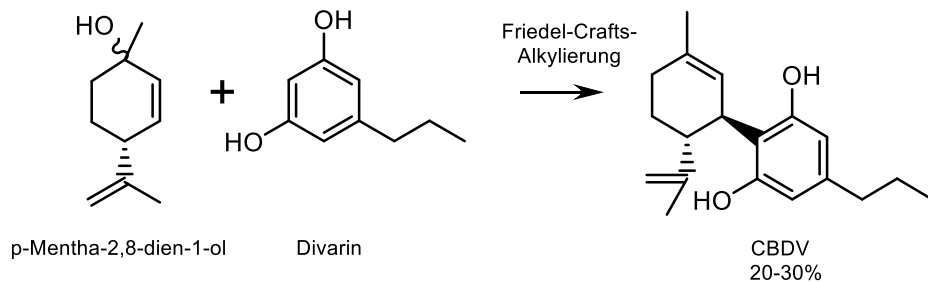
CBDV unterscheidet sich von CBD strukturell nur dadurch, dass es an der phenolischen Komponente des Moleküls eine Propyl- statt einer Pentylgruppe besitzt. Mangels halluzinogener Wirkung fällt CBDV als reine Substanz nicht unter das BtMG. Der Stoff kann aus *Cannabis ssp.* isoliert werden.

Wichtige Erkenntnisse zur genetischen Regulierung und Bildung des Mengenverhältnisses der Cannabinoide innerhalb der biologischen Genese in der Pflanze stammen von Meijer et al. und wurden zusammengefasst von Pertwee<sup>9</sup>. Ausgehend von Resorcyllsäuren werden in der Pflanze entweder Olivetolsäure oder Divarinsäure gebildet und mit Geranylphosphat enzymatisch gekoppelt (Abb. 24). Die beiden genetisch verankerten Biosynthesewege (Cannabigerolsäure(CBGA)-Weg und Cannabigerovarinsäure(CBGVA)-Weg) resultieren in einem durch Züchtung beeinflussbaren Gleichgewicht, das vermutlich wegen der Präferenz der Synthese für Substrate mit einem  $C_5$ -Rest in Wildtypen zugunsten des Cannabidiolsäure (CBDA)/Tetrahydrocannabidiolsäure(THCA)/Cannabichromensäure(CBCA)-Aster verschoben ist. Ein bestimmter Chromosomenabschnitt im Genom der Pflanze (Locus 0) determiniert, ob Cannabinoide gebildet werden. Ein weiterer Locus ( $A^n$ ) liegt in mehreren genetischen Varianten vor und definiert das Verhältnis der Homologe (die sich nur durch den Alkylrest unterscheiden). Schließlich kontrollieren Wildtyp-Allele (Locus  $B^n$ ), in welchem



## 1.4.2 Synthese

Im selben Jahr (1969), in dem Petrzilka et al. die Synthese von CBD beschrieben haben, isolierten Vollner et al. CBDV aus Haschisch durch Ligroin-MeOH-H<sub>2</sub>O-Extraktion und nachfolgende Reinigung mittels Kieselgel.<sup>93</sup> Weiterhin schlagen Vollner et al. eine Synthese analog derjenigen von Petrzilka et al. vor. Beide nennen Ausbeuten von ca. 20–30% (Abb. 25).



**Abb. 25:** Synthese von (–)-trans-CBDV aus Menthadienol und Divarin nach Vollner et al.<sup>93</sup>

Auch Crombie et al. beschreiben die Synthese von CBDV im Miniaturmaßstab als Kondensation von Divarin mit Menthadienol.<sup>94</sup>

## 1.5 Marktübersicht

Die Kosten für Wirkstoffe (engl. active pharmaceutical ingredients, APIs) aus der Gruppe der Cannabinoide sind hoch. Gründe dafür sind die begrenzte Verfügbarkeit und die aufwendige Gewinnung aus *Cannabis*-Pflanzen. Darüber hinaus erhöhen die regulatorischen Einschränkungen, die aus dem Status als Betäubungsmittel resultieren, den Aufwand in puncto Dokumentation und Handhabung, was die Kosten für den pharmazeutischen Hersteller weiter steigert.

Neben den üblichen Kosten für die klinische Erprobung sind die hohen Herstellungskosten der Grund, warum sich die Wirkstoffgruppe der Cannabinoide bisher nur in wenigen Märkten als Fertigarzneimittel finden lässt. In manchen Ländern (z.B. Italien, Österreich und Deutschland) sind Cannabinoide als Rezepturarzneimittel stärker verbreitet als Fertigarzneimittel.

In Deutschland belaufen sich die Kosten von Dronabinol-haltigen Rezepturarzneimitteln bei einer mittleren Dosierung von 10–15 mg pro Tag auf etwa 250–400 Euro pro Monat. Der

---

Abgabepreis für 10 ml ölige Dronabinol-Tropfen (2,5%), die nach den Vorschriften des Neuen Rezeptur-Formulariums hergestellt werden, beträgt knapp 210 Euro. Er errechnet sich derzeit wie folgt: Einkaufspreis der Rezeptursubstanz (90 Euro) + 90 % Rezepturaufschlag + 5 Euro Anfertigung der Lösung + Mehrwertsteuer + 0,26 Euro BtM-Gebühr.<sup>60</sup>

Der Markt für Cannabinoide ist zudem stark von dem politischen Willen geprägt, die Wirkstoffgruppe einer größeren Patientenzahl zugänglich zu machen. Die Liberalisierung der Märkte und die intensive Beforschung von Wirkstoffen aus *Cannabis ssp.* haben zum sogenannten „Green Rush“ in den Vereinigten Staaten geführt. Obwohl es mit Marinol<sup>®</sup> und Sativex<sup>®</sup> bereits zugelassene Fertigarzneimittel gibt, die Cannabinoide enthalten, befindet sich der Markt immer noch in einem sehr frühen Stadium. Dieses ist gekennzeichnet durch eine geringe Verfügbarkeit von qualitativ hochwertigen und eindeutig definierten Wirkstoffen, die gleichzeitig sehr hochpreisig sind. Gleiches gilt für die Verabreichungsformen, die teilweise zu unberechenbaren Nebenwirkungen führen können. Zum Beispiel wird CBD aus recht fragwürdigen Quellen meist in öligen Lösungen zur peroralen Einnahme als Nahrungsergänzungsmittel, aber auch zur Inhalation mittels Vaporisatoren oder als Lösung zur Verdampfung in elektronischen Zigaretten angeboten. Insbesondere bei letzterer Verabreichungsform ist durch die Einwirkung von Hitze eine Cyclisierung zu THC nicht auszuschließen.

Die Goldgräberstimmung von Risikokapitalunternehmen, die meist über sehr begrenztes Know-how in diesem Bereich verfügen, konzentriert sich auf die Züchtung von *Cannabis*-Varietäten mit einem hohen Gehalt an Cannabinoiden. Meist zielt deren regulatorische Strategie auf den „recreational use“ (dt. Freizeitnutzung) von Cannabinoiden ab. Von einem pharmazeutischen Standpunkt aus betrachtet handelt es sich dabei um Missbrauch von sedativ oder halluzinogen wirksamen Komponenten der Pflanze. Dieser „grüne Goldrausch“ führt zu der Erwartung, dass der Markt im Jahr 2020 rund 22 Milliarden US-Dollar wert sein wird. Der Markt, der sich aus der medizinischen Verwendung von Cannabinoiden ergeben wird, wird auf ca. 12 Milliarden US-Dollar im Jahr 2020 geschätzt.<sup>95</sup>

Die Firmen, die ernsthafte Forschung im Bereich der Cannabinoide betreiben, haben realisiert, dass Wettbewerbsfähigkeit nur durch die folgenden Faktoren erreicht werden kann:

- Verlässliche Versorgung mit dem API
- Gleichbleibende Qualität

- Hohes Sicherheitsprofil (verlässliche Spezifikation, definierter Gehalt des API sowie seiner Verunreinigungen)
- Freisein von Pestiziden und undefinierten Verunreinigungen
- Herstellung in einem nachhaltigen Produktionsprozess, der weder auf großen Mengen an Biomasse noch auf dem Einsatz von entsprechend großen Mengen an Synthese- und Extraktionshilfsstoffen (z. B. organischen Lösungsmitteln) beruht

---

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist es, einen effizienten Zugang zu cannabinoiden Stoffe und Verfahren zu deren Herstellung insbesondere für Dronabinol, CBD und CBDV zu entwickeln. Dabei hat sich die eindeutige Festlegung der Stereochemie als eine der größten Herausforderungen ergeben. Verfolgt werden hier die Verbesserung der Ausbeuten durch ein innovatives Verfahren sowie die gleichzeitige Limitierung oder Abtrennung von im BtM-rechtlichen Sinne relevanten Nebenprodukten (z.B.  $\Delta^8$ -THC oder Exo-THC syn. (6aR, 10aR)-6,6-Dimethyl-9-methylene-3-pentyl-6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol) und toxikologisch relevanten Verunreinigungen.

Außerdem sollen weitere Cannabinoide hergestellt und ihre Affinität und Funktion an CB1- und CB2-Rezeptoren sowie ihre Wirkung in Zellsystemen untersucht werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Cannabidiol

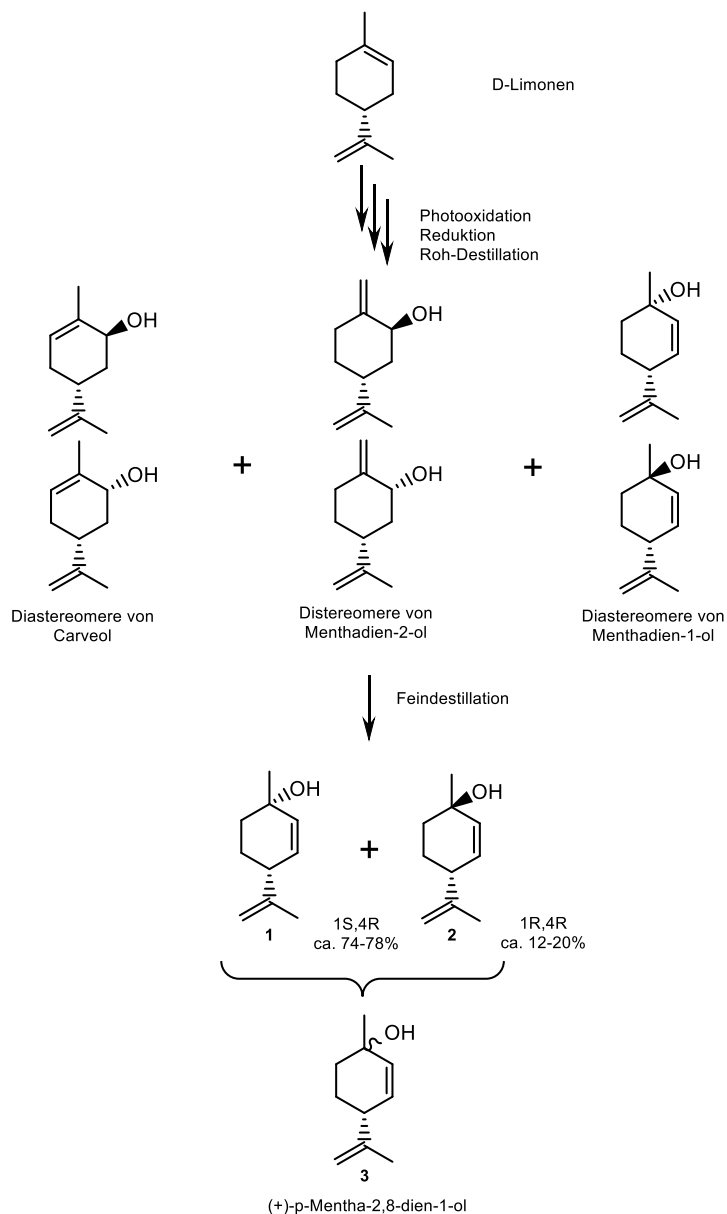
Aufbauend auf Petrzilka et al.<sup>68</sup> und Crombie et al.<sup>70</sup> konnte CBD durch kontinuierliche Synthese in drei Schritten aus Menthadienol G und Olivetolmethylester (OM) hergestellt werden.

Für CBD und seine Ausgangsstoffe benennt kein offizielles Kompendium eine Analyseverfahren. Jüngst erschien im DAC eine Monographie, die einen entsprechenden Satz an Methoden vorschlägt. Da diese zum Beginn dieser Arbeit jedoch noch nicht vorlag, wurden praktikable Methoden entwickelt (6.1.1.1.1, Methoden A, B, C).

#### 3.1.1 Menthadienol G

Für die Synthese von CBD wurde Menthadienol G verwendet. (+)-1S,4R- (**1**) und (+)-1R,4R-p-Mentha-2,8-dien-1-ol (**2**) (IUPAC: (1S,4R)-4-Isopropenyl-1-methyl-cyclohex-2-en-1-ol und (1R,4R)-4-Isopropenyl-1-methyl-cyclohex-2-en-1-ol) können durch Photooxidation von D-Limonen und nachfolgende Feindestillation hergestellt werden (Abb. 26).





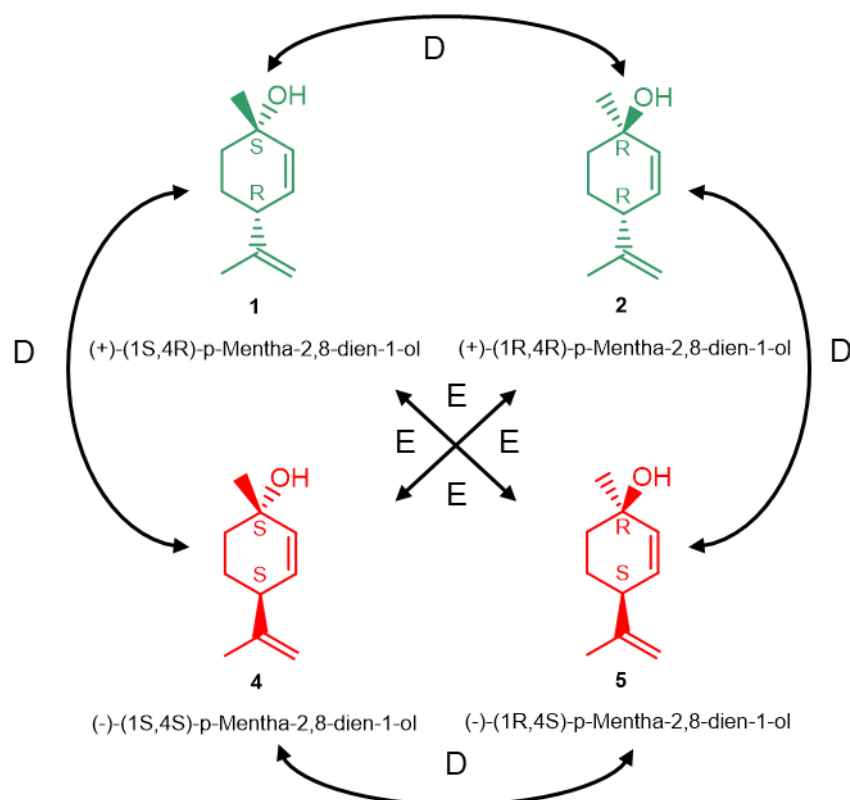
**Abb. 26:** Synthese von (+)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol aus D-Limonen

Die (+)-Isomeren werden dabei im Überschuss erhalten. Menthadienol G hat einen Gehalt von 97% (+)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol (**3**). Bei Normalbedingungen liegt es als transparente bis leicht gelbliche Flüssigkeit vor.

(+)-Menthadienol ist (+)-trans bzw. (+)-cis. Das Chiralitätszentrum an Position 4 ist R-konfiguriert, was von entscheidender Bedeutung für die spätere Synthese von (-)-trans-Cannabidiol und Dronabinol ist. Das Chiralitätszentrum muss über alle weiteren Schritte der Synthese erhalten bleiben.

Bei der Kondensation mit OM wird das Chiralitätszentrum an Position 1 unter Abspaltung von Wasser eliminiert. Das Verhältnis von (+)-trans- (**2**) zu (+)-cis-Menthadienol (**1**) in der eingesetzten Mischung ist daher nicht von Bedeutung.

In Abb. 27 sind die möglichen Enantiomere und Diastereomere von Menthadienol dargestellt.



**Abb. 27:** Stereochemie von Menthadienol; E: Enantiomer, D: Diastereomer

Um auszuschließen, dass es bei der Herstellung von (+)-Menthadienol zur Entstehung von weiteren Diastereomeren oder zu einer Verschiebung des Enantiomeren-Gleichgewichts kommt, wurden die Isomere gezielt hergestellt und mittels chiraler GC untersucht. Das eingesetzte (+)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol (**3**) wird aus D-Limonen mit einem Gehalt von  $\geq 97\%$  hergestellt. In vorhergehenden Arbeiten wurde bei Symrise nachgewiesen, dass es nicht zu einer Racemisierung während des Produktionsprozesses kommt. Dazu wurde (-)-Menthadienol (bestehend aus **4** und **5**) aus L-Limonen hergestellt. Die Enantiomerenverhältnisse entsprachen denen der eingesetzten Ausgangsstoffe D-Limonen und L-Limonen.<sup>96</sup>

Darauf aufbauend wurde aus L-Limonen (-)-Menthadienol hergestellt. Der Ausgangsstoff L-Limonen hatte eine Enantiomeren-Reinheit von 92%, enthielt also noch 8% D-Limonen.

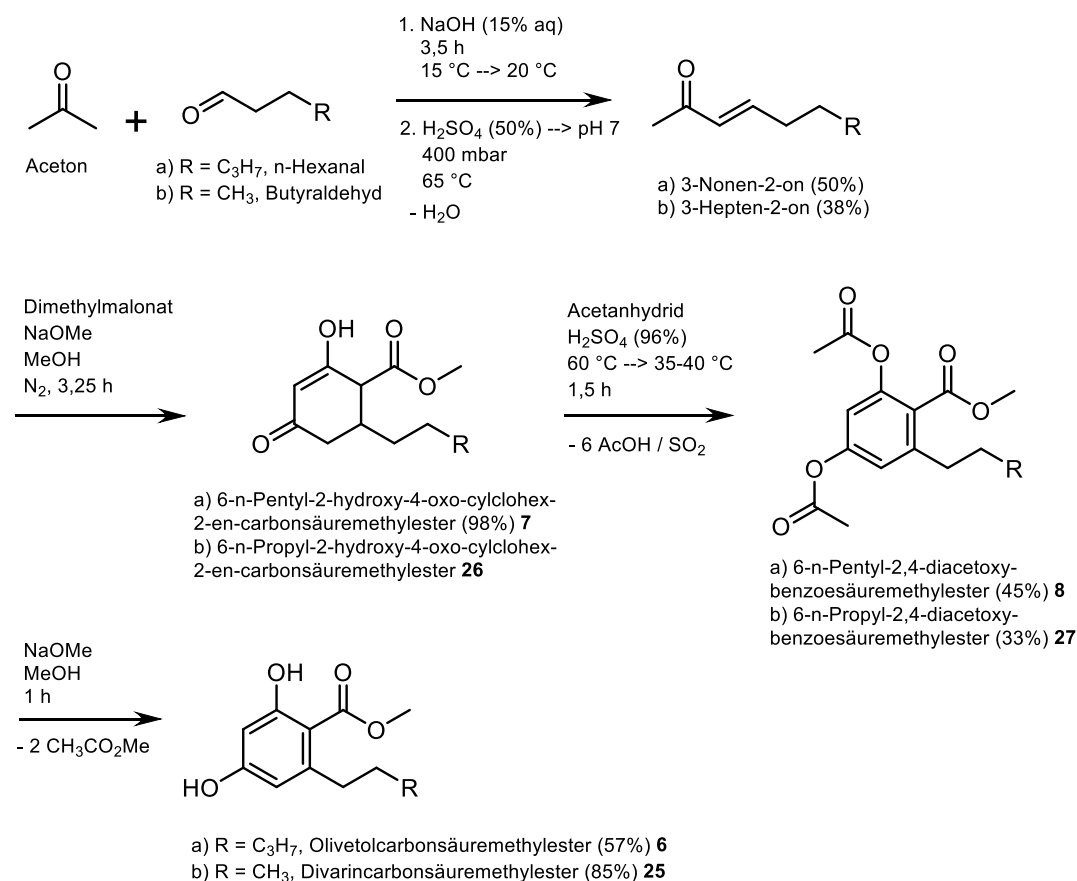
Die mittels Photooxidation hergestellten Menthadienole waren daher anteilig mit den entsprechenden an Position 4 (R)-konfigurierten Diastereomeren verunreinigt. Aus einer Mischung der Enantiomere wurden die Retentionszeiten auf einer chiralen Säule (Cyclodextrinsäule) bestimmt (Abb. 103).

Die GC-Analyse von Menthadienol G zeigte, dass **4** und **5** nur in Spuren enthalten sind (Abb. 104). Die Stereochemie für die Folgeprodukte ist damit eindeutig festgelegt.

### 3.1.2 Olivetolcarbonsäuremethylester

Für die Synthese von (-)-trans-CBD wurde OM (**6**) verwendet. OM wurde in einer vierstufigen Synthese<sup>97</sup> hergestellt: Zunächst wird n-Hexanal in einer Aldolkondensation mit Aceton zu 3-Nonen-2-on umgesetzt.<sup>98</sup> Dieses wird in einer Esterkondensation mit Dimethylmalonat zum Dihydro-Derivat (**7**) cyclisiert, welches anschließend mit Acetanhydrid und Schwefelsäure zum Diacetat (**8**) oxidiert wird. Danach wird mit Natriummethanolat in MeOH umgeestert, wodurch man Olivetolcarbonsäuremethylester (**6**) erhält (Abb. 28). Die Kristallisation ist aus Cyclohexan möglich. Bei Normalbedingungen liegt OM als nahezu farblose bis leicht gelblich kristalline Substanz vor.

Die Synthese des Esters beinhaltet zwei wesentliche Modifikationsmöglichkeiten. Zum einen kann der Ester an C<sub>6</sub> variiert werden; auf diese Weise konnten neue CBD-Derivate (**31–36**) synthetisiert werden (siehe Kap. 3.4). Zum anderen kann die Länge der aliphatischen Kette an C<sub>5</sub> des Resorcin-Derivates variiert werden; dies wurde zur Synthese von Divarincarbonsäuremethylestern, aus denen CBDV (siehe Kap. 3.3) und neue CBDV-Derivate (**37–39**) (siehe Kap. 3.4) synthetisiert wurden, genutzt.



**Abb. 28:** Vierstufige Synthese von Olivetolcarbonsäuremethylester und Divarincarbonsäuremethylester im Labormaßstab

### 3.1.3 Kontinuierliche Synthese von Cannabidiol

Das Verfahren zur Herstellung von CBD stellt besondere Anforderungen an:

- I. Die räumliche und zeitliche Zusammenführung der Edukte: Mindestens eine Eduktkomponente (oder der Katalysator) muss kurzfristig und vollständig dem Syntheseansatz zugeführt werden. Hierbei muss die Zugabezeit deutlich kürzer als die Reaktionszeit von einer Minute ausfallen. Analoge Bedingungen sind beim schnellen Abbruch der Reaktion erforderlich: Eine Quenchlösung muss nach einer Minute schnell und vollständig zudosiert werden.
- II. Die rasche, vollständige Durchmischung: Die Eduktvolumina müssen möglichst unverzüglich und vollständig durchmischt werden. Bei inhomogener Durchmischung ist andernfalls in einzelnen Volumenbereichen des Reaktionsgefäßes die Reaktion bereits beendet und führt zur Bildung von Folgeprodukten, während in anderen

---

Bereichen der Reaktionsmischung die Edukte noch nicht zusammengeführt wurden („Hot Spot“-Phänomen).

- III. Die Konzentration der Reaktanden im Lösungsmittel und das Lösungsmittel, in dem die Reaktion durchgeführt wird: Es sollte aus Gründen der Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit eine geringe Menge an Lösungsmittel angestrebt werden.
- IV. Die Art des Katalysators: Der Katalysator oder Katalysator-Komplex sollte zu einem kontrollierbaren Verunreinigungsprofil führen. Er sollte gleichzeitig im Produktionsprozess sicher zu handhaben und wirtschaftlich einsetzbar sein.

Zieht man diese Punkte in Betracht, so war im Batch-Prozess mit der vermehrten Bildung von Nebenprodukten (bei ungenügendem Umsatz) und einer schlechten Raum-Zeit-Ausbeute zu rechnen. Um die Punkte I und II zu lösen, wurde eine Reaktionsführung in einem kontinuierlichen Verfahren erarbeitet und im Rahmen dieser Arbeit optimiert.

Die bekannten Schwächen des Prozesses lassen sich umgehen, indem die Reaktion von der „Ein-Topf-Reaktion“ in ein Durchflusssystem übertragen wird. Hierdurch wird prinzipiell die Koordinate „Reaktionsdauer“ aus der Zeitdimension in eine Raumkoordinate verlegt. Das heißt, die Länge eines Reaktionsrohres und das Dosiervolumen der Pumpen bestimmen die Reaktionsdauer. Die mittlere Reaktionszeit  $t_M$  ist über das definierte Volumen des Reaktionsrohres und das Dosiervolumen, das durch die Pumpen gesteuert wird, einstellbar.  $t_M$  berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$t_M = \frac{\text{Volumen Reaktionsrohr } (\pi r^2 \cdot L)}{\text{Dosiervolumen}}$$

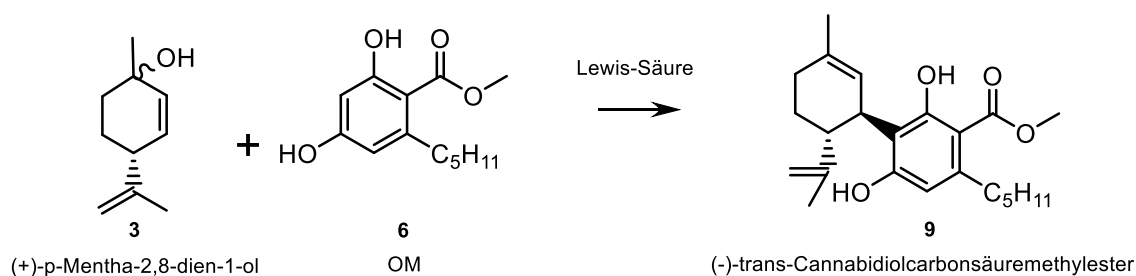
Wobei  $L$  [cm] die Länge des Rohres darstellt und das Dosiervolumen in  $\text{cm}^3/\text{min}$  angegeben wird.

Gleichzeitig kann das Reaktionsvolumen verkleinert werden, was die limitierenden Transportphänomene mindert: Pro Zeiteinheit müssen geringere Substanzmengen transportiert werden, und die zu mischenden Volumina sind kleiner.

Die Punkte III und IV wurden aus wirtschaftlichen Gründen (Erhöhung der Ausbeute) und aus Gründen der Nachhaltigkeit untersucht.

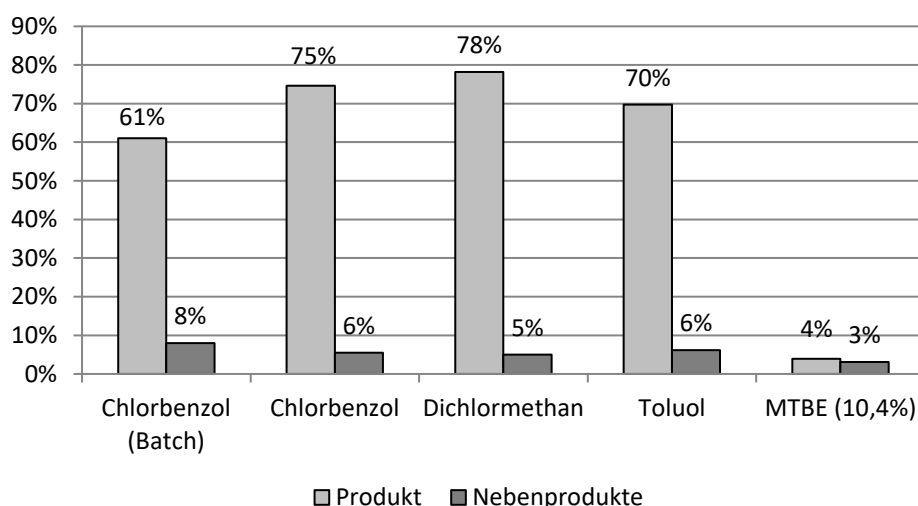
### 3.1.4 Synthese und Definition der Reaktionsparameter

Im ersten Schritt erfolgte durch Kupplung von (+)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol mit OM unter Katalyse einer Lewis-Säure die Herstellung von (-)-trans-Cannabidiolcarbonsäuremethylester (**9**). Die Reaktion stellt eine Friedel-Crafts-Alkylierung dar.



**Abb. 29:** Synthese von (-)-trans-Cannabidiolcarbonsäuremethylester aus (+)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol und OM

Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Lösungsmitteln, aber identisch konzentrierten Eduktströmen, identischem Katalysator und gleicher Temperatur durchgeführt (ca. 4 % (m/m) Edukte, BF<sub>3</sub>-Etherat, Raumtemperatur). Abb. 30 zeigt, dass die Synthese in Batch-Führung klar unterlegen ist. Die Synthese in Dichlormethan weist die höchste Ausbeute und die geringste Menge an Nebenprodukten auf. Da es sich um orientierende Versuche handelte, wurden nur Nebenprodukte detektiert, die im UV-Spektrum ein Signal ergaben.



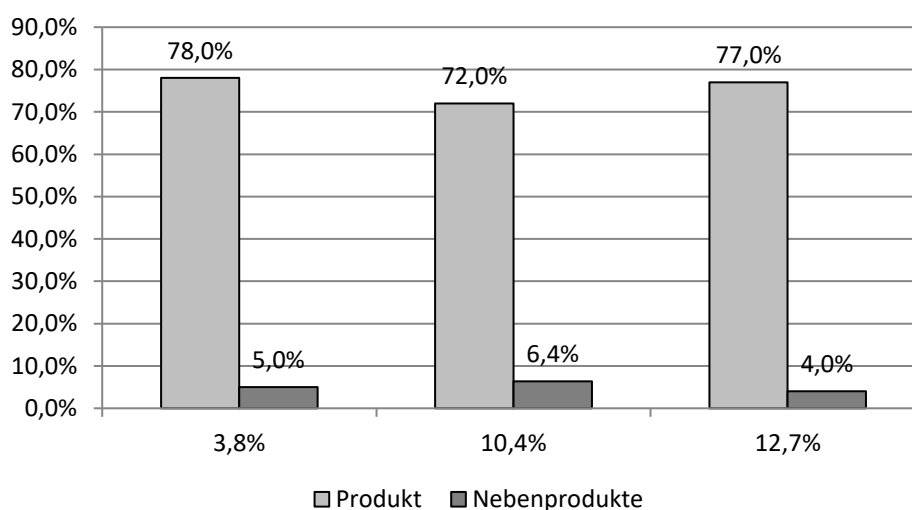
**Abb. 30:** Einfluss des Lösungsmittels auf die Ausbeute und die Entstehung von Nebenprodukten bei der Synthese von (-)-trans-Cannabidiolcarbonsäuremethylester

Für eine spätere Produktion hat Dichlormethan zwei wesentliche Nachteile: Erstens weist es als halogenierte Substanz ein kanzerogenes Potential auf, was generell gegen seine

Verwendung spricht. Zweitens hat Dichlormethan eine größere Dichte als Wasser, weshalb es sich nach Phasentrennung in wässrig-organischen Systemen im Abscheider unten befindet. Großtechnisch werden Wertstofffraktionen bevorzugt, die im Reaktor zur weiteren Bearbeitung belassen werden können (durch Ablassen der wässrigen Phase). Natürlich könnte man die Fraktion auch sammeln oder inverse Abscheider verwenden.

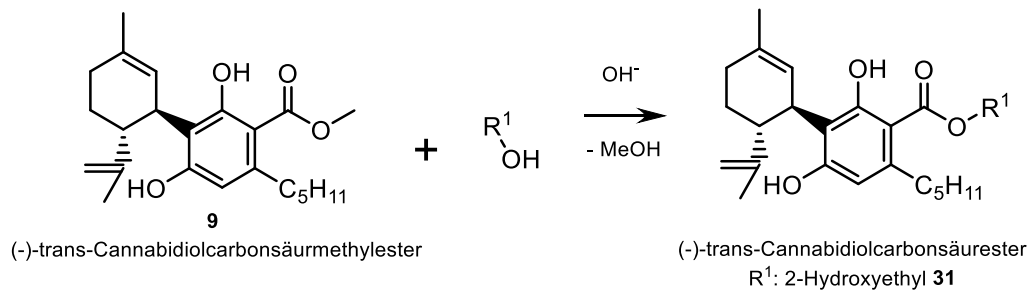
Toluol hat diese Nachteile nicht. Trotz etwas niedrigerer Ausbeute bietet es sich daher als Alternative an und wurde in der Optimierung näher betrachtet.

Parallel wurde die Konzentration von Menthadienol und OM in Dichlormethan erhöht, aber der Gesamtvolumenstrom konstant gehalten (6 ml/min). In Abb. 31 ist zu sehen, dass die Konzentration keinen wesentlichen Einfluss auf die Ausbeute und die Entstehung von Nebenprodukten bei der Synthese von (9) hat.



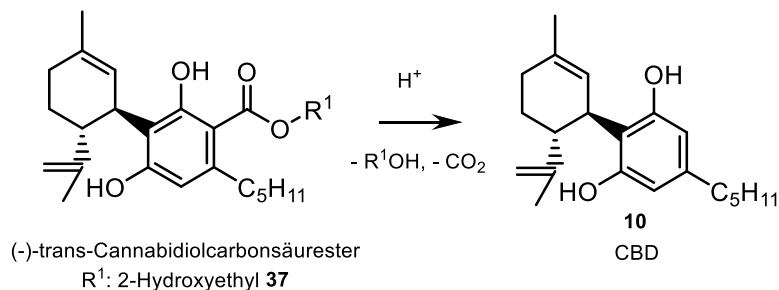
**Abb. 31:** Einfluss der Konzentration der Edukte auf die Ausbeute und die Entstehung von Nebenprodukten bei der Synthese von (-)-trans-Cannabidiolcarbonsäuremethylester

Im zweiten Schritt der Synthese konnten durch Umesterung neue Cannabinoide generiert werden (Abb. 32). Dazu wurde das Lösungsmittel abdestilliert und ein Überschuss des entsprechenden Alkohols zugegeben, mit dem (9) basisch zum jeweiligen Cannabidiolcarbonsäureester umgesetzt wurde. Ethylenglykol eignet sich besonders gut als Lösungsmittel, da es einen hohen Siedepunkt (197,3 °C) hat. Die Reaktionsparameter (Temperatur und Druck) wurden dergestalt optimiert, dass MeOH im Vakuum abdestilliert und somit das Gleichgewicht auf die Seite des Produktes verschoben wird.



**Abb. 32:** Synthese von (-)-trans-Cannabidiolcarbonsäureestern aus (-)-trans-Cannabidiolcarbonsäuremethylester durch Umesterung

Im dritten Schritt wurde aus dem gebildeten Cannabidiolcarbonsäureester durch alkalische Verseifung und Decarboxylierung schließlich CBD synthetisiert (Abb. 33).



**Abb. 33:** Synthese von CBD aus (-)-trans-Cannabidiolcarbonsäureestern

### 3.1.5 Optimierung der Reaktionsparameter

Die Reaktionsbedingungen für eine Reaktion in Chlorbenzol wurden aus den vorherigen Arbeiten übernommen: Gesamtfluss von 96 ml/min, Rührergeschwindigkeit 1100 U/min, Schlauchlänge 2,50 m (Austritt aus Reaktionszelle bis Einleitung in die NaHCO<sub>3</sub>-Lösung). Daraus ergibt sich eine mittlere Verweilzeit  $t_M$  von ca. 11 s nach folgender Formel:

$$t_{M(\text{Chlorbenzen})} = \frac{\text{Volumen Reaktionsrohr } (\pi r^2 \cdot L)}{\text{Dosiervolumen}} = \frac{0,071 \cdot 250 \text{ cm}^3}{96 \frac{\text{cm}^3}{\text{min}}} = 0,18 \text{ min}$$

Das Lösungsmittel wurde nach den Erfahrungen der Vorversuche auf Toluol umgestellt. Es zeigte sich, dass in Toluol eine geringfügig längere Reaktionszeit notwendig ist. Die mittlere Verweilzeit  $t_M$  betrug hier 12 s.

$$t_{M(\text{Toluol})} = \frac{0,071 \cdot 250 \text{ cm}^3}{89 \frac{\text{cm}^3}{\text{min}}} = 0,2 \text{ min}$$



Aufbauend auf Petrzilka et al.<sup>68</sup> und Crombie et al.<sup>70</sup> konnte so CBD durch kontinuierliche Synthese in drei Schritten aus OM und Menthadienol G mit einer Gesamtausbeute von ca. 41 % synthetisiert werden. Bei optimierten Bedingungen betrug die Reinheit von CBD, dessen Stereochemie durch Röntgeneinkristallstrukturanalyse eindeutig als 1R,6R (Abb. 34 und Abb. 35) bestimmt werden konnte, nach Kristallisation > 99 % (m/m). Vorteilhaft war dabei, dass Toluol anstatt eines chlorierten Lösungsmittels verwendet werden konnte. Weitere Vorteile sind die kurze Reaktionszeit und die Tatsache, dass die Synthese bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann. Die gemessenen spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur<sup>99,68</sup> überein (siehe 6.2.3).



Abb. 34: CBD-Kristall

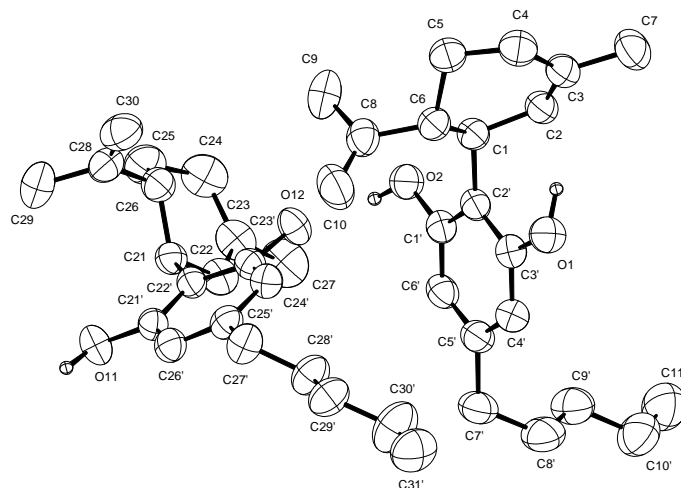
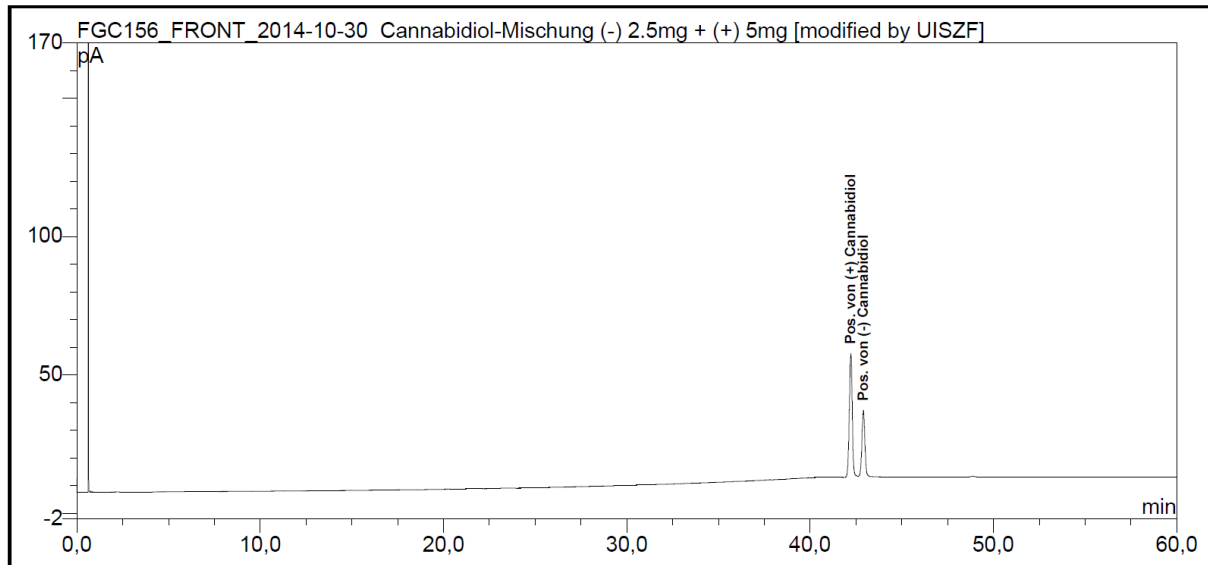


Abb. 35: Molekülstruktur von CBD mit zwei kristallographisch unabhängigen Molekülen gemäß Röntgeneinkristallstrukturanalyse. Wasserstoffatome mit Ausnahme der Hydroxylprotonen und der Wasserstoffatome an den Chiralitätszentren sind nicht abgebildet. Die anisotropen Auslenkungsparameter sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % dargestellt.

## Ergebnisse

Die absolute Konfiguration der beiden Stereozentren im CBD wurde aus den Intensitätsdifferenzen, die infolge der anomalen Dispersion auftreten, eindeutig bestimmt. Weitere Details zur Strukturanalyse sind Tab. 32 zu entnehmen.

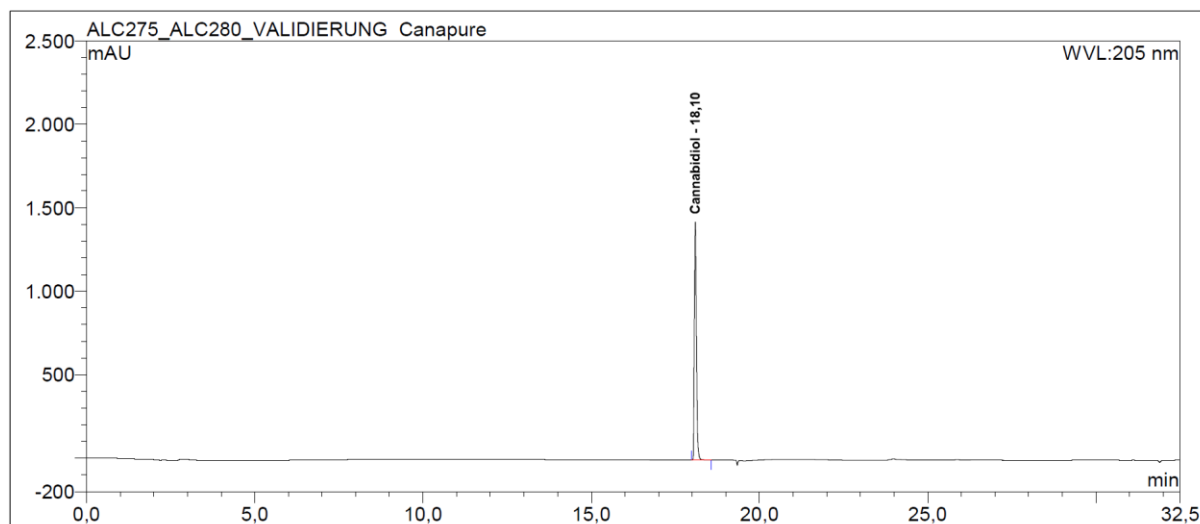
Die Stereochemie wurde mittels chiraler GC untersucht. Eine Lösung von (-)-CBD wurde zu diesem Zweck mit (+)-CBD gespikkt. Die Konfigurationen an C<sub>1</sub> und C<sub>6</sub> konnten durch den Vergleich mit (+)-trans-CBD als (-)-trans bewiesen werden (Abb. 36).



**Abb. 36:** GC-Chromatogramm von (-)-trans-CBD und (+)-trans-CBD

### 3.1.6 Verunreinigungsprofil

Nach der Kristallisation und Trocknung lag CBD in einem Gehalt von > 99% vor. Es ließ sich in einer HPLC-Untersuchung (Methode B) keine Verunreinigung detektieren (Abb. 37).

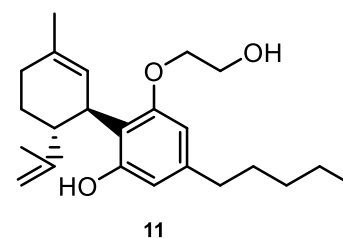


**Abb. 37:** HPLC-Chromatogramm von CBD

Über die Mutterlaugen der drei Synthesestufen ließen sich die folgenden potentiellen Verunreinigungen detektieren:

### **3-(2-Hydroxyethoxy)-2-[(1R,6R)-6-isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylphenol (11)**

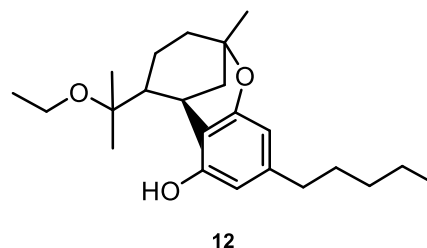
Bei einem von fünf Ansätzen im 2-mol-Maßstab kam es in Schritt 2 zu einer deutlichen Nebenproduktbildung. Das Nebenprodukt **11** war in den anderen vier Ansätzen mit 3 % (GC) zwar ebenfalls detektierbar, allerdings trat es nur im Dünnschichtverdampfer (DV)-Destillat eines Ansatzes mit einem Gehalt von > 30% nach GC und HPLC (Methode C) auf. Über präparative Säulenchromatographie konnte die Substanz isoliert und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert werden.



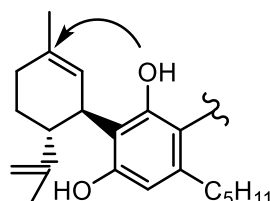
Die Entstehung des Glykolethers ist bei den herrschenden Reaktionsbedingungen als  $S_N1$ - oder  $S_N2$ -Reaktion des CBD im Sinne einer Williamson'schen Ethersynthese erklärbar. Das Nebenprodukt verhindert in diesen Mengen die Kristallisation des CBD.

### 5-(1-Ethoxy-1-methylethyl)-2-methyl-9-pentyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-2,6-methano-1-benzoxocin-7-ol (**12**)

In Schritt 3 (Verseifung und Decarboxylierung der Estergruppe) entstand **12** in Spuren. Sie wurde mittels präp.-HPLC isoliert und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert.

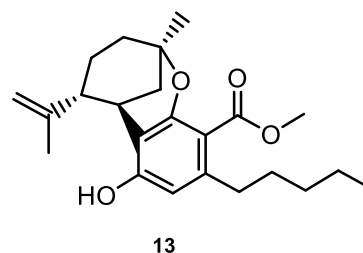


Diese Verbindung, kann sich – ähnlich dem in 3.2 beschriebenen Iso-THC und auch dem nachfolgend beschriebenen **13** – aus einer Addition der phenolischen Hydroxygruppe an die endocyclische Doppelbindung des Menthengerüsts bilden:



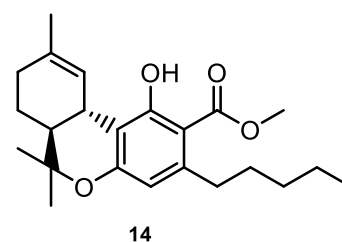
### Benzoxocin-10-carbonsäuremethylester, Methyl-(2R,5R,6R)-7-hydroxy-2-methyl-9-pentyl-5-(prop-1-en-2-yl)-3,4,5,6-tetrahydro-2H-2,6-methano-1-benzoxocin-10-carboxylat (**13**)

Aus der Mutterlauge wurde mittels präp.-HPLC ein Gemisch aus zwei Substanzen isoliert. **13** konnte in Spuren isoliert werden. Die Enantiomerenreinheit konnte mit den geringen Mengen nicht untersucht werden. Abweichend von der sonstigen MS-Methodik wurde die molekulare Masse der Substanz mittels high-resolution electrospray ionisation mass spectrometry (HR-ESI-MS) untersucht.



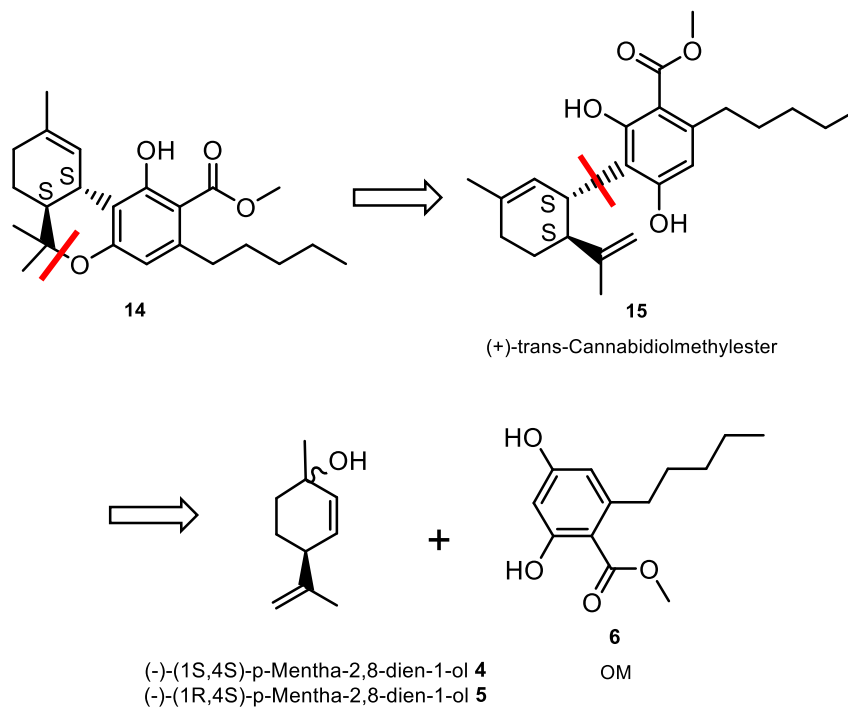
### Methyl-(6aS,10aS)-1-hydroxy-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-2-carboxylat (**14**)

**14** konnte in Spuren isoliert werden. Durch Reaktion von (-)-Menthadienol (**4** und **5**, die in geringsten Mengen in Menthadienol G enthalten sind) mit OM (**6**) kann sich (+)-trans-Cannabidiolmethylester (**15**) bilden. Die Reaktionsbedingungen



sind geeignet, um das entstehende Intermediat zu cyclisieren. So kann das 6aS,10aS-

konfigurierte Analogon des bei Chan und Chaly erwähnten Methyltetrahydrocannabinols<sup>71</sup> entstehen. Die mechanistische Betrachtung der Cyclisierung erfolgt in 3.2.1. Die Retrosynthese könnte wie folgt aussehen:



#### 4-[(1R,6R)-6-Isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl]-5-pentyl-benzen-1,3-diol (16)

Während sich in der HPLC-Analytik keine Verunreinigungen im Kristallisat von CBD feststellen ließen, waren in der GC (unpolar) geringfügige Verunreinigungen zu finden (Abb. 38).

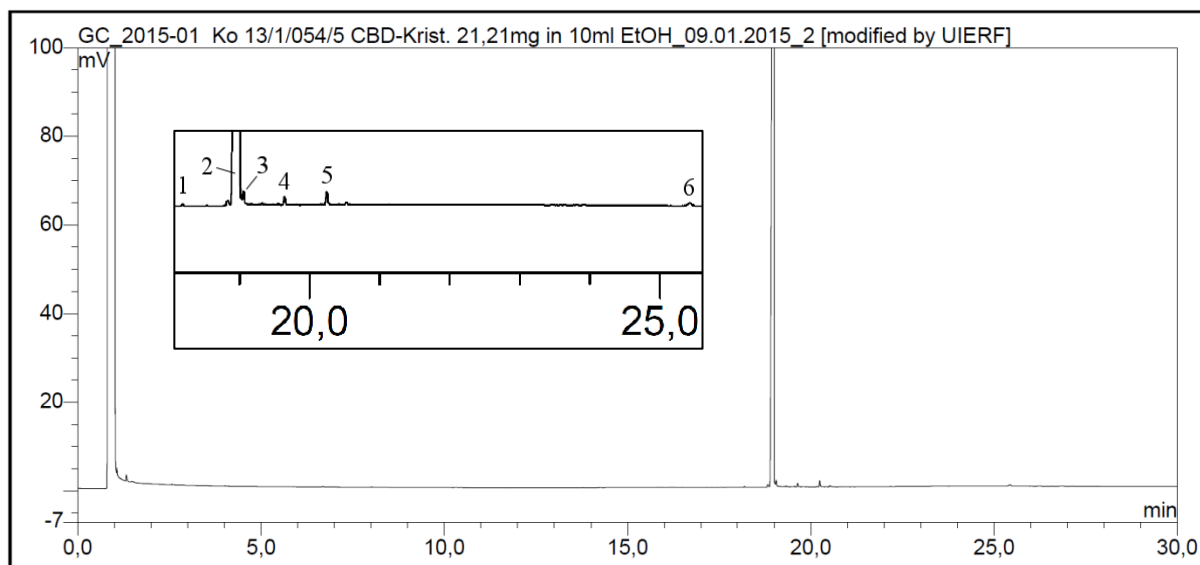
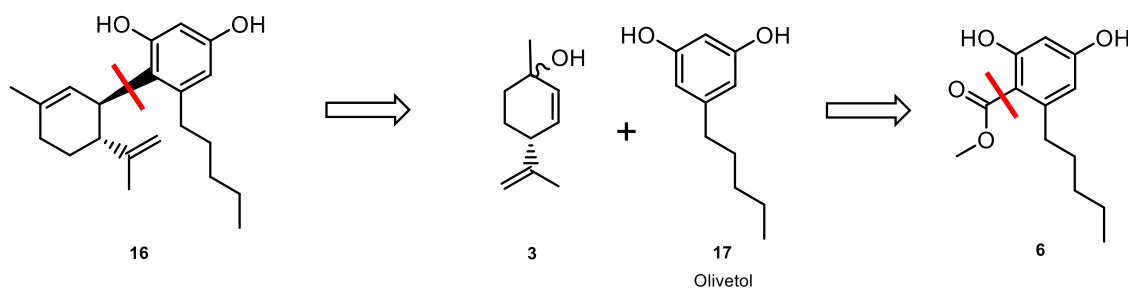


Abb. 38: GC-Chromatogramm von CBD-Verunreinigungen

Der Hauptpeak (2) entspricht CBD. Die unbekannt Substanzen wurden mittels präp.-HPLC isoliert und mittels GC-MS und NMR-Spektrometrie identifiziert.

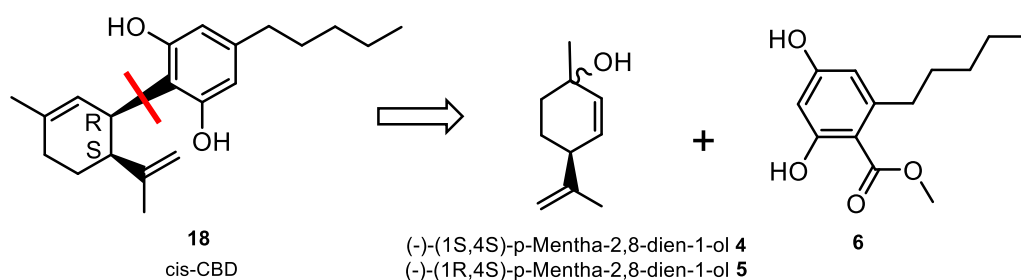
Peak-Nr.	GC RT [min]	präp.-HPLC RT [min]	Gehalt GC [Flächen-%]	Isolierte Menge [mg]	Summenformel	Verbindung
1	18,8	12,2	91	13	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	<b>16</b>
2	19,0	–	–	–	–	CBD
3	19,1	13,7	92	20	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	<b>18</b>
4	19,6	18,5	59	8	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Dronabinol
5	20,2	10,2	79	7	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	<b>11</b> (bereits weiter oben beschrieben)
6	25,4	22,5	76	12	C <sub>31</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	<b>20</b>

Die Entstehung von **16** ist dadurch erklärbar, dass sich unter den gegebenen Reaktionsbedingungen durch Verseifung und Decarboxylierung des OM (**6**) Olivetol (**17**) bilden kann, welches mit **3** weiterreagieren kann. Anders als im Falle des OM fehlt Olivetol der dirigierende Effekt der Methylestergruppe. Die beiden Hydroxygruppen dirigieren mittels –I- und +M-Effekt nach ortho und para. Der –I- und der –M-Effekt des Esters geben bei der Synthese von CBD den Ausschlag zur Substitution an C<sub>3</sub> von OM. Bei Olivetol sind dagegen die Positionen an C<sub>4</sub> und C<sub>6</sub> für eine Substitution begünstigt. Es kann folgende Retrosynthese vorgeschlagen werden:



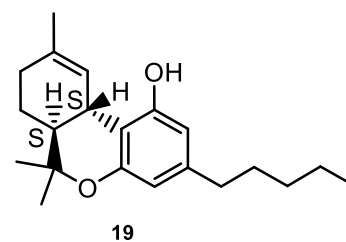
### 2-[(1R,6S)-6-Isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl]-5-pentyl-benzen-1,3-diol (**18**)

**18** oder sein Enantiomer (1S,6R) sind die cis-konfigurierten Diastereomere von trans-CBD. Diese können sich aus – in geringsten Mengen in Menthadienol G enthaltenem – (–)-Menthadienol bilden. Die Kupplung geschieht nach demselben Schema wie der erste Schritt der trans-CBD-Synthese (siehe Kap. 3.1.3). Eine Retrosynthese könnte wie folgt aussehen:



### Dronabinol und (+)-trans- $\Delta$ 9-THC (19)

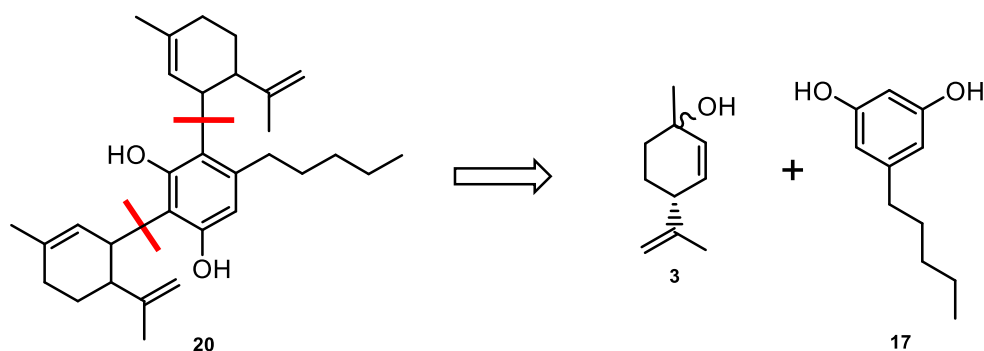
Mit der Vorkenntnis der in 1.2.3.1 beschriebenen Synthesen ist mit einer Entstehung von cyclischen Produkten zu rechnen. Bei den gegebenen Reaktionsbedingungen ist eine Cyclisierung von CBD zu Dronabinol oder (+)- $\Delta$ 9-THC ((6aS,10aS)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-1-ol, 19) möglich.



Aufgrund des Überschusses an (-)-trans-CBD kann vornehmlich mit der Entstehung von (-)- $\Delta$ 9-THC gerechnet werden. Gegebenenfalls kann auch (+)- $\Delta$ 9-THC aus geringsten Mengen an (+)-trans-CBD entstehen, die wiederum auf geringe Mengen an (-)-Menthadienol im Startmaterial zurückgehen können. Die mechanistische Betrachtung der Cyclisierung erfolgt summarisch in Kapitel 3.2.1.

### 2,4-Bis(6-isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl)-5-pentyl-benzen-1,3-diol (20)

Geht man davon aus, dass, wie in der Retrosynthese von 16 beschrieben, intermediär Olivetol (17) als Reaktionspartner zur Verfügung steht, so ist auch eine doppelte Friedel-Crafts-Alkylierung möglich. Obwohl dies wegen des Pentylrests an Position 5 sterisch ungünstig erscheint, kann ein zweites Molekül (+)-Menthadienol (3) an den Resorcin-Rest koppeln. Dabei sind beide freien Bindungsstellen gleich wahrscheinlich, wie die Retrosynthese zeigt:



### 3.2 Synthese und Reinigung von Dronabinol

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene cannabinoide Verbindungen und Verfahren zu deren Herstellung bekannt, die in 1.2.3 beschrieben wurden. Bezogen auf die Cyclisierung von CBD (**10**) hat sich als Katalysator BF<sub>3</sub>-Etherat und als Lösungsmittel Dichlormethan als am geeignetsten herauskristallisiert. Die Reproduzierbarkeit der Literaturangaben<sup>92</sup> ließ sich im Vorfeld bestätigen. Danach sind innerhalb von 20–30 min 70% des CBD (**10**) in Dronabinol (**21**) umgesetzt (Abb. 39 und Abb. 40).

Alternativ zur Ausbeute wurde die Selektivität (S) als Maß für die Güte der Reaktion verwendet. Die Selektivität berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$S = \frac{\text{gebildete Menge des Produktes}}{\text{umgesetzte Menge des Eduktes}} \quad \text{entspricht} \quad S [\%] = \frac{\text{Dronabinol [Flächen\%]}}{(100 - \text{CBD [Flächen\%]})} \cdot 100 \%$$

Die Selektivität hat den Wert  $S = 0$ , wenn kein Ausgangsstoff zum Produkt umgesetzt wurde. Hingegen ist  $S = 1$ , wenn alles umgesetzte Edukt in das betrachtete Produkt (und nicht in andere Produkte) umgesetzt wurde.  $S$  wurde hier als prozentualer Wert ausgedrückt, kann also zwischen 0% und 100% liegen.<sup>100</sup>

Bei kürzerer Reaktionszeit (10 min) zeigte sich bei der vorbezeichneten Reaktion eine Selektivität für Dronabinol von 74%. Die Entstehung der einzelnen Produkte ist in Abb. 39 in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Im weiteren Reaktionsverlauf nimmt der Anteil an Dronabinol ab, da zunehmend  $\Delta$ 8-THC (**22**) und Exo-THC (**23**) aus Dronabinol entstehen.

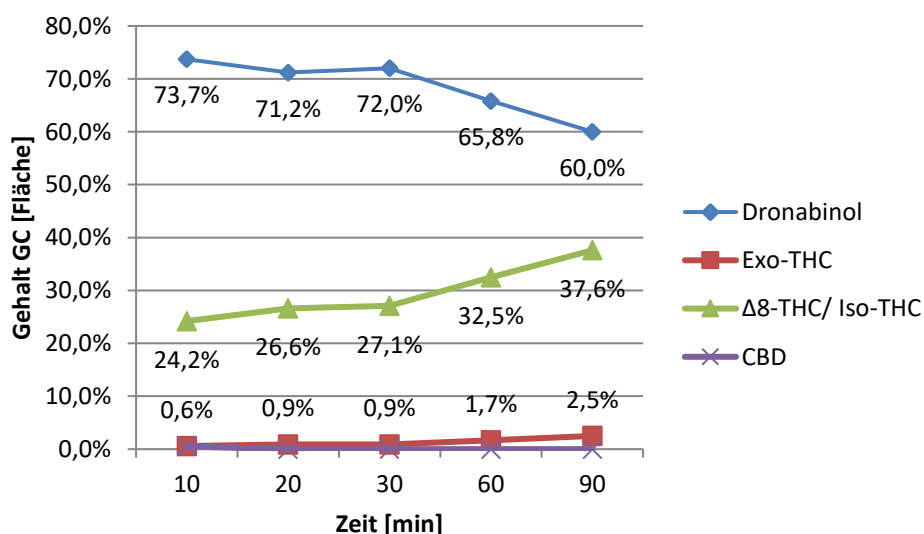
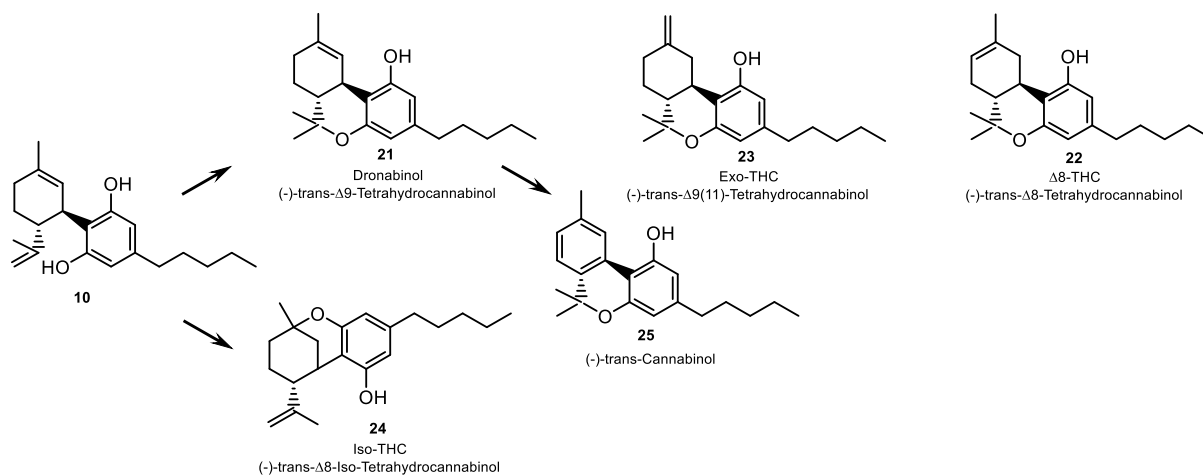


Abb. 39: Reaktionsverlauf der Umsetzung von CBD zu Dronabinol; Synthese gemäß EP2314580

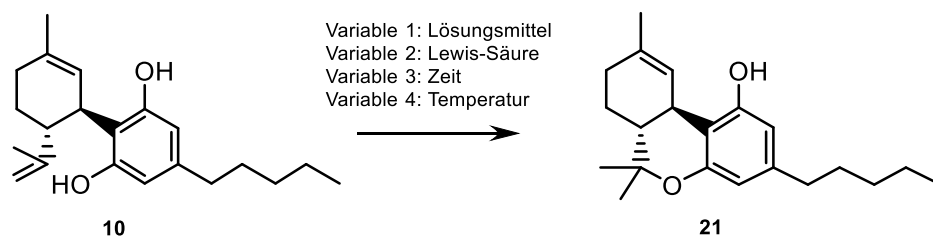


Dies lässt sich aufgrund der vorliegenden Literatur<sup>67,68,76,101</sup> wie folgt erklären:  $\Delta^8$ -THC ist thermodynamisch stabiler und entsteht durch Isomerisierung der Doppelbindung aus Dronabinol. Neben der Doppelbindungsverschiebung, die möglicherweise über die Struktur von Exo-THC verläuft, ist auch die Bildung der bicyclischen Nebenkomponente Iso-THC (**24**) eine Nebenreaktion, die durch Addition der phenolischen Hydroxy-Gruppe an die endocyclische Doppelbindung des Menthen-Gerüsts zustande kommt. Die Strukturen der zu erwartenden THC-Derivate sind in Abb. 40 aufgeführt.



**Abb. 40:** Zu erwartende THC-Derivate, die bei der Umsetzung von CBD mit  $\text{BF}_3$ -Etherat zu Dronabinol entstehen können; nach Razdan et al.<sup>67</sup>, Petrzilka et al.<sup>68</sup>, Mechoulam et al.<sup>76</sup> und Gaoni et al.<sup>101</sup>

Die Herstellung von Dronabinol (**21**) aus CBD (**10**) wird in zwei Schritten erreicht. Der erste Schritt ist eine optimierte Synthese, die zu einem Gemisch aus Cannabinoiden führt (Abb. 41). Dabei sind die Variablen so zu optimieren, dass das Dronabinol aus dem anfallenden Gemisch anschließend mittels Simulated Moving Bed (SMB)-Technologie so weit wie möglich angereichert wird.



**Abb. 41:** Allgemeine Reaktionsgleichung der Synthese von Dronabinol aus CBD mit Variablen

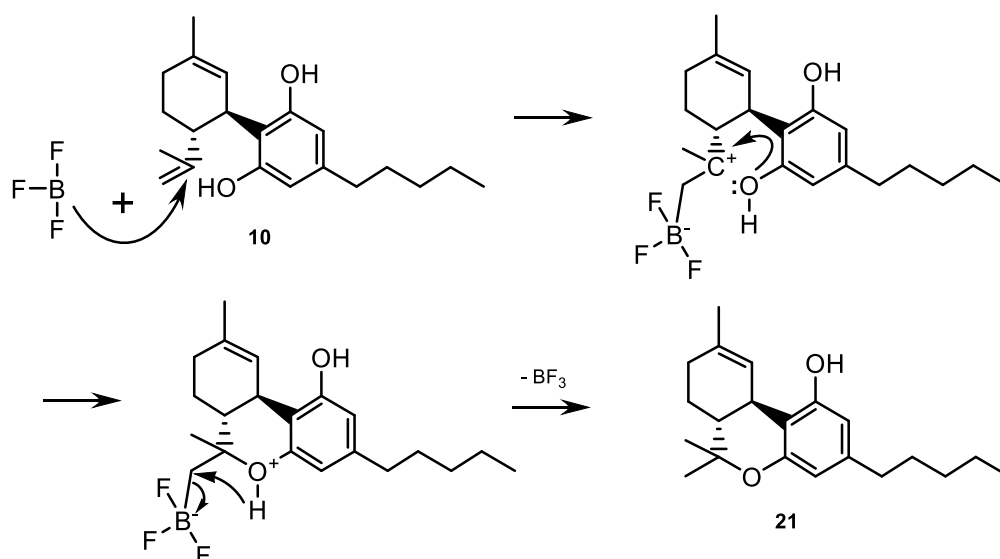
Bei der HPLC-analytischen Überprüfung (Methode D) der literaturbekannten Synthese ließen sich durch Vergleich der Retentionszeiten und Spiken der Proben Dronabinol,  $\Delta^8$ -THC, Exo-THC und CBD identifizieren.

Es zeigte sich, dass Dronabinol und Exo-THC durch ihre ähnlichen Retentionsindices (Abb. 102) sehr schwer zu trennen sind. Darüber hinaus war zu erkennen, dass mit dem Peak von  $\Delta^8$ -THC eine weitere Substanz eluiert, die detektiert werden konnte. Schon bei Planung der Experimente war klar, dass die extraktive Reinigung mittels SMB dazu geeignet sein würde,  $\Delta^8$ -THC und die koeluiierende Substanz vom Wertstoff Dronabinol abzutrennen. Daher wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, um die unbekannte Substanz aufzuklären. Auf der Basis der verfügbaren Literatur besteht der begründete Verdacht, dass es sich um Iso-THC handelt. Da Iso-THC zu diesem Zeitpunkt im Handel nicht als Standard verfügbar war, wurde der Peak als Summenparameter betrachtet und wird im weiteren Verlauf als  $\Delta^8$ -THC/ Iso-THC bezeichnet.

### **3.2.1 Synthese und Definition der Reaktionsparameter**

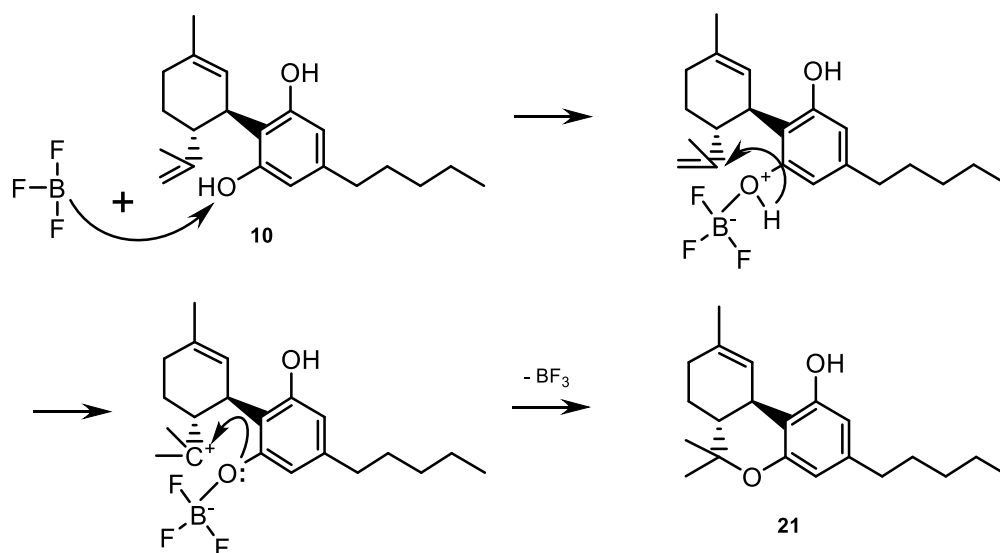
Die Cyclisierung von CBD zu Dronabinol mit Hilfe von  $\text{BF}_3$ -Etherat ist mechanistisch nicht aufgeklärt. Die Reaktion könnte unter Lewis-Säure-Katalyse als elektrophile Addition an ein unsymmetrisches Olefin verstanden werden.

Als starke Lewis-Säure kann  $\text{BF}_3$  durch kovalente Bindung an der Isopropenyl-Gruppe einen Donor-Akzeptor-Komplex bilden. Daraufhin greift der Sauerstoff des Phenols mit einem seiner freien Elektronenpaar nucleophil an dem entstandenen Carbeniumion an. Es kommt zum Ringschluss. Gemäß der Markovnikov-Regel gleicht der acide Wasserstoff die intermediär entstehende Ladung am wasserstoffreicheren Kohlenstoff der vormaligen Doppelbindung aus (Abb. 42).



**Abb. 42:** Cyclisierung von CBD zu Dronabinol als elektrophile Addition an ein unsymmetrisches Olefin

Eine zweite Möglichkeit ist, dass  $\text{BF}_3$  elektrophil am phenolischen Sauerstoff angreift. Das elektronenreiche Alken wird durch den aciden Wasserstoff protoniert. Durch den folgenden Ringschluss über das freie Elektronenpaar des Sauerstoffs zum Carbeniumion werden die Ladungen ausgeglichen (Abb. 43).



**Abb. 43:** Cyclisierung von CBD zu Dronabinol als elektrophile Addition am phenolischen Sauerstoff

Die Nachteile der Reaktion in Dichlormethan wurden bereits beschrieben. Auch die Freisetzung von Diethylether (durch Hydrolyse von  $\text{BF}_3$ -Etherat) ist für ein industrielles Verfahren unvorteilhaft. Mit dem Ziel, die Ausbeute zu optimieren – bei gleichzeitiger Minimierung von Verunreinigungen – sowie Dichlormethan als Lösungsmittel und  $\text{BF}_3$ -Etherat als Katalysator zu vermeiden, wurden folgende Parameter betrachtet:

- Art des Lösungsmittels und Konzentration der Reaktanden
- Art des Katalysators und dessen Konzentration
- Reaktionszeit
- Temperatur

### 3.2.2 Optimierung der Reaktionsparameter

#### 3.2.2.1 Art des Lösungsmittels und Konzentration der Reaktanden

Die Reaktion folgte dem in Abb. 41 gezeigten Schema, Variationen sind beim jeweiligen Experiment tabellarisch angegeben. Zunächst wurde das Lösungsmittel variiert (Abb. 44), während alle anderen Parameter in den Experimenten konstant gehalten wurden (Tab. 5). Nach Möglichkeit wurden danach die Ansätze in einem linearen Verlauf auf das Sechsfache des ursprünglichen Ansatzes skaliert.

In einem Dreihalskolben mit Innenthermometer wurden unter Schutzgas ( $N_2$ ) 5 g CBD in 100 g des jeweiligen Lösungsmittels bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) mit 5 g  $BF_3$ -Etherat versetzt. Die Dosierzeit des Katalysators betrug 10 min. Der Katalysator wurde zugetropft und die Mischung gerührt. Probennahmen aus der Reaktionslösung wurden zu definierten Zeitpunkten (siehe jeweilige Tabelle) durchgeführt. Der Katalysator wurde in den Proben jeweils durch die Zugabe von Wasser inaktiviert. Es wurde für weitere 90 min gerührt und dann 200 g Eiswasser hinzugegeben. Nach weiteren 10 min wurde die organische Phase mit  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert.

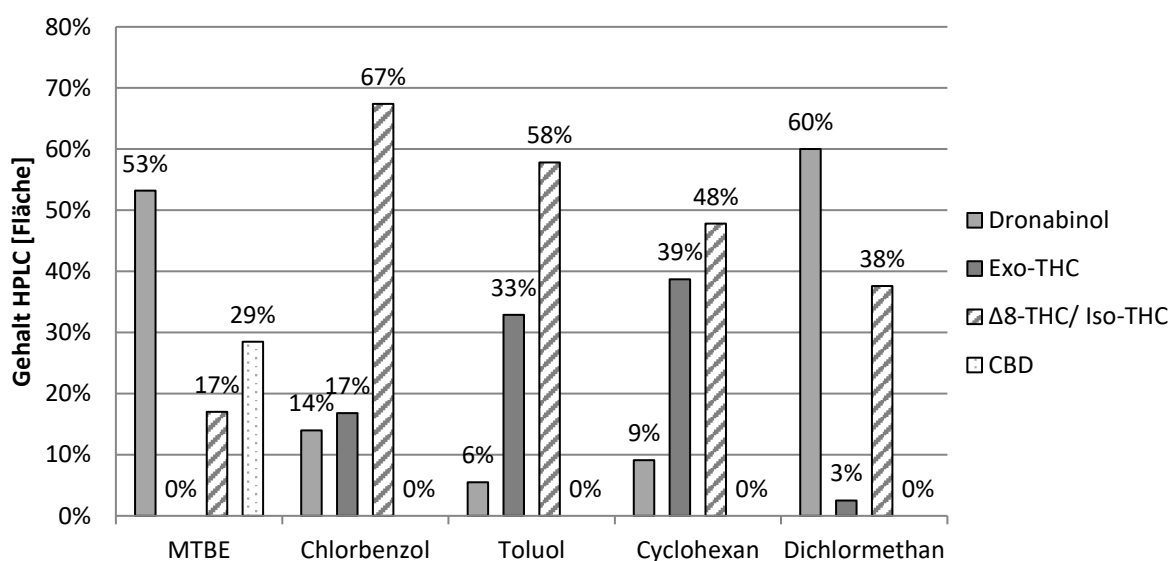
Die Analytik musste aufgrund der Empfindlichkeit des erhaltenen Gemisches (insbesondere von Dronabinol) gegenüber Luftsauerstoff direkt erfolgen. Bereits eine Lagerung über wenige Tage, selbst unter Stickstoff oder Argon, ergab verminderte Gehalte (vgl. 3.2.5). Um diese „Online“-Analytik zu ermöglichen, wurde auf eine Vermessung gegen Standards verzichtet. Auf eine optimale Trennung von  $\Delta 8$ -THC und Iso-THC wurde verzichtet und beide als Summe erfasst.

**Tab. 5:** Reaktionsparameter zur Optimierung des Lösungsmittels

CBD	Lösungsmittel	Katalysator	Temperatur	Reaktionszeit
5 g	100 g MTBE, Chlorbenzol, Toluol oder Cyclohexan	5 g (35,0 mmol) BF <sub>3</sub> -Etherat	Raumtemperatur	90 min

In Toluol und Cyclohexan liegt der Anteil an  $\Delta$ 8-THC (58% bzw. 48%) und Exo-THC (33% bzw. 39%) höher als das gewünschte Produkt (6% bzw. 9%). Die Versuche in Chlorbenzol (als hochsiedendes chlorhaltiges Lösungsmittel) zeigten zwar ähnliche Umsätze wie die Reaktion in Dichlormethan, jedoch wird statt Dronabinol präferiert  $\Delta$ 8-THC gebildet.

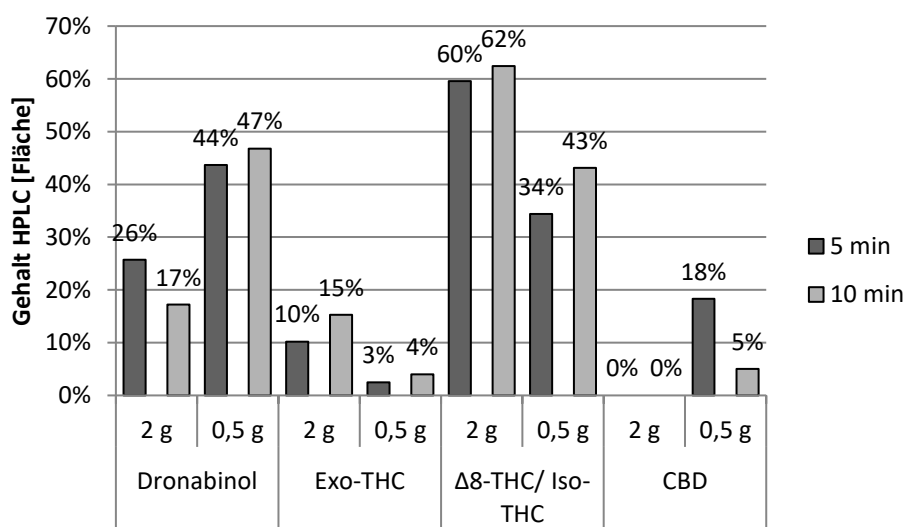
Beim Einsatz von MTBE sind nach 90 min erst ca. zwei Drittel des Startmaterials umgesetzt. Vorteilhaft sind die geringen Mengen an Nebenprodukten. Mit einer Ausbeute von 53% an Dronabinol war die Verwendung von MTBE konkurrenzfähig.

**Abb. 44:** Gehalt an Dronabinol und Nebenprodukten in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel

Auch durch die Verringerung der Reaktionszeit und der Konzentration des Katalysators konnte in Cyclohexan keine konkurrenzfähige Synthese erreicht werden. Die Nebenproduktbildung war zu hoch. Das System zeigt die Tendenz, CBD in  $\Delta 8$ -THC/ Iso-THC und nicht in Dronabinol zu überführen (Tab. 6, Abb. 45).

**Tab. 6:** Reaktionsparameter für die Synthese von Dronabinol in Cyclohexan

CBD	Lösungsmittel	Katalysator	Temperatur	Reaktionszeit
5 g	100 g Cyclohexan	2 g (14,0 mmol)	Raumtemperatur	5 min
		0,5 g (3,5 mmol) BF <sub>3</sub> -Etherat		10 min

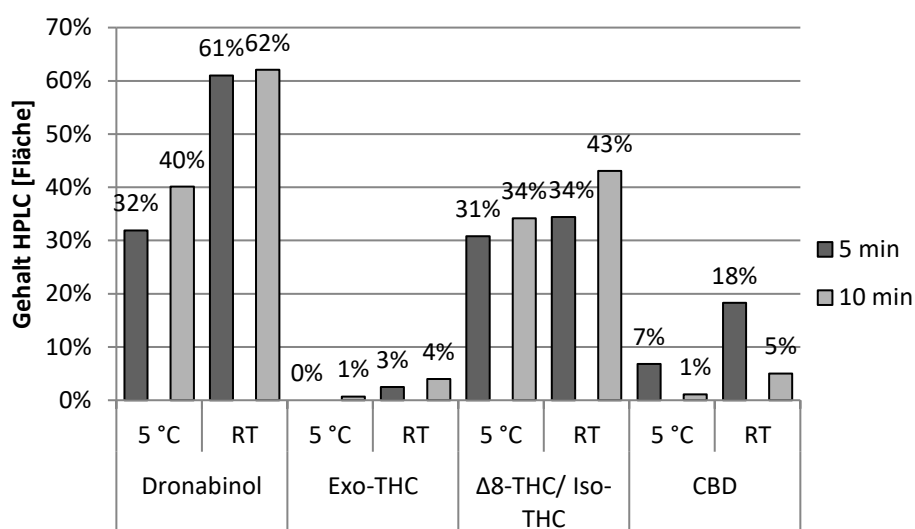


**Abb. 45:** Gehalt an Dronabinol und Nebenprodukten bei der Synthese in Cyclohexan mit 2 g oder 0,5 g BF<sub>3</sub>-Etherat nach 5 und 10 min

Die Reaktion (Tab. 7) in Chlorbenzol führte zur einer ausgeprägten Bildung von Nebenprodukten (Exo- und  $\Delta 8$ -THC/ Iso-THC). Die Erniedrigung der Reaktionstemperatur auf 5 °C führte zwar zu einem geringeren Gehalt an Exo-THC, jedoch verschlechterte sich die Ausbeute an Dronabinol dermaßen, dass die Reaktion nicht konkurrenzfähig erschien (Abb. 46). Die Selektivität nach 5 min lag nur bei 66% und war damit um 8% geringer als in Dichlormethan.

**Tab. 7:** Reaktionsparameter für die Synthese von Dronabinol in Chlorbenzol

CBD	Lösungsmittel	Katalysator	Temperatur	Reaktionszeit
5 g	100 g Chlorbenzol	0,5 g (3,5 mmol) BF <sub>3</sub> -Etherat	5 °C	5 min
			Raumtemperatur	10 min

**Abb. 46:** Gehalt an Dronabinol und Nebenprodukten bei der Synthese in Chlorbenzol bei 5 °C oder Raumtemperatur (RT) nach 5 und 10 min

Cyclohexan, Chlorbenzol und Toluol wurden aufgrund dieser Erkenntnisse als Lösungsmittel ausgeschlossen.

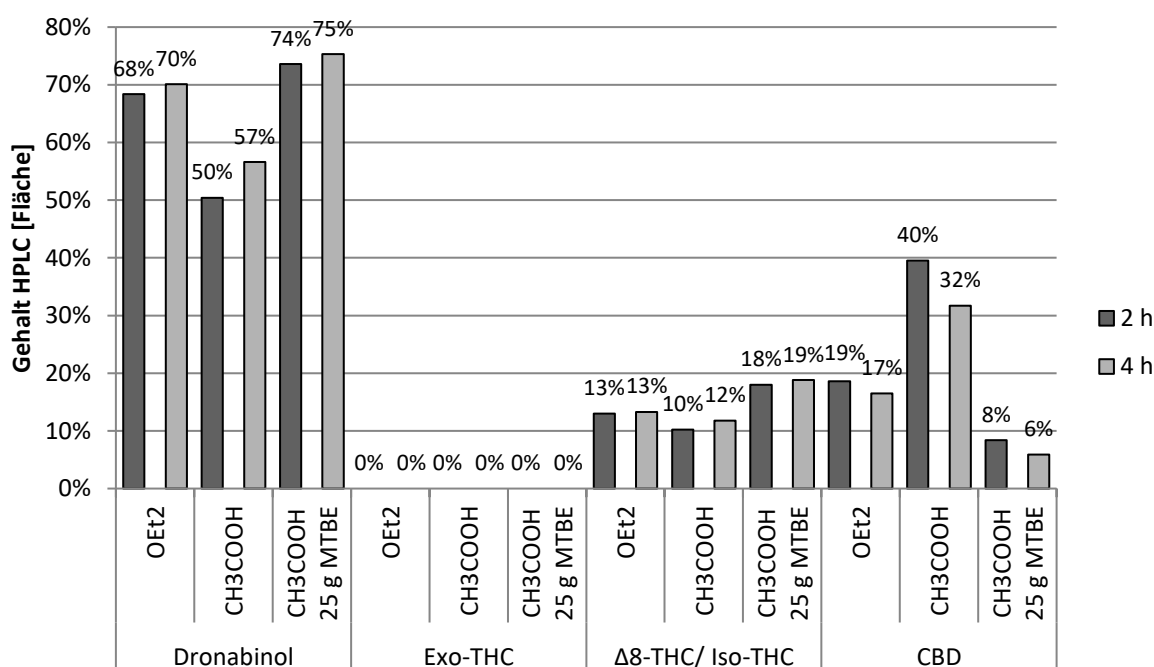
### 3.2.2.2 Optimierung des Katalysator-Komplexes in MTBE

Erste Versuche in MTBE (5 g (16 mmol) CBD, 100 g MTBE, 5 g (35 mmol) BF<sub>3</sub>-Etherat, Raumtemperatur) zeigten bereits eine Selektivität für Dronabinol von 81% nach 30 min. Allerdings waren noch 57% Edukt vorhanden. Die Verlängerung der Reaktionszeit führte zu einem höheren Umsatz unter Beibehaltung der Selektivität. Nach 3 h lagen nur noch 3,4% Edukt vor, die Selektivität lag bei 83%. Deshalb wurde die Konzentration der Reaktanden verdoppelt und BF<sub>3</sub>-Essigsäure als Katalysator-Komplex verwendet. Die Dosierzeit betrug 5 min (Tab. 8).

Bei Verwendung von  $\text{BF}_3$ -Essigsäure sank der Umsatz. Nach 4 h lagen noch ca. 32 % Edukt vor. Die Selektivität für Dronabinol blieb aber erfreulicherweise hoch (ca. 83 %). Durch Erhöhung der Konzentration der Reaktanden konnte der Umsatz erhöht werden. Es lagen nach 4 h nur noch ca. 6 % Edukt vor (Abb. 47).

**Tab. 8:** Reaktionsparameter für die Synthese von Dronabinol in MTBE

CBD	Lösungsmittel	Katalysator	Temperatur	Reaktionszeit
5 g	50 g MTBE	2 g (14,1 mmol)	Raumtemperatur	2 h
	25 g MTBE	4 g (28,2 mmol) $\text{BF}_3$ -Etherat		4 h



**Abb. 47:** Gehalt an Dronabinol und Nebenprodukten bei der Synthese in MTBE mit  $\text{BF}_3$ -Etherat (OEt<sub>2</sub>) oder  $\text{BF}_3$ -Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH) sowie mit doppelter Konzentration  $\text{BF}_3$ -Essigsäure nach 2 h und 4 h

Eine weitere Erhöhung der Katalysatormenge auf 4 g (21,3 mmol) führte zur Entstehung von ca. 1 % Exo-THC bei hoher Selektivität (73 %) und sehr gutem Umsatz. Bei einem Versuch mit 8 g Katalysator war Exo-THC bei guter Selektivität (75 %) nicht detektierbar. Nach mehrmaliger Messung war dies aber wohl ein Trugschluss, denn bei der Ansatzvergrößerung auf 30 g (95 mmol) CBD (Tab. 9) kam es zur Bildung von ca. 3 % (Exo-THC) nach 4 h. Es scheint so, als sei die Bildung von Exo-THC in größeren Ansätzen wahrscheinlicher als in kleineren. Verantwortlich dafür könnten „Hot Spots“ sein, die durch punktuellen

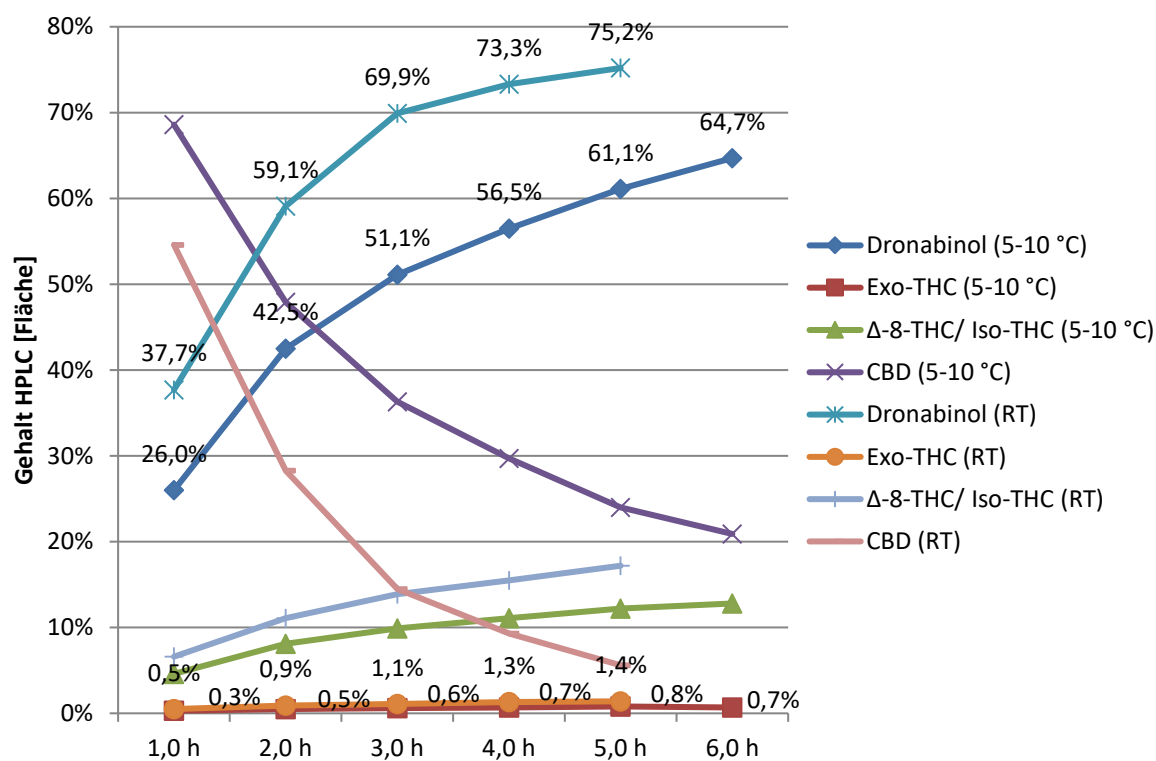


Temperaturanstieg bei exothermen Reaktionen vorkommen können. Ein weiterer denkbarer Grund ist eine lokale Erhöhung der Katalysator-Konzentration. Beides ist möglich, wenn größere Volumen nicht mehr ausreichend gut durchmischt werden. Denkbar ist es daher, die Rührgeschwindigkeit als weitere Variable zu untersuchen; dies war im Rahmen dieser Arbeit aber zeitlich nicht mehr möglich.

Auch bei reduzierter Temperatur (5–10 °C) bildete sich Exo-THC. Zwar geschah dies in geringerem Maß als bei Raumtemperatur, aber dennoch in relevanten Mengen, wie sich in der späteren Aufarbeitung zeigte (Abb. 48).

**Tab. 9:** Reaktionsparameter für die Synthese von Dronabinol in MTBE mit BF<sub>3</sub>-Essigsäure

CBD	Lösungsmittel	Katalysator	Temperatur	Reaktionszeit
30 g	150 g MTBE	24 g (127,8 mmol) BF <sub>3</sub> - Essigsäure	5–10 °C	1 h 2 h 3 h 4 h 5 h
			Raumtemperatur	6 h (nur 5–10 °C)



**Abb. 48:** Gehalt an Dronabinol, Exo-THC, Δ-8-THC/ Iso-THC und CBD bei der Synthese in MTBE mit BF<sub>3</sub>-Essigsäure bei Raumtemperatur und reduzierter Temperatur (5–10 °C)

Die Selektivität von 83 % nach 1 h und 80 % bei Reaktionsende (5 h) ist dem System in Dichlormethan überlegen. Nachteilig bei der Verwendung von MTBE als Lösungsmittel ist die lange Reaktionsdauer von mehreren Stunden.

In ersten Reinigungsversuchen mittels SMB bestätigten sich die aufgrund der sehr ähnlichen Retentionsindizes von Exo-THC und Dronabinol (Abb. 102) erwarteten Trennprobleme für diese Stoffe. Die Einhaltung der Spezifikation war aufgrund der Koelution nicht möglich. Eine Optimierung der Trennmethode könnte hier Abhilfe schaffen, war aber im Rahmen dieser Arbeit zeitlich nicht mehr möglich. Da Exo-THC bei der Verwendung von Dichlormethan kaum zu detektieren war – wahrscheinlich aufgrund der deutlich schnelleren Reaktion –, wurde die Reaktionsführung in Dichlormethan ebenfalls optimiert.

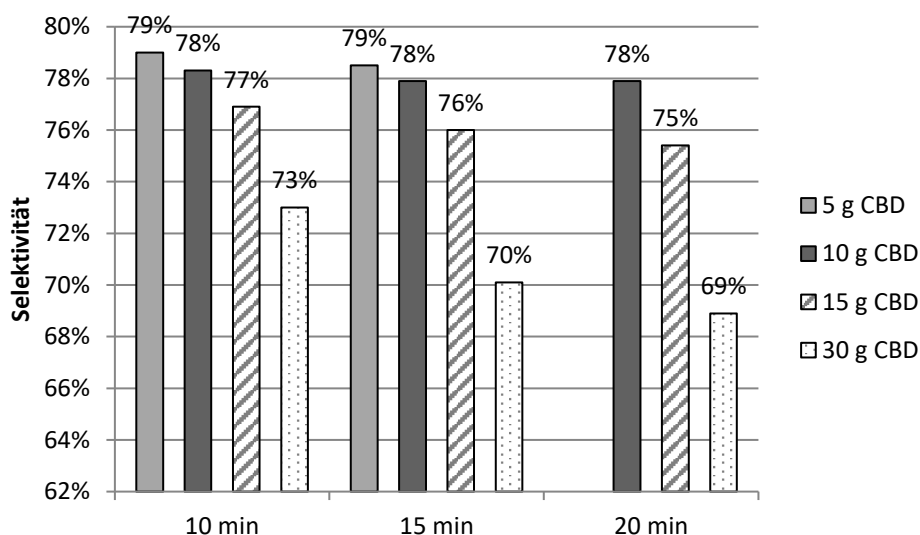
### 3.2.2.3 Vergrößerung des Ansatzes und Optimierung des Katalysator-Komplexes in Dichlormethan

Bei Vergrößerung des Ansatzes auf 10, 15 und 30 g CBD und gleichzeitiger linearer Erhöhung der Katalysator-Menge (BF<sub>3</sub>-Etherat) war bei Raumtemperatur die optimale Selektivität für Dronabinol jeweils nach 10 min erreicht. Bei keinem der Ansätze war Exo-THC detektierbar. Bei Vergrößerung des Ansatzes um das Sechsfache sank die Selektivität für Dronabinol um ca. 9 % (Abb. 48).

**Tab. 10:** Reaktionsparameter für die Synthese von Dronabinol in Dichlormethan mit BF<sub>3</sub>-Etherat

CBD	Lösungsmittel	Katalysator	Temperatur	Reaktionszeit
5 g 10 g 15 g 30 g	121 g Dichlormethan und 240 g Dichlormethan bei 30 g CBD	0,8 g (5,6 mmol) 1,6 g (11,2 mmol) 2,4 g (16,8 mmol) 4,8 g (34 mmol) BF <sub>3</sub> -Etherat	Raumtemperatur	10 min

Außerdem nahm die Selektivität für Dronabinol mit steigender Reaktionszeit ab. Zwar stieg die Ausbeute unter stetiger Abnahme von CBD (bis auf 0,3 % nach 20 min), allerdings führte die Reaktion zunehmend zur Entstehung von  $\Delta^8$ -THC/ Iso-THC.



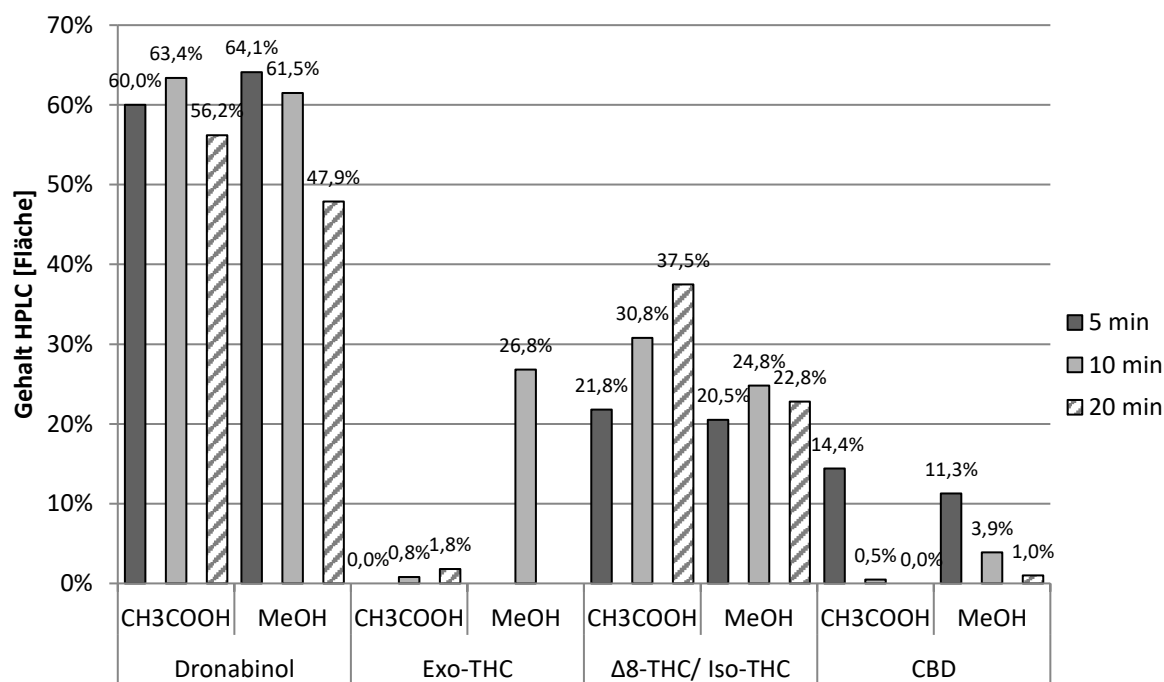
**Abb. 49:** Selektivität für Dronabinol bei der Synthese in Dichlormethan mit  $\text{BF}_3$ -Etherat für Ansätze mit 5, 10, 15 oder 30 g CBD (es fehlt der Wert für den 5-g-Ansatz bei 20 min Reaktionszeit)

Um zu prüfen, ob  $\text{BF}_3$ -Etherat durch einen anderen Katalysator ersetzbar ist, wurden Systeme mit  $\text{BF}_3$ -Essigsäure,  $\text{BF}_3$ -Methanol (Tab. 11) und  $\text{BF}_3$ -Tetrahydrofuran ( $\text{BF}_3$ -THF) getestet.

**Tab. 11:** Reaktionsparameter für die Synthese von Dronabinol in Dichlormethan mit  $\text{BF}_3$ -Essigsäure oder  $\text{BF}_3$ -Methanol

CBD	Lösungsmittel	Katalysator	Temperatur	Reaktionszeit
30 g	240 g Dichlormethan	3,2 g (34 mmol) $\text{BF}_3$ - Essigsäure	Raumtemperatur	5 min 10 min 20 min
		6,8 g (34 mmol) $\text{BF}_3$ - Methanol		

Die Reaktionen mit  $\text{BF}_3$ -Essigsäure und  $\text{BF}_3$ -Methanol verliefen ähnlich schnell wie die mit  $\text{BF}_3$ -Etherat. Die maximale Ausbeute war bereits nach 10 min erreicht. Verglichen mit der Katalyse durch  $\text{BF}_3$ -Etherat lieferten beide jedoch geringere Ausbeuten (Abb. 50). Mit  $\text{BF}_3$ -Methanol kam es zu einer massiven Bildung von Exo-THC, was einerseits die Ausbeute verringerte und andererseits zu Trennproblemen in der späteren Reinigung führen würde. Mit  $\text{BF}_3$ -Essigsäure kam es zu einer zwar geringeren, aber trotzdem noch deutlichen Bildung von Exo-THC. Die Selektivitäten der Reaktionen ( $\text{BF}_3$ -Essigsäure: 63 %;  $\text{BF}_3$ -Methanol: 62 %) waren derjenigen im System mit  $\text{BF}_3$ -Etherat (> 70 %) unterlegen.

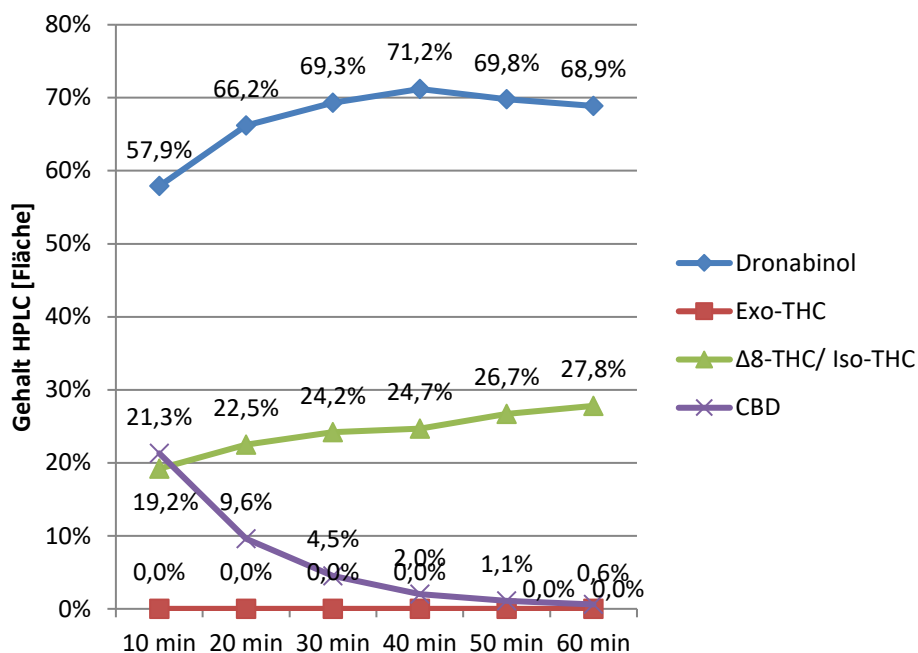


**Abb. 50:** Gehalt an Dronabinol, Exo-THC, Δ8-THC/ Iso-THC und CBD bei der Synthese in Dichlormethan mit BF<sub>3</sub>-Essigsäure oder BF<sub>3</sub>-Methanol nach 5, 10 und 20 min

Bei Verwendung von BF<sub>3</sub>-THF verlief die Reaktion etwas langsamer als in den zuvor beschriebenen Systemen. Die maximale Ausbeute wurde nach ca. 40–50 min erreicht. Die Selektivität bei der Reaktion im Maßstab von 30 g CBD betrug wie bei der Verwendung von BF<sub>3</sub>-Etherat > 70%. Bei der Katalyse mit BF<sub>3</sub>-THF wurde Exo-THC als Nebenprodukt in keiner detektierbaren Menge gebildet. Nach den Vorerfahrungen mit MTBE ist aber nicht auszuschließen, dass bei längerer Reaktionsdauer in noch größeren Ansätzen Exo-THC gebildet werden könnte.

**Tab. 12:** Reaktionsparameter für die Synthese von Dronabinol in Dichlormethan mit BF<sub>3</sub>-THF

CBD	Lösungsmittel	Katalysator	Temperatur	Reaktionszeit
30 g	240 g Dichlormethan	4,8 g (34 mmol) BF <sub>3</sub> -THF	Raumtemperatur	10 min 20 min 30 min 40 min 50 min 60 min



**Abb. 51:** Gehalt an Dronabinol, Exo-THC, Δ8-THC/ Iso-THC und CBD bei der Synthese in Dichlormethan mit BF<sub>3</sub>-THF nach 10–60 min

Aus sicherheitstechnischen Gründen ist im industriellen Umfeld eine Synthese mit BF<sub>3</sub>-THF gegenüber BF<sub>3</sub>-Etherat vorzuziehen. THF und Diethylether bilden explosionsfähige Gemische mit Luftsauerstoff. Allerdings ist der Dampfdruck von THF (19,3 kPa bei 20 °C<sup>102</sup>) niedriger als der von Diethylether (58,6 kPa bei 20 °C<sup>103</sup>) und der Zündpunkt von THF (321 °C<sup>102</sup>) ist höher als der von Diethylether (160–180 °C<sup>103</sup>). Im Labormaßstab können die beiden Systeme als gleichwertig betrachtet werden.

### 3.2.2.4 Feinabstimmung

Um die Robustheit der Synthese in engeren Grenzen zu testen, wurde in einem vergrößerten Ansatz eine Temperaturerhöhung um 5 °C untersucht. Außerdem wurden jeweils die Erhöhung der Konzentration des Eduktes und des Katalysators sowie die Erhöhung der Konzentration des Eduktes bei gleichzeitiger Verringerung der Menge an Katalysator untersucht.

Die Reaktionen wurde in Dichlormethan mit BF<sub>3</sub>-Etherat bei den in Tab. 13 angegebenen Temperaturen und Konzentrationen in Doppelbestimmungen durchgeführt.

**Tab. 13:** Variationen der Reaktionsparameter für die Synthese von Dronabinol in Dichlormethan mit BF<sub>3</sub>-Etherat

Ansatz	Dichlormethan	Temperatur	BF <sub>3</sub> -Etherat
1	400 g	20 °C	8 g (56 mmol)
2	400 g	<b>25 °C</b>	8 g (56 mmol)
3	<b>250 g</b>	20 °C	8 g (56 mmol)
4	400 g	20 °C	<b>10 g (70 mmol)</b>
5	<b>250 g</b>	20 °C	<b>6 g (42 mmol)</b>

Das Ziel bestand darin, die Parameter so zu wählen, dass der Gehalt an Dronabinol so weit wie möglich erhöht und der Gehalt der Verunreinigungen und Nebenprodukte dabei gering gehalten wird, d.h. dass der Gehalt an CBD und Exo-THC unter 1% liegen sollte. Diese beiden Parameter sind entscheidend, um nach extraktiver Reinigung mittels SMB ein zur Monographie der United States Pharmacopeia (USP)-konformes Produkt zu erhalten. Zudem wurden eine möglichst kurze Synthesedauer sowie ein geringer Verbrauch an Lösungsmittel und Katalysator angestrebt.

Die Dronabinol-Gehalte sind in Tab. 14 dargestellt. Die Ansätze mit den Temperaturen von 20 °C und 25 °C lieferten ähnliche Ausbeuten. Die Variationen ergeben sich daraus, dass aufgrund des hohen Probenaufkommens nicht jeder Ansatz nach der gleichen Zeit beendet wurde. Das hohe Probenaufkommen führte außerdem zu Verzögerungen bei der Analytik, was eine Lagerung der Proben über bis zu zwei Tage notwendig machte. Oxidationsprodukte durch längere Lagerung können daher nicht ausgeschlossen werden. Trotzdem ist erkennbar, dass bei höherer Temperatur tendenziell eine bessere Ausbeute an Dronabinol erzielt wird. Eine höhere Konzentration der Reaktanden ergibt hingegen eine tendenziell geringere Ausbeute. Ein (kostspieliger) Einsatz von mehr Katalysator erbringt keinen Vorteil hinsichtlich der Dronabinol-Ausbeute. Die Kombination von mehr Katalysator und höherer Konzentration der Reaktanden vermindert die Ausbeute.

**Tab. 14:** Dronabinol-Ausbeuten bei veränderter Reaktionstemperatur, Konzentration der Reaktanden oder Menge an Katalysator gemäß USP-Analytik

Parameter	Versuch Nr. 1 [m/m]	Versuch Nr. 2 [m/m]
20 °C	58,1 %	60,2 %
25 °C	56,6 %	64,5 %
250 g CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	53,4 %	53,5 %
10 g BF <sub>3</sub> -Etherat	54,2 %	59,2 %
6 g BF <sub>3</sub> -Etherat und 250 g CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	54,3 %	51,6 %

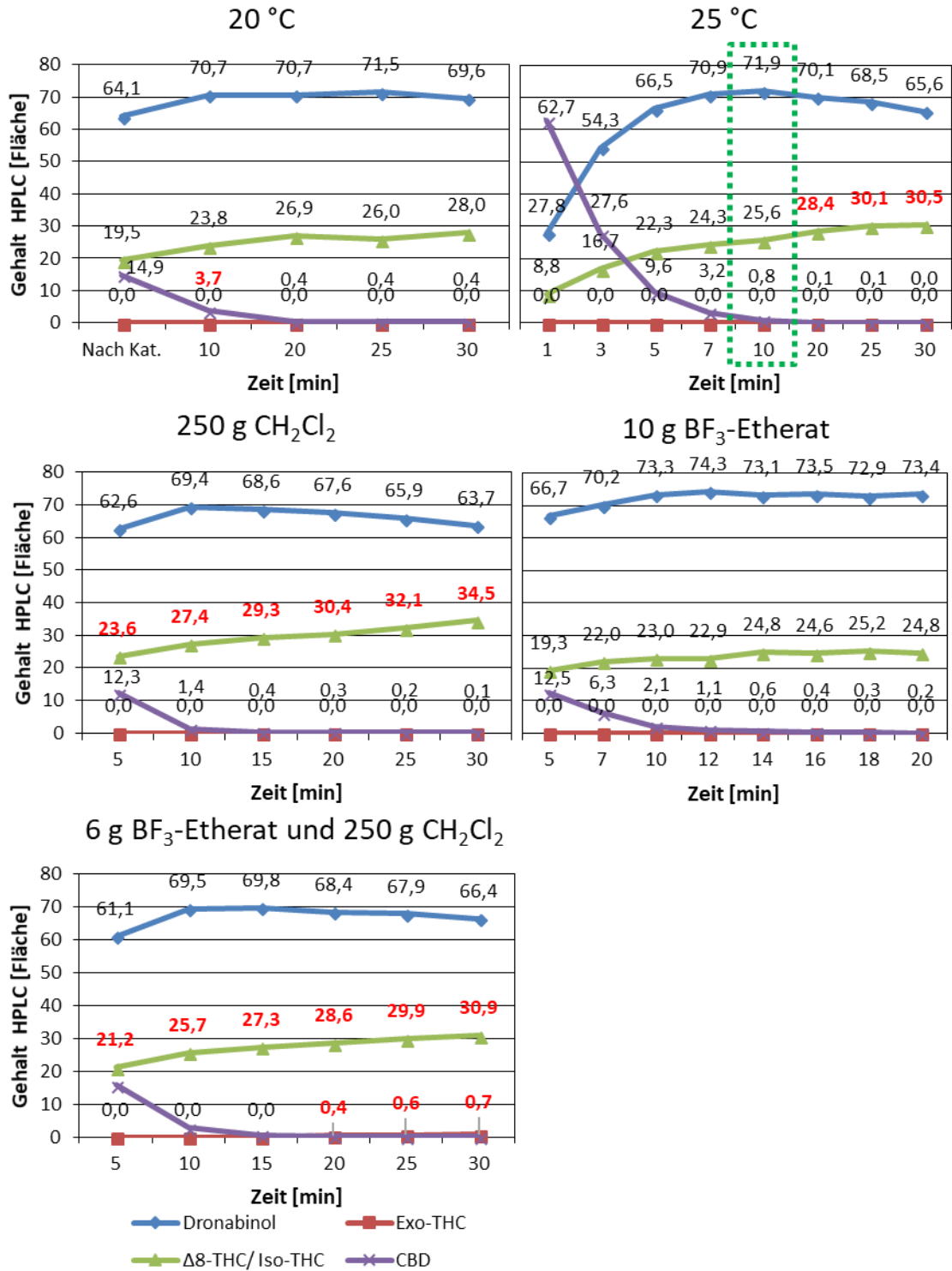
---

Betrachtet man die Reaktionsverläufe im Detail (Abb. 52), zeigt sich, dass das Optimum bezüglich des Dronabinol-Gehalts bereits nach 10 min erreicht war. Die Anforderung, dass CBD nur in einer Konzentration von  $< 1\%$  im Reaktionsgemisch vorhanden sein darf, war jedoch beim  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Ansatz (15 min) etwas später als im  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Ansatz (10 min) erreicht. Außerdem führte eine längere Reaktionsdauer als 20 min eher zur Abnahme der Selektivität (für Dronabinol) und einem Anstieg der Konzentration von  $\Delta 8$ -THC. Führt man die Reaktion also bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durch, ist die Einhaltung der Reaktionszeit besonders kritisch, da sonst relativ schnell mehrere Prozent Dronabinol in das thermodynamisch stabilere Nebenprodukt  $\Delta 8$ -THC umgewandelt werden. Die Reaktion verlief bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  zwar langsamer, lieferte dafür aber über einen längeren Zeitraum nahezu stabile Konzentrationen an Dronabinol. Unerwünschtes Exo-THC war in beiden Ansätzen nicht detektierbar.

Die Verwendung von 250 g Lösungsmittel ist zwar ökonomischer, lieferte jedoch zu hohe Werte an  $\Delta 8$ -THC und Exo-THC. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass durch die geringe Lösungsmittelmenge eine kürzere Weglänge zwischen den Molekülen entsteht. Zwar reagieren diese dann schneller miteinander, das Volumen scheint aber zu gering zu sein, um die exotherme Reaktion abzukühlen. Die Temperatur im Reaktionsgemisch steigt somit örtlich sehr schnell an, was zu einer vermehrten Synthese der Nebenprodukte führt. Daher sollte eine zu geringe Menge an Lösungsmittel vermieden bzw. eine gute Durchmischung gewährleistet werden, um eine konstante Temperatur im Reaktor zu gewährleisten.

Eine Erhöhung der Katalysator-Menge (10 g  $\text{BF}_3$ -Etherat) hatte keine positiven Effekte auf die Ausbeute. Daher ist ein kostenintensiver Einsatz von höheren Mengen des Katalysators nicht zu rechtfertigen.

Eine wesentliche Verringerung der Katalysator-Menge in einer konzentrierteren Lösung (6 g  $\text{BF}_3$ -Etherat und 250 g  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) führte zu einem vergleichbaren Effekt wie die Verringerung der Lösungsmittelmenge allein: Die Menge an Nebenprodukten stieg an. Besonders kritisch ist die Bildung von Exo-THC, dessen Entstehung unter optimierten Bedingungen ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 400 g Dichlormethan, 8 g  $\text{BF}_3$ -Etherat) nicht beobachtet wurde.



**Abb. 52:** Reaktionsverlauf der Synthese von Dronabinol in Abhängigkeit von der Temperatur, der Konzentration der Reaktanden und der Menge an Katalysator; grün gestrichelt: Optimum der Reaktionsbedingungen; rote Zahlen: kritische Konzentrationen an Nebenprodukten bzw. des Eduktes



### 3.2.3 Verunreinigungsprofil

Aus der zuvor beschriebenen Synthese erhält man ein reproduzierbares Rohprodukt, dessen Zusammensetzung in Tab. 15 gezeigt ist.

**Tab. 15:** Zusammensetzung von drei SMB-Rohprodukten von Dronabinol vor SMB-Reinigung

Substanz	RT [min]	Versuchs-Nr. mit Gehalt [Flächen-%]		
		1	2	3
Olivetol	2,8	1,3	1,2	1,3
CBD	8,5	0,4	0,3	0,4
Dronabinol	14,8	71,1	73,1	72,1
Exo-THC	15,6	0,4	0,0	0,4
$\Delta$ 8-THC/ Iso-THC	17,0	26,5	24,9	25,4

### 3.2.4 Reinigung von Dronabinol mittels Simulated Moving Bed Chromatography

Da Dronabinol selbst bei sehr hoher Reinheit nicht kristallisierbar ist und bei Einwirkung von Hitze die Tendenz zur Umwandlung in das thermodynamisch stabilere  $\Delta$ 8-THC besteht, können produktionsübliche Reinigungen wie Kristallisation und Destillation nicht angewandt werden. Eine weitere Erschwernis ist das Vorhandensein von Isomeren von Dronabinol im Rohprodukt (z. B.  $\Delta$ 8-THC oder Exo-THC) mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften (z. B. Polarität, Siedepunkt).

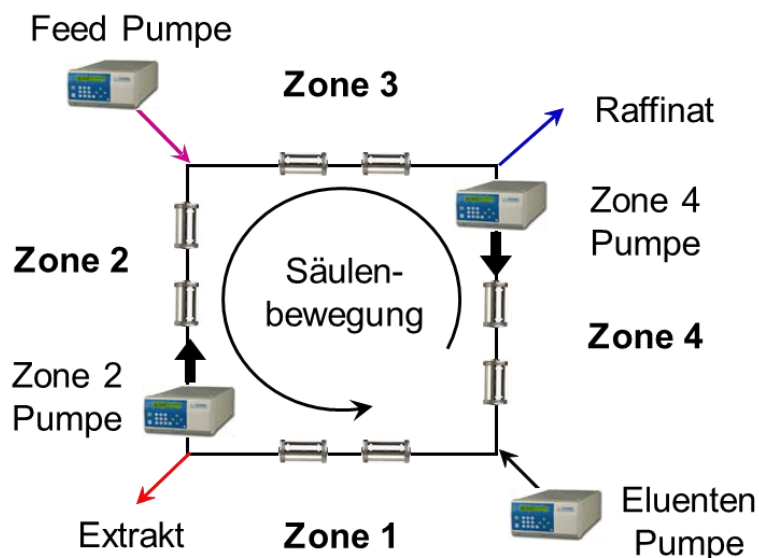
Die Lösung dieser Aufgabe erfolgte mit der Entwicklung eines neuen Verfahrens, welches auf der SMB-Technologie basiert. Dieses kontinuierliche Verfahren ermöglicht die Reinigung von Dronabinol auf eine Reinheit von > 98 %.

#### Grundlagen der SMB-Chromatographie

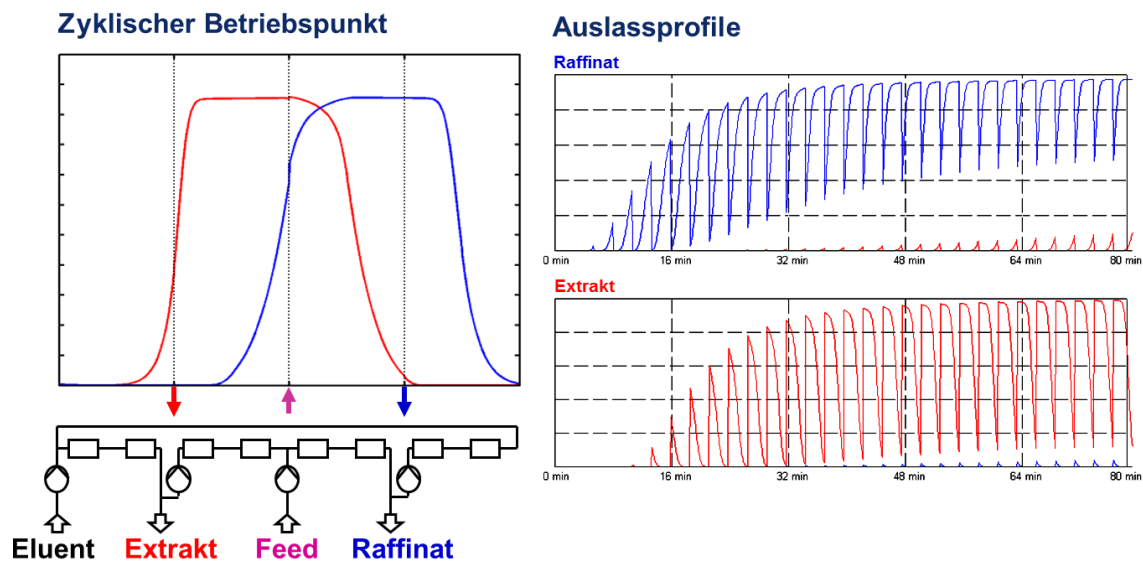
Die SMB-Chromatographie ist ein kontinuierliches Verfahren, das auf dem „true moving bed“-Prinzip basiert. Bei diesem Prinzip bewegt sich die stationäre Phase entgegengesetzt zur mobilen Phase und ist somit im wörtlichen Sinn nicht stationär wie bei der herkömmlichen Chromatographie. Durch diese entgegengesetzte Bewegung können zwei Reinsubstanzen bzw. Substanzgemische isoliert werden. Bei genau eingestelltem Adsorptionsgleichgewicht verringert sich der bei chromatographischen Methoden sonst übliche Substanzverlust auf ein Minimum (< 5%).

Eine bewegliche feste Phase ist technisch gesehen schwer umsetzbar, in der Anwendung wird sie daher simuliert. Daraus ergibt sich der Name SMB-Chromatographie. Die bewegliche feste Phase wird durch den Einsatz von mehreren präparativen HPLC-Säulen erzeugt, die sich in einem Kreislauf befinden und durch eine periodische Ventilschaltung eine Bewegung simulieren, die entgegengesetzt zur Fließrichtung der mobilen Phase ist.

Dem System werden kontinuierlich „feed“-Lösung, welche die zu trennenden Verbindungen enthält, und Eluentlösungen zugeführt, während kontinuierlich Raffinatlösung, die den zu gewinnenden Wertstoff enthält, und Extraktlösung, die Verunreinigungen enthält, entnommen werden. Dadurch wird die SMB-Chromatographie in vier verschiedene Trennzonen unterteilt. Im SMB-Prozess wird der Eluent über Trennsäulen geführt, die gleichmäßig in diesen vier Zonen verteilt sind. Durch das periodische Weiterschalten durchläuft jede Chromatographiesäule jede Zone einmal pro Zyklus. Die „feed“-Lösung wird zwischen den Zonen 2 und 3 aufgegeben; dort erfolgt die eigentliche Trennung (Abb. 53 und Abb. 54). Die Zonen 1 und 4 werden als Regenerationszonen angesehen und dienen zum Ausschleusen der Raffinat- und der Extraktlösung.



**Abb. 53:** Aufbau der SMB-Chromatographie-Anlage (Fa. Knauer C9116 mit acht Trennsäulen), abgeändert nach Knauer-Produktprospekt C9116



**Abb. 54:** Konzentrationsprofile in der SMB-Chromatographie (Fa. Knauer, C9116 mit acht Trennsäulen), abgeändert nach Knauer-Produktprospekt C9116

Die für das SMB-Prinzip wichtigen Parameter sind neben der periodischen Änderung der Säulenpositionen die unterschiedlichen Flussraten in den vier Zonen. Diese Flussraten werden durch vier Pumpen geregelt. Die Extrakt-Pumpe in Zone 2 und die Raffinat-Pumpe in Zone 4 befinden sich innerhalb, die Eluent- und die „feed“-Pumpe hingegen außerhalb des Säulenkreises. Die Flussraten der Produktauslässe werden durch zwei Flussmesser kontrolliert. Eine Feinregelung wird durch zwei Nadelventile ermöglicht, die das Verhältnis zwischen Zyklusstrom und Auslassstrom verändern.

Da es sich beim SMB-Prozess um einen kontinuierlichen Prozess handelt, wird die benötigte Menge an Lösungsmittel im Gegensatz zur klassischen Chromatographie deutlich reduziert. Ebenfalls von Vorteil ist, dass während des Prozesses die gesamte feste Phase für die Trennung benutzt werden kann. Dies steigert zum einen die Effizienz der Trennung und vermindert zum anderen die benötigte Eluent-Menge. Ist das Adsorptionsgleichgewicht einmal eingestellt, verändert sich die Zusammensetzung der Raffinat- und der Extraktlösung nicht mehr, sofern die einzelnen Parameter nicht verändert werden. Dies verringert die Anzahl der In-Prozess-Kontrollen auf ein Minimum.<sup>104</sup>

### Anwendung zur Reinigung von Dronabinol

Das Verfahren zeigt deutliche Vorteile gegenüber den kosten- und arbeitsintensiven Methoden, die momentan in der Industrie eingesetzt werden. Die dem beschriebenen Prozess

am nächsten gelegenen Verfahren sind chromatographische Reinigungsmethoden: Verschiedene Patentanmeldungen beschreiben Methoden in denen Normalphasenchromatographie<sup>105</sup> oder Umkehrphasenchromatographie<sup>106</sup> für die Herstellung verwendet werden. Auch eine chirale HPLC-Methode<sup>107</sup>, die die Trennung von (-)- und (+)- $\Delta^9$ -THC beschreibt, und eine Methode die überkritische Flüssigkeiten zur Extraktion verwendet<sup>108</sup> sind in Patentanmeldungen beschrieben. Allen genannten Verfahren ist gemeinsam, dass sie nicht kontinuierlich betrieben werden und ihr Durchsatz pro Zeit gegenüber der SMB-Reinigung daher deutlich unterlegen ist.

### Ergebnisse der Reinigung von Dronabinol mittels SMB-Chromatographie

Das aus dem SMB-Prozess anfallende Dronabinol-Gemisch (Raffinat) hat die in Tab. 16 und Anhang 2 dargestellte Zusammensetzung.

**Tab. 16:** Zusammensetzung von drei SMB-Chargen von Dronabinol nach SMB-Reinigung

Substanz	RT [min]	Versuchs-Nr. mit Gehalt [Flächen-%]		
		1	2	3
Olivetol	2,8	1,1	1,1	1,3
CBD	8,5	0,4	0,4	0,5
Dronabinol	14,8	97,9	97,3	97,3
Exo-THC	15,6	n. d.	n. d.	n. d.
$\Delta^8$ -THC/ Iso-THC	17,0	0,05	0,04	0,06

Nach dem Einstellen des Adsorptionsgleichgewichts konnte die Raffinat-Phase (Dronabinol-Lösung) kontinuierlich gesammelt werden. Waren ausreichende Mengen (min. 350 ml) erreicht, wurde die erhaltene Dronabinol-Fraktion einer weiteren Aufarbeitung unterzogen. Hierbei wurde das Lösungsmittel destillativ in schwachem Vakuum bei 30 °C auf ca. 30% reduziert und das Gemisch zweimal mit Cyclohexan (Mischung 1:1 (m/m)) extrahiert. Das enthaltene Olivetol verblieb in der wässrigen Phase, während Dronabinol in die Cyclohexan-Phase übergang. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels wurde Dronabinol in einem Gehalt von > 99% bei einem Restlösungsmittelgehalt von unter 1000 ppm erhalten.

Mit dem beschriebenen SMB-Verfahren kann Dronabinol kontinuierlich in einer Menge von 0,15 g/h mit einer Reinheit von > 95% gewonnen werden. Dies entspricht einer Tageshöchstmenge von 3,6 g im Labormaßstab.

Nach der Extraktion mit Cyclohexan und der destillativen Entfernung der Lösungsmittel ergab sich hochreines Dronabinol (Tab. 17, Anhang 3).<sup>109</sup>

**Tab. 17:** Zusammensetzung von drei mittels SMB gereinigten Chargen von Dronabinol nach Cyclohexan-Extraktion und destillativer Aufarbeitung

Substanz	RT [min]	Versuchs Nr. mit Gehalt [Flächen-%]		
		1	2	3
Olivetol	2,8	n. d.	n. d.	n. d.
CBD	8,5	0,4	0,6	0,4
U1	14,0	0,4	0,4	0,4
<b>Dronabinol</b>	<b>14,8</b>	<b>96,6</b>	<b>96,1</b>	<b>99,2</b>
Exo-THC	15,6	n. d.	n. d.	n. d.
Δ8-THC/ Iso-THC	17,0	n. d.	n. d.	n. d.

Durch die SMB-Extraktion konnten alle Verunreinigungen auf einen monographiekonformen (USP 37) Gehalt abgereichert werden. Interessanterweise trat nach der finalen destillativen Aufarbeitung aus Cyclohexan eine weitere Verunreinigung (U1) (bei 14,033–14,050 min) auf, die bisher weder gegen Standard quantifiziert noch identifiziert werden konnte. Ihr Gehalt (ca. 0,4 Flächen-%) dürfte jedoch ebenfalls innerhalb der Grenzen der Monographie ( $\leq 1\%$  (m/m) gegen Dronabinol-Standard) liegen. Trotz dieser Verunreinigung entspricht das Dronabinol den Anforderungen der USP, da diese „andere Verunreinigungen“ mit einer Gesamtmenge von bis zu 1% erlaubt.

### 3.2.5 Gehalt

Die Analytik nach USP ergab für die so hergestellten Chargen – nach vollständiger Reinigung – Gehalte von regelmäßig  $> 95\%$  (m/m). Abb. 55 zeigt die Gehalte über vier Herstellungszyklen (vier unabhängige Versuche) und 11 gefertigte Labor-Chargen.

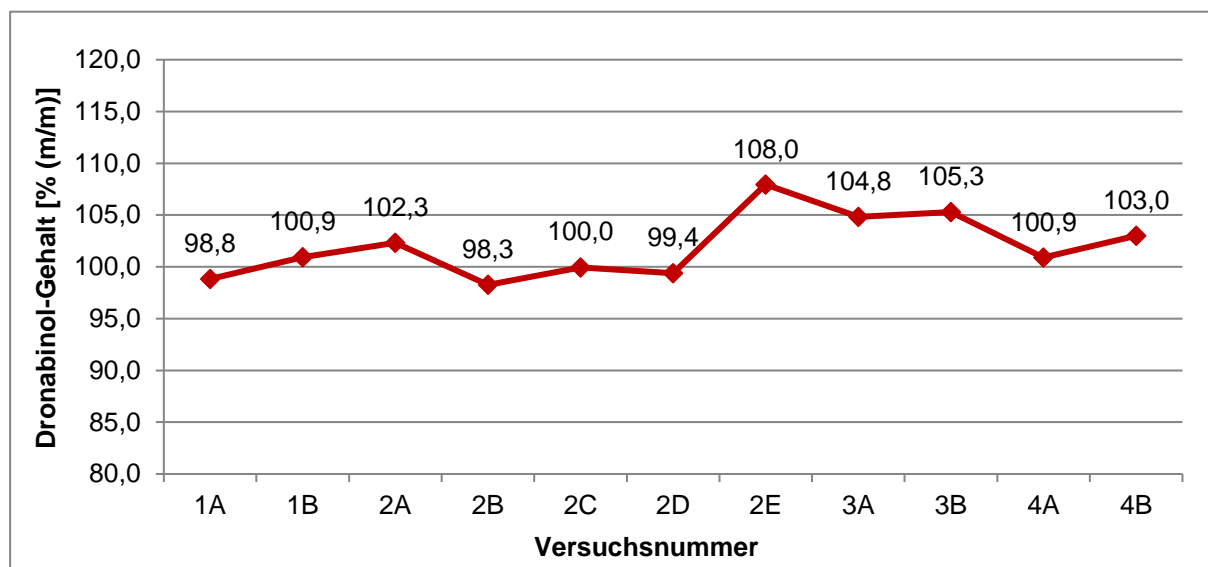


Abb. 55: Dronabinol-Gehalt in vier Herstellungszyklen (vier unabhängige Versuche) und 11 Chargen

Das nach SMB-Reinigung erhaltene Dronabinol zeigt eine Übereinstimmung des Drehwerts mit dem Literaturwert. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung ergab eine Übereinstimmung mit Literaturdaten<sup>99</sup> des enantiomerenreinen Dronabinols (siehe 6.3.1).

Durch Betrachtung der Kopplungskonstanten an den chiralen Zentren  $C_{6a}$  und  $C_{10a}$  kann auf die Konfiguration geschlossen werden. Das Proton an  $C_{10a}$  erscheint bei  $\delta = 3,20$  ppm als Dublett vom Pentett mit Kopplungskonstanten  $J = 10,6$  und  $2,5$  Hz und das Proton an  $C_{6a}$  bei  $1,68$  ppm als Dublett vom Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten  $J = 12,7$ ,  $11,1$  und  $2,2$  Hz. Durch Vergleich mit tabellierten Werten für trans-ständige Wasserstoffatome (am Sechsring-Gerüst  $J = 10$ – $12$  Hz) gegenüber Werten für cis-ständige Kopplungskonstanten ( $J = 2$ – $5$  Hz) kann auf die trans-Konfiguration geschlossen werden.<sup>110</sup> In Verbindung mit dem gefundenen Drehwert kann daher von (–)-trans- $\Delta^9$ -THC (Dronabinol) ausgegangen werden.

### 3.2.6 Ergänzung zu den physikochemischen Eigenschaften von Dronabinol

Auch bei Reinheitsgraden von  $> 99\%$  ließ sich Dronabinol im Rahmen dieser Arbeit nicht kristallisieren. Zwar waren bei sehr hoher Reinheit ( $> 99,5\%$  (m/m)) und geringer

Schichtdicke zeitweise nadelartige Kristalle zu erkennen, jedoch war je nach Temperatur der Großteil der erhaltenen Masse immer harzartig oder zähflüssig (Abb. 56).



**Abb. 56:** Dronabinol in gasdichter Spritze

In orientierenden Versuchen färbte sich Dronabinol (ca. 100 mg analytischer Standard der Fa. THC Pharm) bei Kontakt mit Luft und Tageslicht je nach Schichtdicke über Violett zu Hellbraun bis Schwarz, was Beobachtungen von Gaoni et al.<sup>64</sup> entspricht. Vermutlich reagiert es mit dem Luftsauerstoff unter Bildung eines intensiv gefärbten Farbstoffes (Abb. 57).



**Abb. 57:** Verfärbung von Dronabinol unter Normalatmosphäre; v. l. n. r: t = 0 min, t = 20 min, t = 40 min

Die Lagerung muss also lichtgeschützt bei 2–15 °C unter Inertgas erfolgen.<sup>55</sup> Hierbei sei erwähnt, dass sich Stickstoff weniger eignet als Argon, da er leichter als Luft ist und somit aus Gefäßen entweichen kann. Es empfiehlt sich, Argon mit einem besonders niedrigen Sauerstoffanteil zu verwenden, da es sonst zu den beschriebenen Oxidationsprozessen kommt.

### 3.3 Cannabidivarin

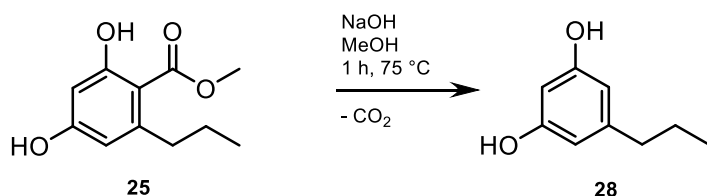
Die bereits beschriebene Cannabidivarin-Synthese von Vollner et al.<sup>93</sup> und Crombie et al.<sup>94</sup> wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgearbeitet. Bei der Synthese wurde Dichlormethan als Lösungsmittel verwendet und mit para-Toluolsulfonsäure gesättigt. Die Reaktion ist jedoch wenig selektiv. Das Verhältnis von CBDV zu dem an 4 bzw. 6 substituierten Produkt beträgt 32%:30%. Außerdem entstand bei höheren Temperaturen  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabivarin (THCV) in einer Konzentration von 26%, was industriell unwirtschaftlich ist.<sup>72</sup>

Zur Herstellung von CBDV wurde Menthandienol G mit Divarincarbonsäuremethylester (DM) unter Lewis-Säure-Katalyse gekuppelt (Abb. 59). Anschließend wurde der CBDV-Ester verseift und decarboxyliert (Abb. 61).

#### 3.3.1 Divarincarbonsäuremethylester und Divarin

DM (**25**) gehört wie OM zur Substanzklasse der Resorcylsäureester. Der Divarinester trägt als Seitenkette an C<sub>5</sub> eine Propyl- anstatt einer Pentyl-Gruppe und kann damit in die homologe Reihe mit dem OM geordnet werden.

DM kann über eine vierstufige Synthese<sup>111</sup> hergestellt werden (Abb. 28): Zunächst wird n-Butyraldehyd in einer Aldolkondensation mit Aceton zu 3-Hepten-2-on umgesetzt.<sup>98</sup> Dieses wird in einer Esterkondensation mit Dimethylmalonat zum Dihydro-Derivat **26** cyclisiert, welches anschließend mit Acetanhydrid und Schwefelsäure zum Diacetat **27** oxidiert wird. Danach wird mit Natriummethanolat in MeOH umgeestert, wodurch man **25** erhält. Die Kristallisation ist aus Toluol möglich. Schlussendlich kann der Ester **25** basisch gespalten und der Aromat decarboxyliert werden. Ebenfalls aus toluolischer Lösung erhält man Divarin (**28**) als weißes Kristallinat (Abb. 58).

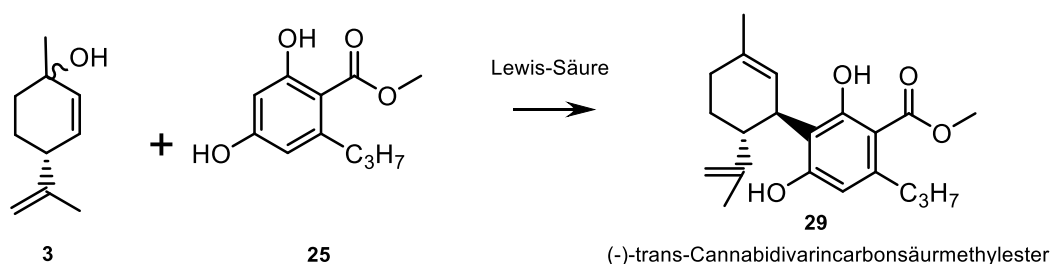


**Abb. 58:** Synthese von Divarin aus Divarincarbonsäuremethylester (DM)



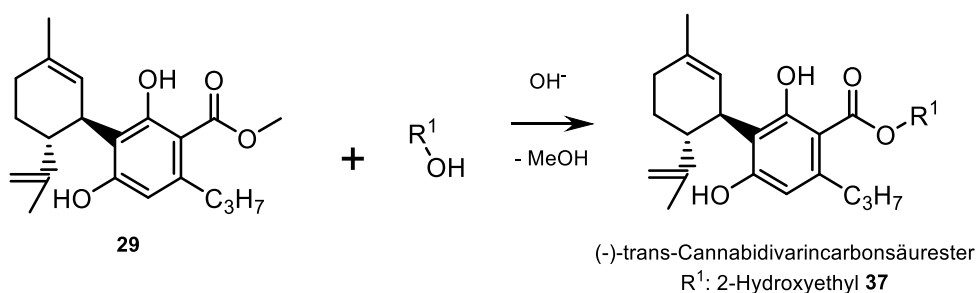
### 3.3.2 Kontinuierliche Synthese von Cannabidivarin

Für die kontinuierliche Kupplung von (+)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol (**3**) (Menthadienol G) und DM (**25**) wurde der in 3.1.4 und 6.2 beschriebene Versuchsaufbau verwendet. In diesem ersten Schritt wurden die Edukte mit  $\text{BF}_3$ -Etherat in Toluol zu (-)-trans-Cannabidivarin-carbonsäuremethylester (**29**) gekuppelt (Abb. 59).



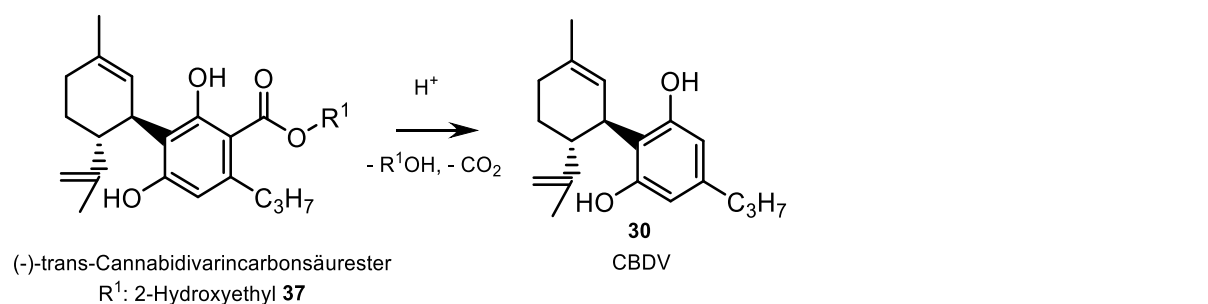
**Abb. 59:** Synthese von (-)-trans-Cannabidivarin-carbonsäuremethylester aus (+)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol und Divarin-carbonsäuremethylester

Im zweiten Schritt wurde durch Umesterung mit Ethylenglykol 2-Hydroxyethylcannabidivarinolat (**37**) hergestellt (Abb. 60). Dazu wurde das Lösungsmittel abdestilliert, ein Überschuss des entsprechenden Alkohols zugegeben, mit dem **29** basisch zum jeweiligen (-)-trans-Cannabidivarin-carbonsäureester umgesetzt wurde. Das entstehende MeOH wurde kontinuierlich abdestilliert und somit das Gleichgewicht auf die Seite des Produktes verschoben.



**Abb. 60:** Synthese von (-)-trans-Cannabidivarin-carbonsäureestern aus (-)-trans-Cannabidivarin-carbonsäuremethylester durch Umesterung

Im dritten Schritt wurde aus dem gebildeten (-)-trans-Cannabidivarin-carbonsäureester **37** durch alkalische Verseifung und Decarboxylierung schließlich CBDV (**30**) synthetisiert (Abb. 61).



**Abb. 61:** Synthese von CBDV aus (-)-trans-Cannabidivarin carboxylateestern

### 3.3.3 Optimierung der Reaktionsparameter

Analog zur Synthese von CBD wurde Toluol als Lösungsmittel verwendet. Die Reaktionsbedingungen für die kontinuierliche Synthese wurden wie folgt festgelegt: Gesamtfluss von 93 ml/min, Rührergeschwindigkeit 1100 U/min, Schlauchlänge 2,5 m (Austritt aus Reaktionszelle bis Einleitung in die NaHCO<sub>3</sub>-Lösung). Daraus ergibt sich eine mittlere Verweilzeit  $t_M$  von ca. 11,5 s nach folgender Formel:

$$t_{M(A)} = \frac{\text{Volumen Reaktionsrohr } (\pi r^2 \cdot L)}{\text{Dosiervolumen}} = \frac{0,071 \cdot 250 \text{ cm}^3}{93 \frac{\text{cm}^3}{\text{min}}} = 0,19 \text{ min}$$

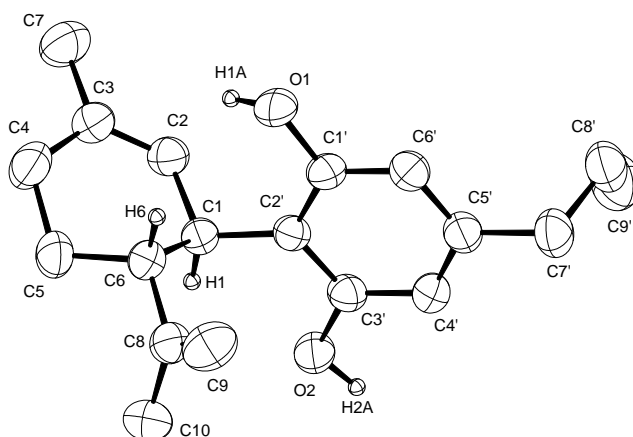
Bei diesen optimierten Bedingungen konnte eine Ausbeute von 30% erreicht werden.



**Abb. 62:** CBDV-Kristalle

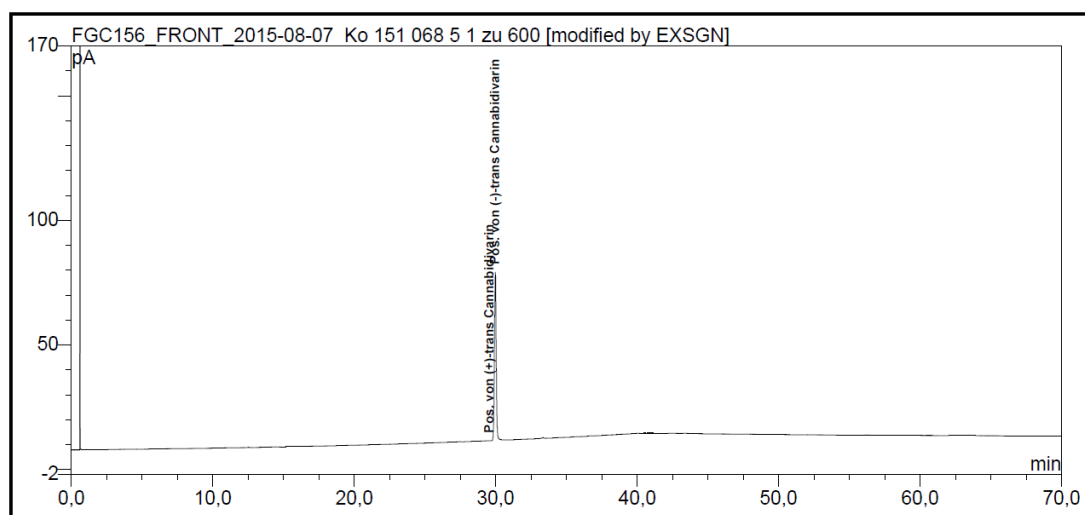
Für eine Röntgeneinkristallstrukturanalyse wurden CBDV-Kristalle gezüchtet (Abb. 62). Zwar konnte die Molekülstruktur bezogen auf die Diastereomere bestätigt werden – die Wasserstoffatome an den beiden Stereozentren im Cannabidivarin stehen trans zueinander, womit die relative Konfiguration festliegt – eine Bestimmung der absoluten Konfiguration anhand der anomalen Dispersion war aufgrund der Datenqualität jedoch nicht möglich, da

keine geeigneten Kristalle gezüchtet werden konnten. Die absolute Konfiguration der beiden Stereozentren in CBDV konnte damit nicht eindeutig bestimmt werden. Diese könnte demnach auch (+)-1S,6S sein, nicht jedoch die eines der beiden cis-Diastereomere, z.B. 1S,6R. Berücksichtigt man zusätzlich den gemessenen Drehwert von  $[\alpha]_D^{25,0} = -134^\circ$  (EtOH, 96%) (siehe Kap. 3.3.4), entspricht die Konfiguration aber 1R,6R und damit der von (-)-trans-CBDV. Weitere Details zur Strukturanalyse sind Tab. 34 zu entnehmen.



**Abb. 63:** Molekülstruktur von CBDV mit einem kristallographisch unabhängigen Molekül gemäß Röntgeneinkristallstrukturanalyse. Wasserstoffatome mit Ausnahme der Hydroxylprotonen und der Wasserstoffatome an den Chiralitätszentren sind nicht abgebildet. Die anisotropen Auslenkungsparameter sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 30% dargestellt.

Die Stereochemie wurde weiter mittels chiraler GC untersucht. Die Konfigurationen an C<sub>1</sub> und C<sub>6</sub> konnten durch den Vergleich mit dem Antipoden (+)-trans-CBDV als (-)-trans bewiesen werden (Abb. 64).



No.	Ret.Time min	Ret.Index	Area pA*min	Type	Rel.Area %	Peak Name
1	12,518	n.a.	0,014	BMB	0,144	n.a.
2	29,575	n.a.	0,000	BMB*	0,000	Pos. von (+)-trans Cannabidivarin
3	29,970	n.a.	9,859	BMB	99,518	Pos. von (-)-trans Cannabidivarin
4	33,298	n.a.	0,033	BMB	0,338	n.a.
Total:			9,907		100,000	

**Abb. 64:** GC-Chromatogramm von (-)-trans-CBDV. Die RT von (+)-trans-CBDV ist angegeben.

### 3.3.4 Reinheit

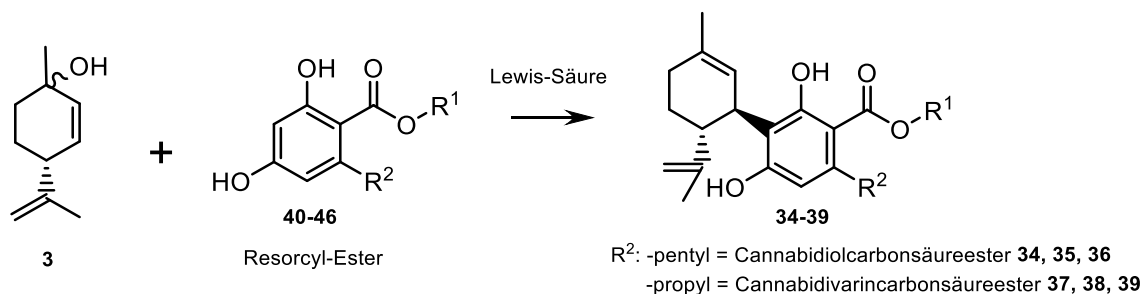
Nach Kristallisation und Trocknung lag CBDV in einer Reinheit von > 99% vor. Es ließ sich in einer HPLC-Untersuchung (Methode B) keine Verunreinigung detektieren.

Das so hergestellte CBDV hat eine spezifische Drehung von  $[\alpha]_D^{25,0} = -134^\circ$  (EtOH, 96%) und stimmt damit in etwa mit der Literaturangabe von  $[\alpha]_D^{20,0} = -139,5^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>)<sup>93</sup> überein. In der Literaturstelle wird das CBDV allerdings als farbloses Öl beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte CBDV recht gut kristallisiert werden und fiel dann als leicht gelbliches feinkristallines Pulver an.

Während die NMR-spektroskopischen Daten weitestgehend mit den Daten von Vollner et al.<sup>93</sup> übereinstimmen, weichen die gemessenen Werte des Infrarot(IR)-Spektrums von der Literatur ab. Vollner et al.<sup>93</sup> geben eine Bande bei 3600 cm<sup>-1</sup> an, die typisch für Hydroxyl-Gruppen wäre. Diese Bande konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht verifiziert werden. Jedoch wurde Extinktion bei 3365 cm<sup>-1</sup> festgestellt, was für über Wasserstoff-überbrückte-OH Gruppen spricht. Die Banden, die von Vollner et al.<sup>93</sup> im Fingerprint-Bereich bei 1015 und 885 cm<sup>-1</sup> angegeben werden, gehen in einer ganzen Anzahl von Banden auf, die jeweils im Bereich zwischen 972 und 1087 bzw. 805 und 891 cm<sup>-1</sup> liegen.

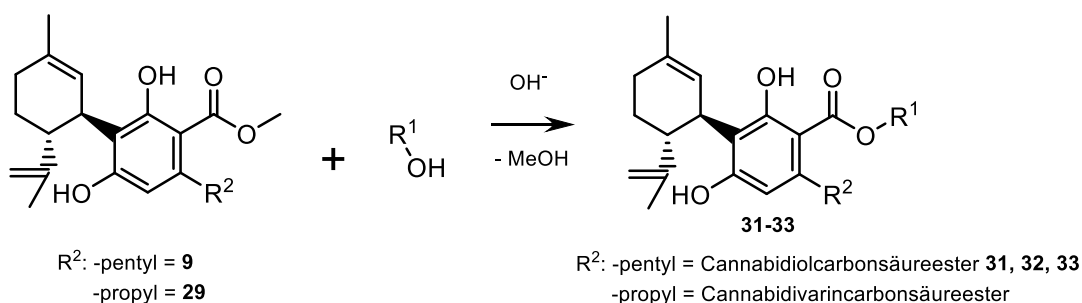


Die Herstellung neuer CBD-Derivate und CBDV-Derivate ist einerseits durch vorherige Synthese des entsprechenden Olivetol- bzw. Divarincarbonsäureesters (**40–46**) und anschließender Friedel-Crafts-Alkylierung im ersten Schritt möglich (Abb. 66, siehe auch 3.1.4 und 3.3.2).



**Abb. 66:** Synthese neuer Cannabinoide durch Friedel-Crafts-Alkylierung

Andererseits kann zunächst ein CBD- oder CBDV-Ester mit einer günstigen Abgangsgruppe (z.B. MeOH) aufgebaut werden und dann im zweiten Schritt der Synthese in einem Überschuss des gewünschten Alkohols zum neuen Derivat umgeestert werden (Abb. 67).



**Abb. 67:** Synthese neuer Cannabinoide durch Umesterung

Beide Möglichkeiten wurden genutzt, um die Cannabinoide in Tab. 19 herzustellen.

**Tab. 19:** Neue CBD- und CBDV-Derivate

$R^2$	Nr.	$R^1$	Abkürzung	Strukturformel
-pentyl (CBD-Derivate)	<b>31</b>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH 2-Hydroxyethyl-	2-HEC	
	<b>32</b>	-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> 2-Hydroxypentyl-	2-HPC	

	<b>33</b>	-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> -OH 2,3-Dihydroxypropyl-	G CBD		
	<b>34</b>	-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> Cyclohexyl-	CHC		
	<b>35</b>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> n-Hexyl-	HC		
	<b>36</b>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-SO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> 2-(Methylsulfonamido)ethyl-	NMSC		
	-propyl (CBDV-Derivate)	<b>37</b>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH 2-Hydroxyethyl-	2-HECBDV	
		<b>38</b>	-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> Cyclohexyl-	CHCBDV	
<b>39</b>		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> n-Hexyl-	HCBDV		

Für die weiß hinterlegten Substanzen wurde die zuerst genannte Methode verwendet und für die grau unterlegten Substanzen die zweite Methode.

Für die hergestellten Derivate wurde der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient berechnet.<sup>112,113</sup> In Tab. 20 sind die Substanzen nach zunehmender Lipophilie geordnet.

**Tab. 20:** logP-Werte neuer Cannabinoide

Nr.	Abkürzung	logP
<b>36</b>	NMSC	3,84
<b>37</b>	2-HECBDV	4,38
<b>33</b>	G CBD	4,68
<b>31</b>	2-HEC	5,21
<b>32</b>	2-HPC	6,43
<b>38</b>	CHCBDV	6,44
<b>39</b>	HCBDV	6,97
<b>35</b>	HC	7,28
<b>34</b>	CHC	7,81

### **3.5 Zellassay-basierte pharmakologische Charakterisierung neuer Cannabinoide**

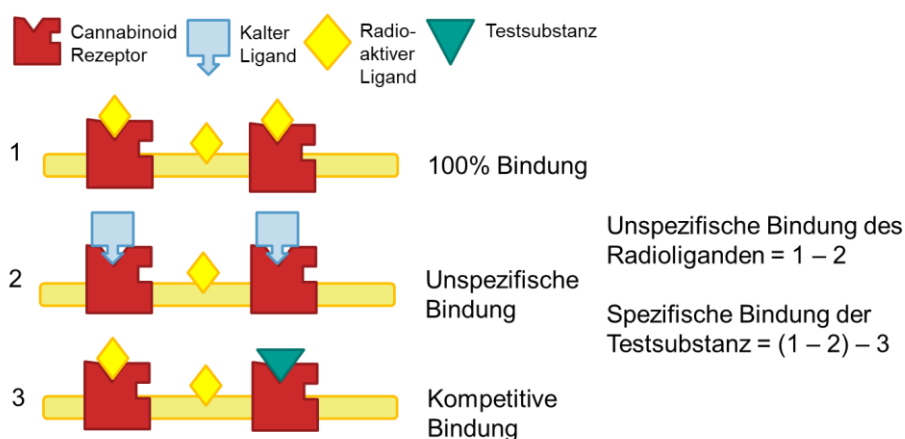
Die in 6.5 beschriebenen Stoffe wurden in den nachfolgend aufgeführten Modellen bezüglich ihrer Bindungsaffinität und ihres Bindungsprofils (Selektivität für einen der beiden Cannabinoid-Rezeptoren) untersucht, sowie hinsichtlich zytotoxischer Wirkungen. Im nicht zytotoxischen Konzentrationsbereich wurde ihre intrinsische Aktivität an CB1- und CB2-Rezeptoren (in immortalisierten „Chinese Hamster Ovary“ (CHO)-Zellen) bestimmt.<sup>72</sup> Da sich die meisten CBD-Derivate als selektive Agonisten an CB2 auszeichneten, wurde ihre Wirkung in CB2-Rezeptor-exprimierenden Zellkulturen (Jurkat-T-Zellen, RAW264.7-Makrophagen) und in primären Zellen (Monozyten) näher charakterisiert.

Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Fa. VivaCell, Freiburg, Herrn Dr. Bernd Fiebich, der Fa. VivaCell España SL, Cordoba, dem Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Arbeitskreis Prof. Eduardo Muñoz, und dem Instituto Universitario de Investigación Neuroquímica, CIBERNED y IRYCIS, Universidad Complutense de Madrid, Arbeitskreis Prof. Dr. José Javier Fernández Ruiz, durchgeführt.

#### **3.5.1 Bindungsaffinität von CBD- und CBDV-Derivaten zu CB1- und CB2-Rezeptoren**

Zur Messung der Bindungsaffinität wurde die humane Zelllinie (HEK293EBNA) verwendet, in die mittels cDNA CB1- und CB2-Rezeptoren transfiziert und exprimiert worden waren. Die Zellen wurden mit einem radioaktiven Liganden ( $[^3\text{H}]$ -CP55940) und den Testsubstanzen inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit einem (kalten, nicht radioaktiven) starken Liganden WIN55212-2 (WIN) bestimmt, der in Anwesenheit des radioaktiven Liganden im Überschuss zugegeben wurde. Die 100%ige Bindung des radioaktiven Liganden an die Membran wurde bestimmt, indem dieser in Abwesenheit anderer Komponenten mit der Membran inkubiert wurde. Die unspezifische Bindung wurde jeweils subtrahiert, um die spezifische Bindung zu erhalten (Abb. 68).





**Abb. 68:** Schema der Untersuchung der Bindungsaffinität zu CB1- und CB2-Rezeptoren, abgeändert nach Di Marzo et al.<sup>114</sup> und Granja et al.<sup>115</sup>

Im Falle, dass die Bindungsaffinität der Testsubstanzen nachgewiesen wurde, wurde anhand eines funktionellen Assays (siehe Kap. 3.5.2.2 und 3.5.2.3) deren intrinsische Aktivität in Cannabinoid-Rezeptor-transfizierten Zellen untersucht.

### 3.5.1.1 Bindungsaffinität von Cannabidiol-Derivaten

Die Bewertung der Komponenten wurde in zwei Phasen vollzogen. Die erste Phase bestand aus einem einfachen Vortest, in dem jeweils eine hohe Konzentration jeder Testsubstanz (40  $\mu\text{mol/mol}$ ) appliziert wurde. Gesammelt wurden die Daten von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils drei Messungen beinhalteten. Nur diejenigen Testsubstanzen, die den Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]-CP55940 (0,1 nmol/l für CB1 und 0,15 nmol/l für CB2) zu mehr als 50% verdrängen konnten, wurden für die zweite Phase verwendet. Die Testsubstanzen wurden dafür in einer Konzentration von 40  $\mu\text{mol/l}$  appliziert.

Die zweite Phase bestand aus einem kompetitiven Bindungstest, in dem Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanzen im Bereich von  $10^{-4}$ – $10^{-11}$  mol/l getestet wurden. Die nachfolgenden Daten basieren auf drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messungen.

Tab. 21 gibt die prozentualen Werte für die Bindung an CB1 und CB2, die Dissoziationskonstante  $K_i$  für den jeweiligen Rezeptor sowie die Selektivität an.  $K_i$  ist als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Im Vergleich dazu zeigt WIN (Positivkontrolle) eine Dissoziationskonstante von  $28,8 \pm 41$  nmol/l für CB1 und

$3,7 \pm 1$  nmol/l für CB2 und entspricht damit den Literaturwerten. Zum Vergleich ist der Literaturwert von  $\Delta^9$ -THC angegeben.<sup>12</sup>

Die Testsubstanzen binden im nanomolaren Bereich und damit in physiologischen Konzentrationen spezifisch an die Cannabinoid-Rezeptoren. Mit Ausnahme von NMSC (**36**), CHCBDV (**38**) und HCBDV (**39**) sind sie schwache Liganden an CB1-Rezeptoren und binden vorzugsweise an CB2-Rezeptoren. Ihre Selektivität für CB2-Rezeptoren prädestiniert sie für den Einsatz als CB2-Rezeptor-Modulatoren.

**Tab. 21:** Prozentuale Bindung, Dissoziationskonstanten und Selektivität (jeweils  $\pm$  SEM) von CBD-Derivaten für CB1- und CB2-Rezeptoren; geordnet nach der Selektivität für CB2-Rezeptoren.

Testsubstanz	CB1-Bindung [%]	CB2-Bindung [%]	K <sub>i</sub> CB1 [nmol/l]	K <sub>i</sub> CB2 [nmol/l]	Selektivität CB2/CB1
HC ( <b>35</b> )	81,5 $\pm$ 6,8	99,2 $\pm$ 2,3	2500 $\pm$ 900	67 $\pm$ 4	37,3
NMSC ( <b>36</b> )	98,9 $\pm$ 7,8	104,9 $\pm$ 4,8	270 $\pm$ 40	12 $\pm$ 1	22,5
2-HEC ( <b>31</b> )	77,3 $\pm$ 6,5	90,3 $\pm$ 2,4	3923 $\pm$ 1547	374,5 $\pm$ 47,7	10,5
2-HPC ( <b>32</b> )	82,0 $\pm$ 8,0	83,9 $\pm$ 5,6	538,2 $\pm$ 53,9	66,7 $\pm$ 13,1	8,1
GCBD ( <b>33</b> )	90,2 $\pm$ 3,8	101,6 $\pm$ 0,5	2174 $\pm$ 1149	277,1 $\pm$ 78,7	7,8
CHC ( <b>34</b> )	92,2 $\pm$ 1,7	97,2 $\pm$ 3,4	870 $\pm$ 100	510 $\pm$ 290	1,7
WIN	–	–	28,8 $\pm$ 41	3,7 $\pm$ 1	–
$\Delta^9$ -THC <sup>12</sup>	–	–	5,05–80,3	3,31–75,3	–

NMSC (**36**) sticht durch seine starke Bindung an beide Cannabinoid-Rezeptoren heraus. Die Substanz bindet mit vergleichbarer Stärke an CB2 wie WIN und  $\Delta^9$ -THC. Sie zeigt gleichzeitig denselben Trend wie die strukturverwandten CBD-Derivate und hat eine 22,5-fache Selektivität für CB2.

### 3.5.1.2 Bindungsaffinität von Cannabidivarin-Derivaten

Mit derselben Vorgehensweise wie in 3.5.1.1 wurde das Bindungsverhalten der CBDV-Derivate untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 22 dargestellt.

**Tab. 22:** Prozentuale Bindung, Dissoziationskonstanten und Selektivität (jeweils  $\pm$  SEM) von CBDV-Derivaten für CB1- und CB2-Rezeptoren; geordnet nach der Selektivität für CB2

Testsubstanz	CB1-Bindung [%]	CB2-Bindung [%]	K <sub>i</sub> CB1 [nmol/l]	K <sub>i</sub> CB2 [nmol/l]	Selektivität CB2/CB1
2-HECBDV ( <b>37</b> )	42,2 $\pm$ 9,6	95,0 $\pm$ 2,8	5649,3 $\pm$ 3896,2	168,2 $\pm$ 39,4	33,6
CHCBDV ( <b>38</b> )	84,9 $\pm$ 4,8	99,9 $\pm$ 0,1	13,2 $\pm$ 0,9	4,62 $\pm$ 0,5	2,9
HCBDV ( <b>39</b> )	93,9 $\pm$ 3,7	98,5 $\pm$ 2,3	8,3 $\pm$ 0,69	9,9 $\pm$ 2,5	0,8
WIN	–	–	28,8 $\pm$ 41	3,7 $\pm$ 1	–
$\Delta$ 9-THC <sup>12</sup>	–	–	5,05–80,3	3,31–75,3	–

### 3.5.1.3 Korrelation zwischen Struktur und Bindungsaffinität

Die hier getesteten CBD- und CBDV-Derivate binden an CB1- und CB2. Das Grundgerüst scheint demnach prinzipiell Affinität zu den Cannabinoid-Rezeptoren zu haben. Die Selektivität für CB2 nimmt dabei in folgender Reihenfolge ab: HC (**35**) > 2-HECBDV (**37**) > NMSC (**36**) > 2-HEC (**31**) > 2-HPC (**32**) > GCBD (**33**) > CHCBDV (**38**) > CHC (**34**) > HCBDV (**39**).

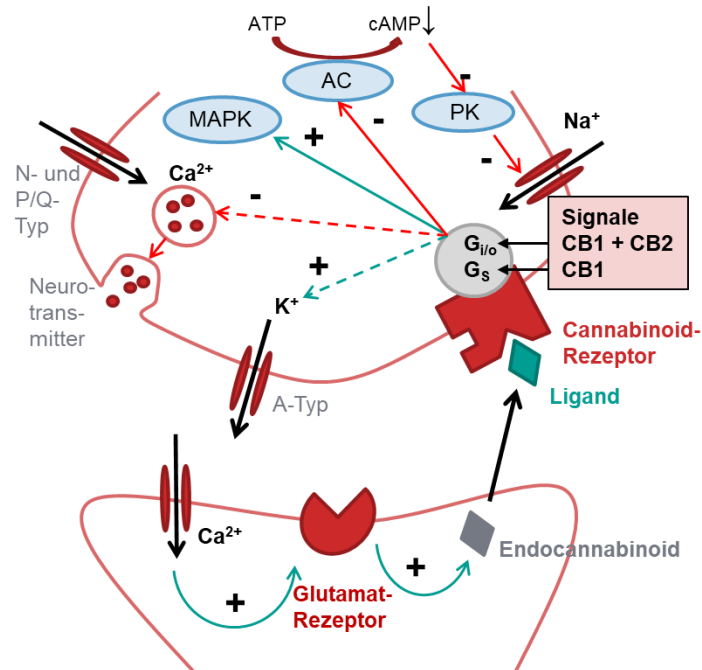
Aus dieser Reihe ist erkennbar, dass die Variation der aliphatischen Seitenkette (Pentyl bei CBD-Derivaten, Propyl bei CBDV-Derivaten) an Position 5 keinen Einfluss auf die Selektivität hat. Ebenfalls ist erkennbar, dass sowohl Derivate mit langen aliphatischen Seitenketten am Ester an Position 6 (HC, (**35**)) als auch diejenigen mit einer polarerer Seitengruppe (2-HECBDV (**37**), NMSC (**36**), 2-HEC (**31**)) eine Selektivität für CB2 haben können.

Sowohl Substanzen mit sterisch rigidem apolarem Rest (CHCBDV (**38**), CHC (**34**)) als auch solche mit weniger rigidem apolarem Rest (HCBDV (**39**)) zeigten moderate bis hohe Affinität zu beiden Cannabinoid-Rezeptoren. Daraus kann aber keine Regel abgeleitet werden, da HC (**35**) – als Substanz mit apolarem Rest – eine starke Selektivität für CB2-Rezeptoren hatte.

Alle drei CBDV-Derivate binden spezifisch und in physiologischen Konzentrationen an die Cannabinoid-Rezeptoren, wobei 2-HECBDV (**37**) eine schwächere Bindung an CB1-Rezeptoren zeigt. 2-HECBDV (**37**) und CBDV zeigen eine höhere Selektivität für CB2. Beim Vergleich mit  $\Delta$ 9-THC zeigt sich, dass CHCBDV (**38**) und HCBDV (**39**) eine ähnliche Bindungsaffinität haben.

### 3.5.2 Messung der intrinsischen Aktivität in einem CB1- bzw. CB2-Rezeptor-transfizierten Hamster-ovarial-Zellmodell

Die komplexe Signalweiterleitung über CB1 und CB2 ist in Abb. 69 dargestellt.

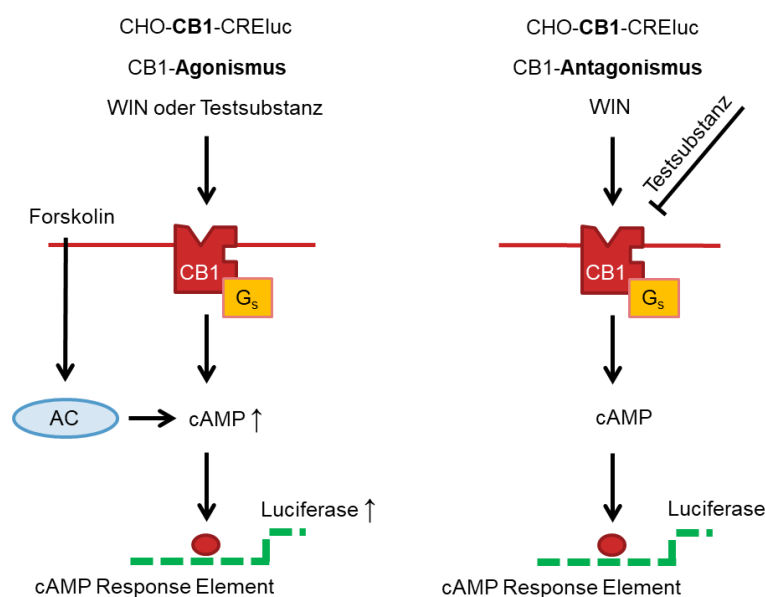


**Abb. 69:** Signalübertragung über CB1- und CB2-Rezeptoren am synaptischen Spalt, abgeändert nach Glass und Felder<sup>16</sup>, Maneuf und Brotchie<sup>17</sup>, Calandra et al.<sup>18</sup>, Jarrahian et al.<sup>19</sup> und Pertwee et al.<sup>32</sup>

Um die Signalweiterleitung zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit CB1- oder CB2-cDNA sowie transient mit dem Plasmid CRE-luc transfiziert, welches die Gene für sechs „consensus cAMP responsive“(CRE)-Elemente und Leuchtkäfer-Luciferase (luc) enthält. Es resultierten folgende transfizierte Zellen: CHO-CB1-CREluc und CHO-CB2-CREluc.

In dem verwendeten Modell bewirkt die Aktivierung von CB2-Rezeptoren über G<sub>i/o</sub> eine verminderte Bildung von cAMP. *In vivo* würde dies primär zu einem verminderten Einstrom von Natrium und damit zu einer verminderten Erregbarkeit der Synapse führen. Die Signalkaskade Adenylatcyclase (AC) → AMP/cAMP → Proteinkinase A wurde in dem verwendeten Modell simuliert, indem das cAMP-responsive Element (CRE) mit einer Luciferase gekoppelt wurde. Letztere führt zur Umwandlung des Substrats Luciferin in Oxyluciferin unter Emission von Licht. Eine Hemmung der cAMP-Produktion (z. B. durch die Aktivierung von CB2-Rezeptoren) führt konsequenterweise zu einer geringeren Chemilumineszenz.<sup>116</sup>

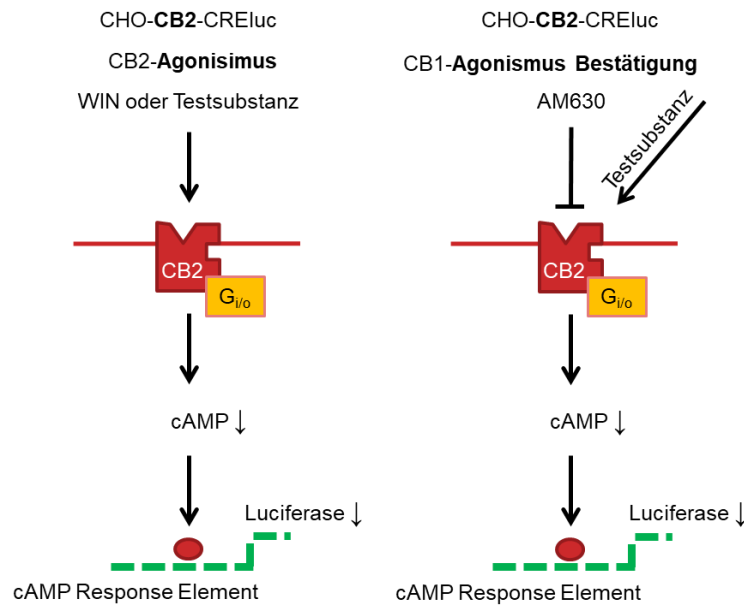
Die Signalweiterleitung durch CB1 kann über  $G_s$  auch zu einer Aktivierung der AC und damit zur Erhöhung von cAMP führen, was zu einer stärkeren Chemilumineszenz führt.<sup>18</sup> Um eine mögliche agonistische Wirkung auf CB1 zu untersuchen, wurden die CHO-CB1-CRELuc-Zellen mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanz stimuliert und die resultierende Chemilumineszenz gemessen (Abb. 70).<sup>117,118</sup> Forskolin (FSK), ein AC-Aktivator, wurde als Positivkontrolle verwendet, da seine Aktivierung des „cAMP pathway“ unabhängig von Cannabinoid-Rezeptoren verläuft. Um eine mögliche antagonistische Wirkung auf CB1-Rezeptoren zu untersuchen, wurden die CHO-CB1-CRELuc-Zellen mit den Testsubstanzen kurz vorinkubiert und dann mit WIN für 6 h stimuliert.



**Abb. 70:** Schema der Testung auf agonistische und antagonistische Effekte auf CB1-Rezeptoren

Um eine mögliche agonistische Wirkung auf CB2 zu untersuchen, wurden CHO-CB2-CRELuc-Zellen mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen für 15 min und dann mit FSK für 6 h inkubiert. Als Positivkontrolle diente hier WIN als klassischer nicht spezifischer Agonist an CB2.

Im Unterschied zur CB1-Aktivierung ( $G_s$ -gekoppelt) führt eine agonistische Wirkung auf CB2 ( $G_{i/o}$ ) zu einer verminderten Bildung von cAMP und damit zu einer geringeren Chemilumineszenz. Im Fall, dass für eine Testsubstanz eine agonistische Wirkung auf CB2 nachgewiesen werden konnte, wurden zur Bestätigungen CHO-CB2-CRELuc-Zellen mit dem inversen Agonisten AM630 (6-Iodopravadolin) vorinkubiert und dann mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanz versehen (Abb. 71).<sup>119,120</sup>



**Abb. 71:** Schema der Testung auf agonistische Effekte auf CB2-Rezeptoren

Anhand der gemessenen Aktivität wurde eine Einordnung der Substanzen in Agonisten und Antagonisten vorgenommen.

$G_{i/o}$ -gekoppelte Cannabinoid-Rezeptoren aktivieren in der Regel schnelle A-Typ-Kaliumkanäle sowie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK). Sie hemmen N-Typ- und P/Q-Typ-Calciumkanäle (vgl. Abb. 69).<sup>32</sup> Diese Funktionen wurden in dem Modell nicht untersucht.

### 3.5.2.1 Zytotoxizität in CHO-Zellen

Die zytotoxischen Effekte der Testsubstanzen wurden mit einem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test in CHO-Zellen bestimmt. Der Nachweis der Zellviabilität beruht dabei auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen MTT in ein blauviolettes, wasserunlösliches Formazan (Abb. 72).

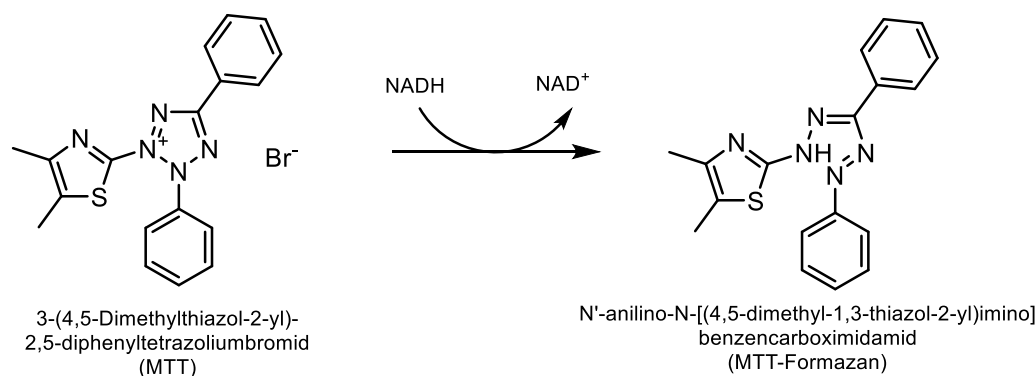


Abb. 72: Reaktion von MTT zu MTT-Formazan nach Riss et al.<sup>121</sup>

Die getesteten CBD-Derivate hatten im Bereich von 0,5–5  $\mu\text{mol/l}$  nur einen geringen Einfluss auf die Zellviabilität (Abb. 73). Moderate zytotoxische Effekte traten erst bei Konzentrationen von  $> 10 \mu\text{mol/l}$  auf. Daher wurde für die weiteren Tests als obere Grenzkonzentration die Dosis von  $10 \mu\text{mol/l}$  festgelegt.

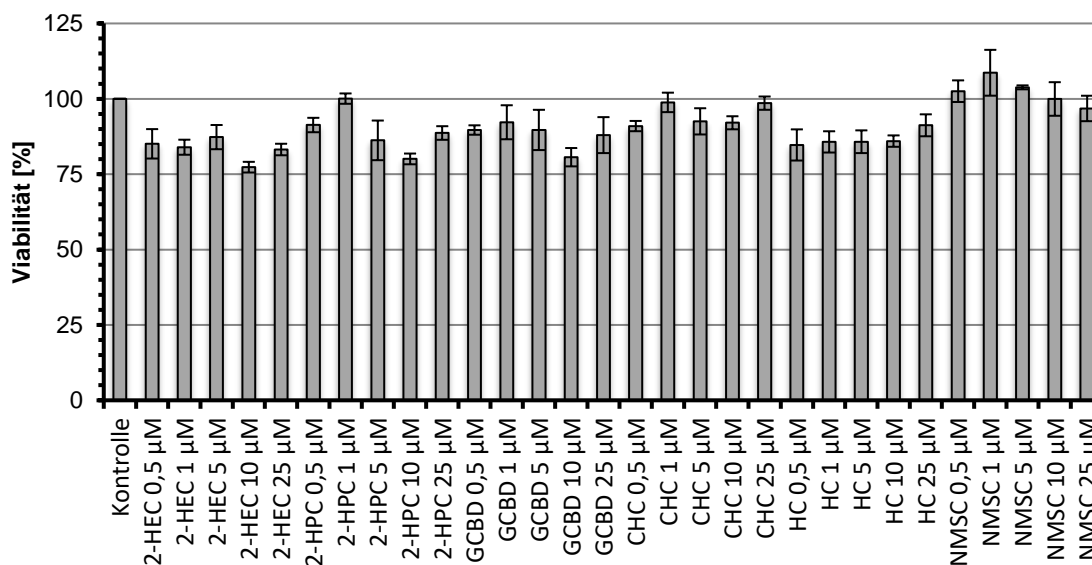
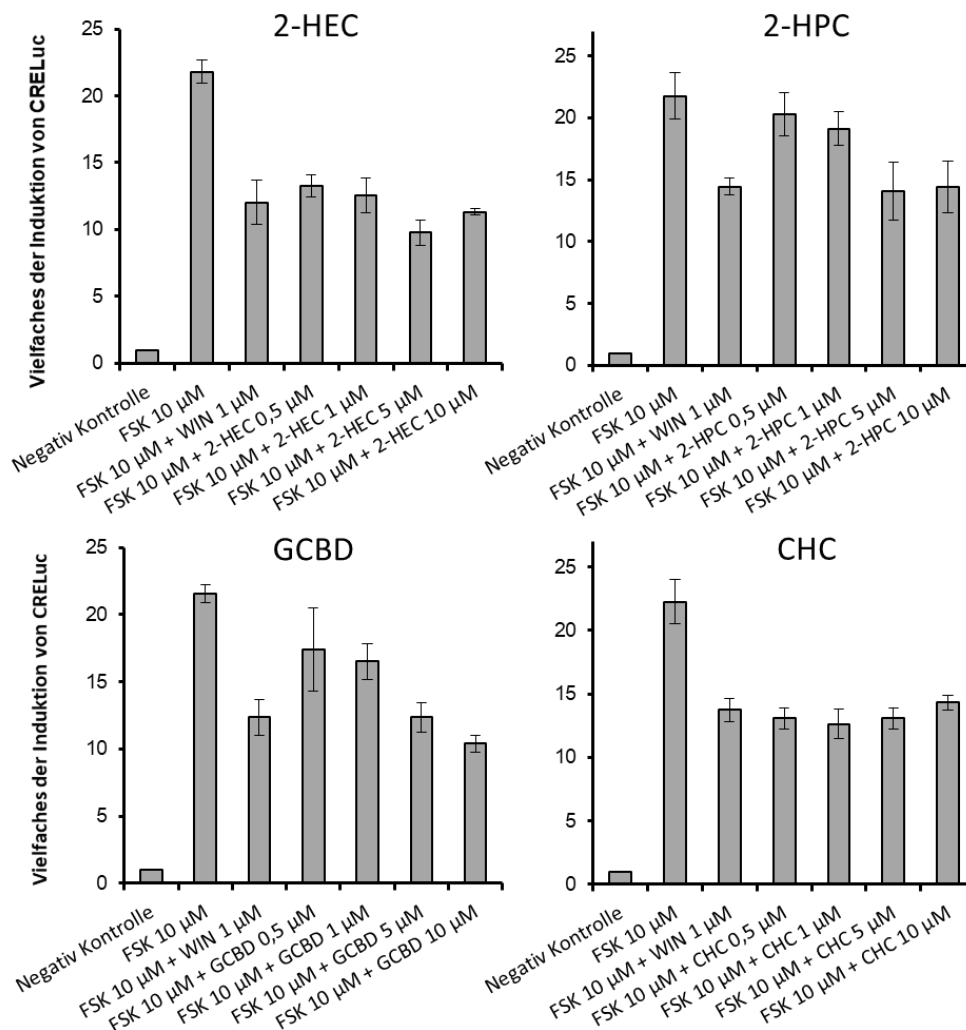


Abb. 73: Viabilität von CHO-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit CBD-Derivaten

### 3.5.2.2 Intrinsische Aktivität von CBD-Derivaten

Die CBD-Derivate 2-HEC (**31**), 2-HPC (**32**), G CBD (**33**), CHC (**34**) und NMSC (**36**) aktivierten CB<sub>2</sub>-Rezeptoren, sie wirkten als Agonisten (Abb. 74 und Abb. 78). 2-HEC (**31**) zeigte in der gleichen Konzentration wie WIN ( $1 \mu\text{mol/l}$ ) vergleichbar starke Effekte wie die Positivkontrolle. G CBD (**33**) zeigte eine dosisabhängige agonistische Wirkung auf CB<sub>2</sub>-Rezeptoren. 2-HEC (**31**) und 2-HPC (**32**) zeigten in Konzentrationen von 0,5–5  $\mu\text{mol/l}$

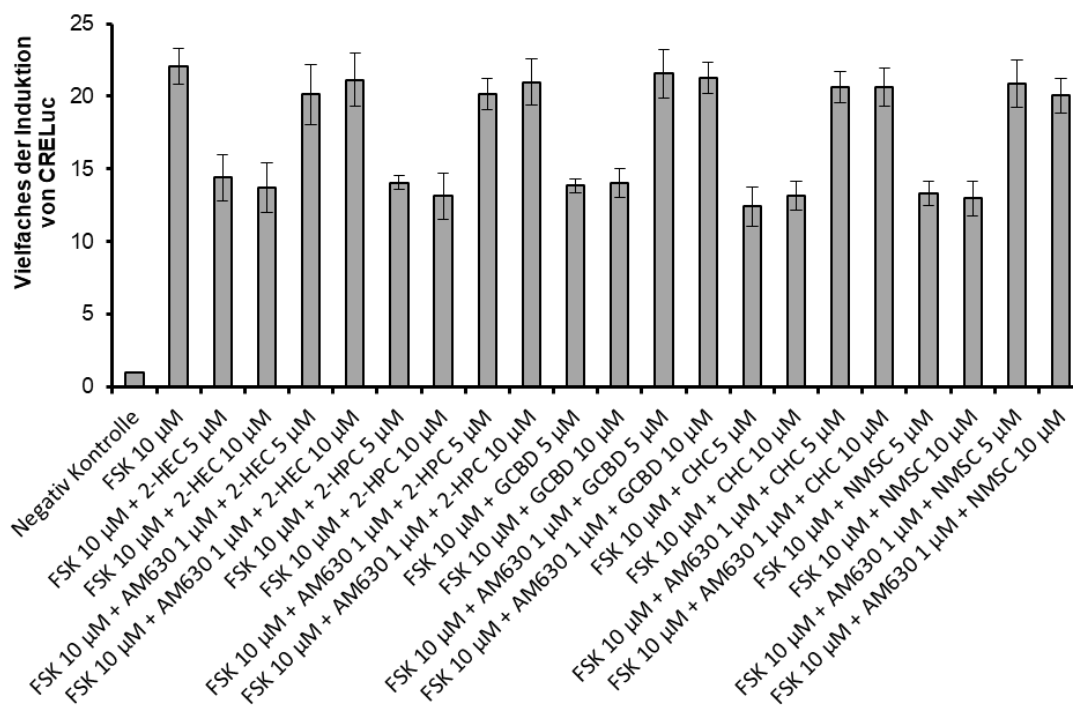
ebenfalls einen dosisabhängigen Agonismus. Nur HC (35) zeigte keine Wirkung auf CB2-Rezeptoren.



**Abb. 74:** CB2-Rezeptor vermittelte agonistische Effekte von 2-HEC, 2-HPC, GCBD und CHC, ausgedrückt als Vielfaches der Induktion von CRELuc; MW aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

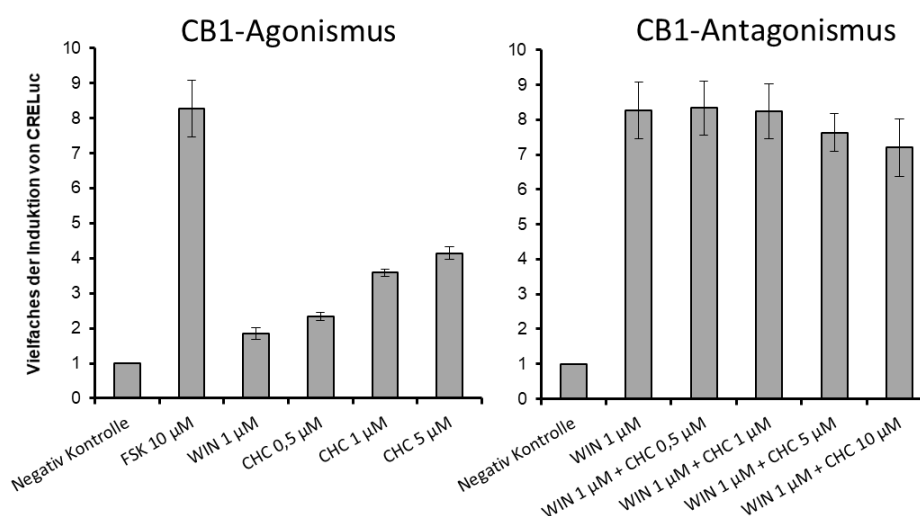
Bei der Testung gegen den inversen Agonisten AM630 (zur Überprüfung der agonistischen Effekte) bestätigte sich für alle genannten Substanzen die agonistische Wirkung auf CB2-Rezeptoren. Keine der Substanzen zeigte die Tendenz zu einer antagonistischen Wirkung (Abb. 75). Wäre dies der Fall gewesen, hätte sich die Induktion – die durch AM630 stimuliert wurde – durch die Testsubstanz antagonisieren lassen müssen. Dies war bei keinem der Tests der Fall.





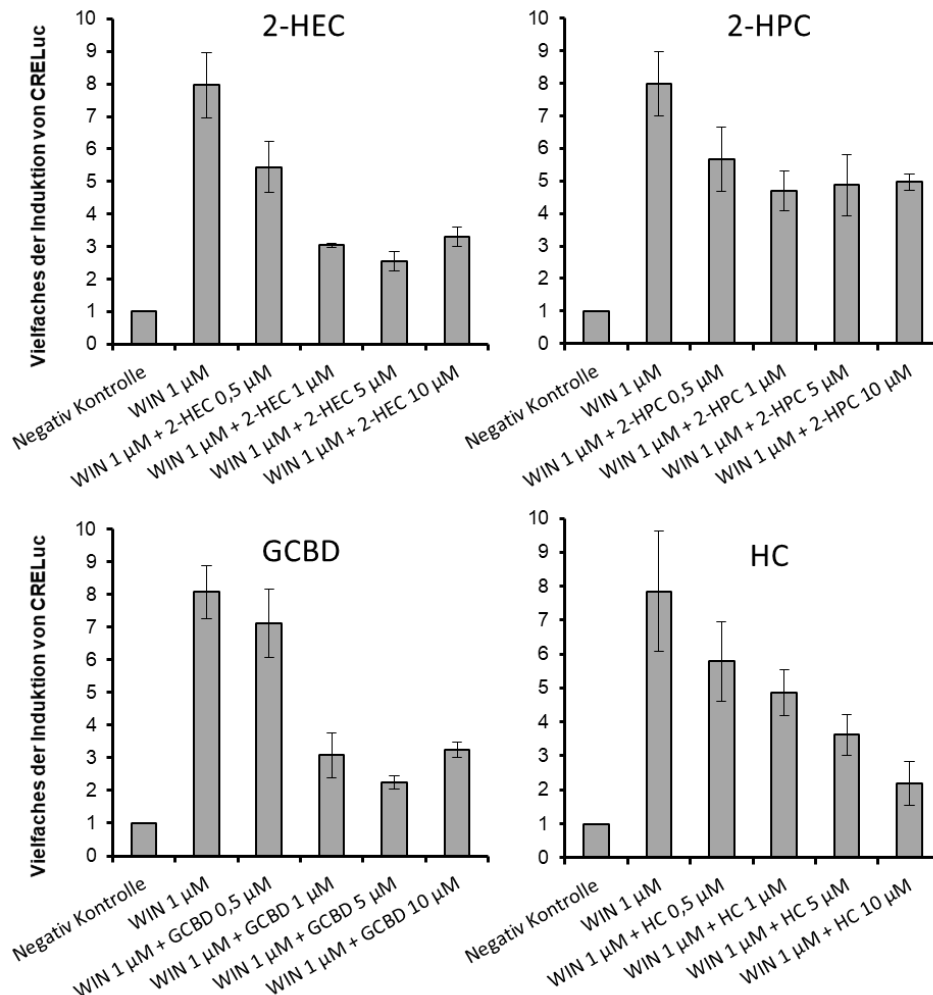
**Abb. 75:** CB2-Rezeptor vermittelte agonistischen Effekte von 2-HEC, 2-HPC, GCBD und CHC bei Testung gegen AM630; MW aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

CB1-Rezeptoren wurden nur von CHC (**34**) merklich aktiviert (Abb. 76). Die Testung auf antagonistische Effekte war negativ. Bei CHC (**34**) handelt es sich damit um einen nicht selektiven CB1/CB2-Agonisten mit einer moderaten Affinität (3.5.1.1) zu beiden Cannabinoid-Rezeptoren.



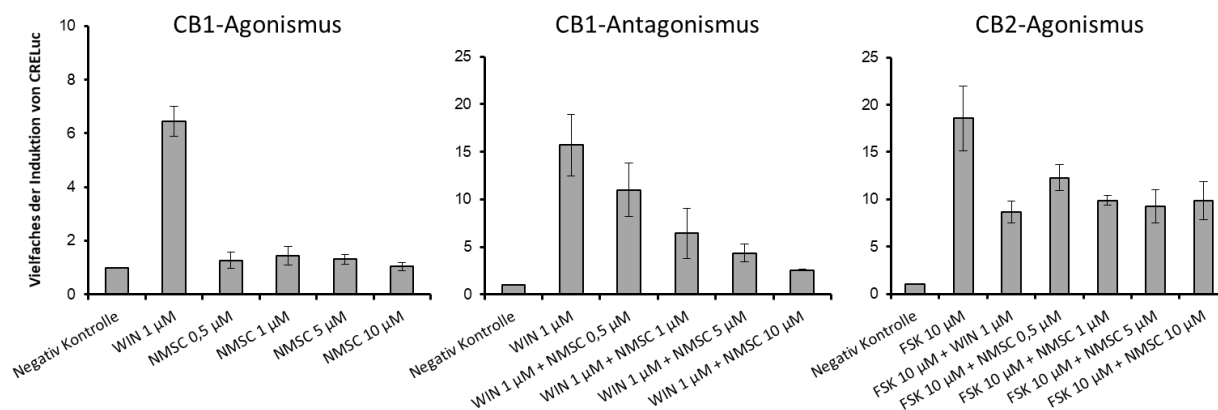
**Abb. 76:** CB1-Rezeptor vermittelte agonistische Effekte von CHC ausgedrückt als Vielfaches der Induktion von CRELuc: dosisabhängige agonistische Wirkung auf CB1-Rezeptoren (links), keine antagonistische Wirkung auf CB1-Rezeptoren (rechts); MW aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

2-HEC (**31**), 2-HPC (**32**), GCBD (**33**), HC (**35**) und NMSC (**36**) wirkten als Antagonisten an CB1-Rezeptoren (Abb. 77 und Abb. 78). Bei HC (**35**) und NMSC (**36**) waren die Ergebnisse über den gesamten Messbereich dosisabhängig. Bei 2-HEC (**31**) und GCBD (**33**) waren sie dies im Bereich von 0,5–1  $\mu\text{mol/l}$ .



**Abb. 77:** CB1-Rezeptor vermittelte antagonistische Effekte von 2-HEC, 2-HPC, GCBD und HC auf CB1-Rezeptoren, ausgedrückt als Vielfaches der Induktion von CRELuc; MW aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

NMSC (**36**) erwies sich als eine Substanz mit einem vielversprechenden Profil. Es zeigte eine hohe Affinität zu beiden Cannabinoid-Rezeptoren (vgl. 3.5.1.1). NMSC ist ein Agonist am CB2-Rezeptor und gleichzeitig ein Antagonist am CB1-Rezeptor (Abb. 78). Besonders interessant macht die Substanz die (tendenziell) dosisabhängige Wirkung, die sie bei gleicher Konzentration (1  $\mu\text{mol/l}$ ) wie WIN zu einem starken Antagonisten an CB1 und einem vergleichbar starken Agonisten an CB2 .



**Abb. 78:** CB1- und CB2-Rezeptor vermittelte Effekte von NMSC ausgedrückt als Vielfaches der Induktion von CRELuc: keine agonistische Wirkung auf CB1-Rezeptoren (links), dosisabhängige antagonistische Wirkung auf CB1-Rezeptoren (Mitte), tendenziell dosisabhängige agonistische Wirkung auf CB2-Rezeptoren (rechts); MW aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben die SEM an

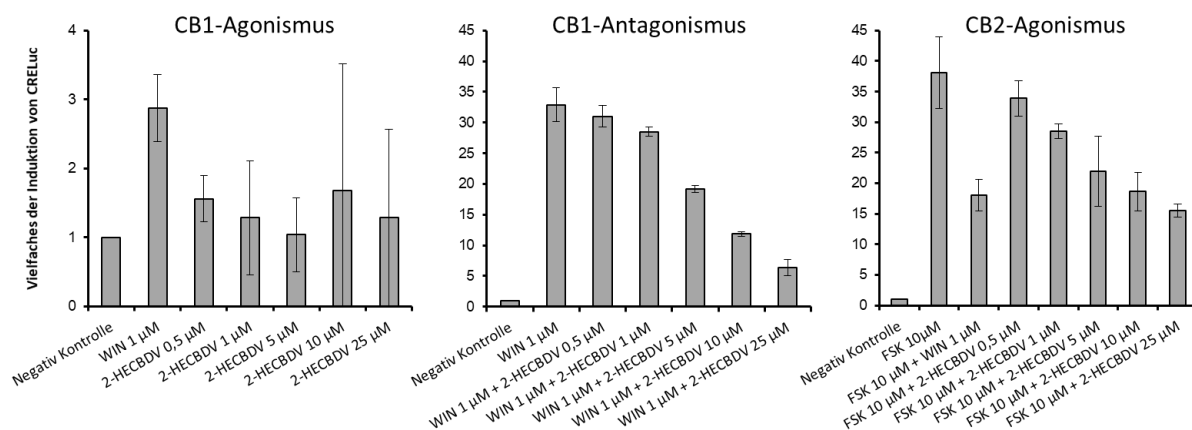
In Tab. 23 sind die Wirkungen der CBD-Derivate auf CB1- und CB2-Rezeptoren zusammengefasst.

**Tab. 23:** Wirkung der CBD-Derivate auf CB1- und CB2-Rezeptoren

Testsubstanz	Wirkung auf CB1	Wirkung auf CB2
2-HEC (31)	Antagonist	Agonist
2-HPC (32)	Antagonist	Agonist
G CBD (33)	Antagonist	Agonist
CHC (34)	Agonist	Agonist
HC (35)	Antagonist	Keine Aktivität
NMSC (36)	Antagonist	Agonist

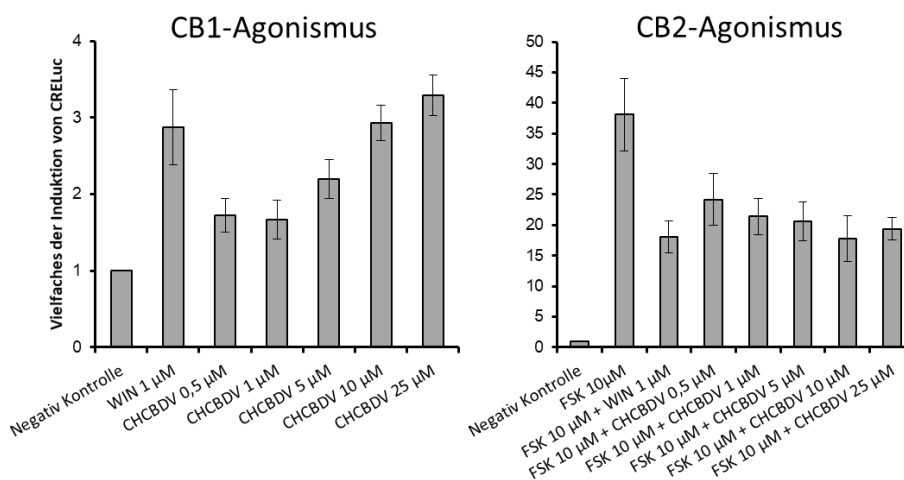
### 3.5.2.3 Intrinsische Aktivität von Cannabidivarin-Derivaten

Die drei untersuchten CBDV-Derivate zeigten ein uneinheitliches Verhalten an den Cannabinoid-Rezeptoren: 2-HECB DV (37) ist, wie die CBD-Derivate, ein Agonist an CB2-Rezeptor und ein Antagonist an CB1-Rezeptoren. Die Wirkung ist zwischen 0,5 und 25 µmol/l dosisabhängig. Seine Bindungsaffinität zu CB1-Rezeptor ist gering, die zum CB2-Rezeptor ist moderat bis gut (vgl. 3.5.1.2). Damit ist auch 2-HECB DV (37) eine Substanz mit einer interessanten Selektivität für CB2-Rezeptoren (Abb. 79).



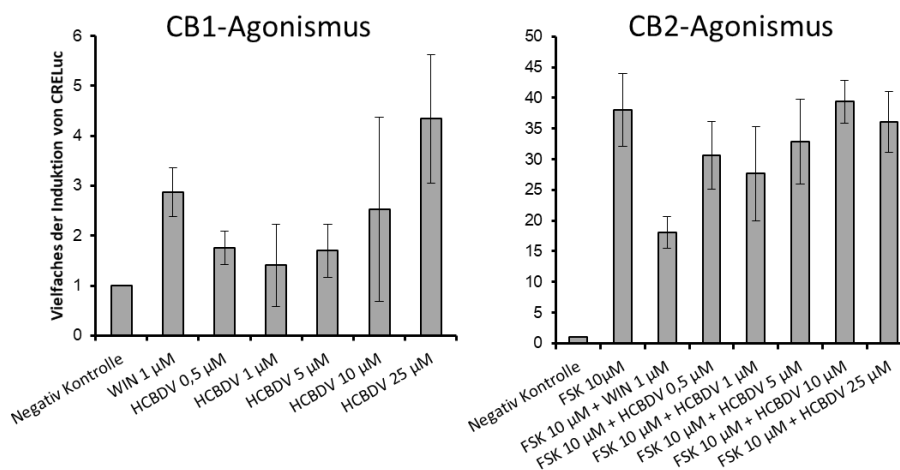
**Abb. 79:** CB1 und CB2-Rezeptor vermittelte Effekte von 2-HECBDV, ausgedrückt als Vielfaches der Induktion von CRELuc: keine agonistische Wirkung auf CB1-Rezeptoren (links), dosisabhängige antagonistische Wirkung auf CB1-Rezeptoren (Mitte), tendenziell dosisabhängige agonistische Wirkung auf CB2-Rezeptoren (rechts), MW aus n = 4 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben die SEM an

Die Bindungsaffinitäten von CHCBDV (**38**) und HCBDV (**39**) waren vergleichbar mit der von  $\Delta^9$ -THC. CHCBDV (**38**) zeigte eine hohe Affinität zu beiden Cannabinoid-Rezeptoren. Die Substanz wirkte als nicht selektiver Agonist an CB1- und an CB2-Rezeptoren (Abb. 80).



**Abb. 80:** Agonistische Effekte von CHCBDV auf CB1 und CB2, ausgedrückt als Vielfaches der Induktion von CRELuc: agonistische dosisabhängige Wirkung auf CB1-Rezeptoren (links), agonistische Wirkung auf CB2-Rezeptoren (rechts); MW aus n = 4 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

HCBDV (**39**) verhält sich als selektiver Agonist an CB1-Rezeptoren und zeigte keine Wirkung auf CB2-Rezeptoren (Abb. 81).



**Abb. 81:** CB1- vermittelte agonistische Effekte von HCBDV auf CB1, ausgedrückt als Vielfaches der Induktion von CRELuc: agonistische Wirkung auf CB1-Rezeptoren (links), keine eindeutige Aktivität an CB2-Rezeptoren (rechts); MW aus n = 4 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

In Tab. 23 sind die Wirkungen der CBDV-Derivate CB1- und CB2-Rezeptoren zusammengefasst.

**Tab. 24:** Wirkung der CBDV-Derivate auf CB1- und CB2-Rezeptoren

Testsubstanz	Wirkung auf CB1	Wirkung auf CB2
2-HECBDV (37)	Antagonist	Agonist
CHCBDV (38)	Agonist	Agonist
HCBDV (39)	Agonist	Keine Aktivität

### 3.5.3 Korrelation zwischen Struktur und intrinsischer Aktivität an CB1- und CB2-Rezeptoren

Die Grundstruktur des CBD zeigte eine höhere Wahrscheinlichkeit (5 von 6 Derivaten) für eine agonistische Wirkung auf CB2 als die Grundstruktur des CBDV (2 von 3 Derivaten). Die Aussagekraft ist durch die geringe Anzahl an getesteten Substanzen jedoch begrenzt. Bemerkenswert ist, dass die beiden Substanzen mit den geringsten logP-Werten (NMSC (36) und 2-HECBDV (37): 3,84 bzw. 4,38) eine agonistische Wirkung auf CB2- und eine antagonistische Wirkung auf CB1-Rezeptoren hatten. Verantwortlich für diese Wirkung könnte die höhere Polarität der Seitengruppe an Position 6 sein.

### 3.5.4 Effekte auf CB2-Rezeptor exprimierende Zellen des Immunsystems

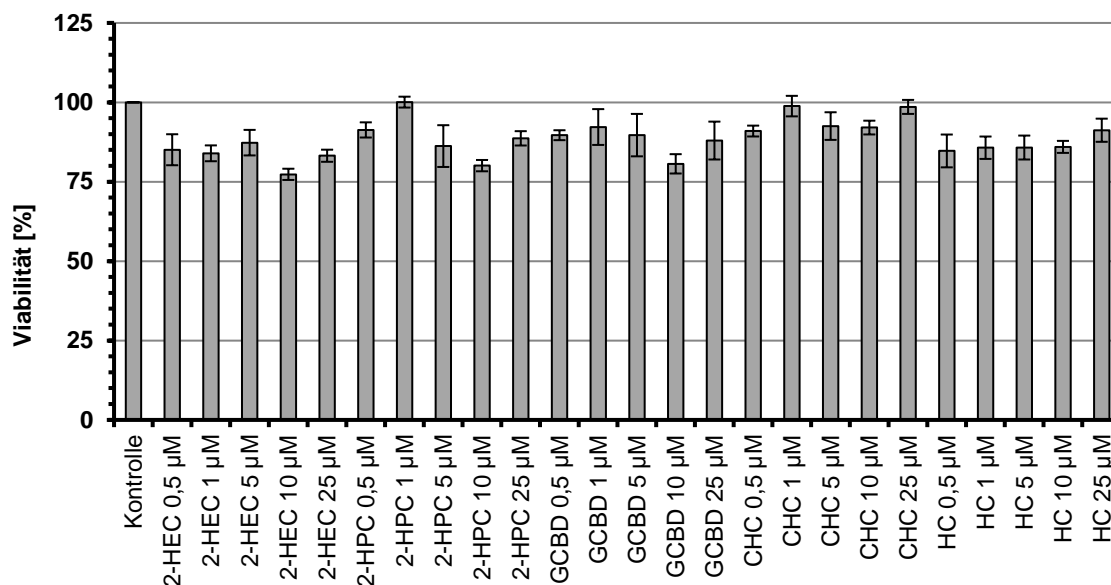
#### 3.5.4.1 Jurkat-T-Zellen

CB2-Agonisten eignen sich besonders, um immunmodulatorische Effekte auszulösen. Es gibt bereits Nachweise, dass Endocannabinoide die Zytokin-Freisetzung in T-Zellen beeinflussen. Insbesondere das körpereigene Arachidonoylethanolamid (Anandamid) zeigt eine immunsuppressive Wirkung, wenn es zu aktivierten T-Lymphozyten gegeben wird. Dabei wird der Effekt über CB2-Rezeptoren vermittelt.<sup>122</sup> Es ist bekannt, dass CB2-Rezeptoren Einfluss auf die Regulation von TH1- und TH2-Zellen haben.<sup>123</sup> Weiterhin wird durch die Aktivierung CB2-Rezeptoren die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen<sup>124</sup> gehemmt und die NF- $\kappa$ B-abhängige Zellapoptose reguliert.<sup>125</sup> Jurkat-T-Zellen stellen ein Standard-*in-vitro*-Modell für Studien zu immunsuppressiven Aktivitäten dar. In Jurkat-T-Zellen inhibieren CB2-Agonisten die Signalübertragung über NF- $\kappa$ B (nukleärer Faktor  $\kappa$ B) und NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen). Über diesen Signalweg werden Interleukin(IL)-2, IL-17 und Tumornekrosefaktor(TNF)- $\alpha$  reguliert. Auf Transkriptionsebene ist die Entstehung von Lymphokinen wie IL-2 von der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NFAT und NF- $\kappa$ B abhängig.<sup>126</sup> Übertragen auf die physiologische Situation könnte eine solche Funktionalität nutzbringend in der Prophylaxe und Therapie von Autoimmunerkrankungen sein (siehe Kap. 1.1.3).

Die CBD-Derivate 2-HEC (**31**), 2-HPC (**32**), GCBD (**33**), HC (**35**), CHC (**34**) und NMSC (**36**) wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Effekte auf Jurkat-T-Zellen getestet. Die Signalübertragung über NF- $\kappa$ B und NFAT wurde verwendet, um die Wirkung der CBD-Derivate mit Hilfe eines Luciferase-gekoppelten Konstrukts *in vitro* zu evaluieren. Jurkat-T-Zellen wurden zu diesem Zweck mit Plasmiden transfiziert, die einen NF- $\kappa$ B- (KBF-luc) bzw. NFAT-abhängigen Promotor (NFAT-luc) zusammen mit einem Luciferase-Gen enthalten. Die Aktivierung der Jurkat-T-Zellen durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (plus Ionomycin (IO) im Falle von NFAT) führte zu einer starken Induktion der Luciferase-Genexpression. Die Aktivierung von CB2-Rezeptoren (z. B. durch WIN) vermittelte über G<sub>i/o</sub> einen inhibitorischen Effekt (Abb. 83). Gemessen wurde die Inhibition der Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Dosis der CBD-Derivate.

### 3.5.4.1.1 Zytotoxizität in Jurkat-T-Zellen

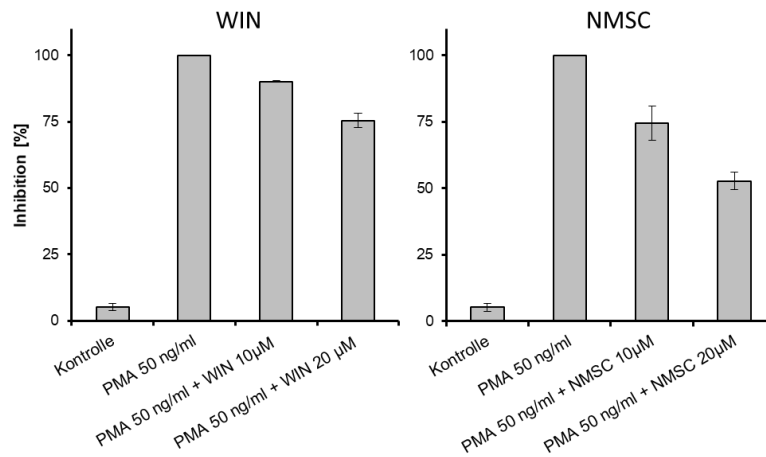
Die Zytotoxizität wurde, wie in 3.5.4.2.1 und 6.6.3 beschrieben, mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Zytotoxizitätstests wurden im selben Medium wie die Wirksamkeitstests durchgeführt. Die getesteten CBD-Derivate hatten im Bereich von 0,5–25  $\mu\text{mol/l}$  nur einen geringen Einfluss auf die Zellviabilität (Abb. 82). Als obere Grenzkonzentration für die Tests wurde die Dosis von 25  $\mu\text{mol/l}$  festgelegt.



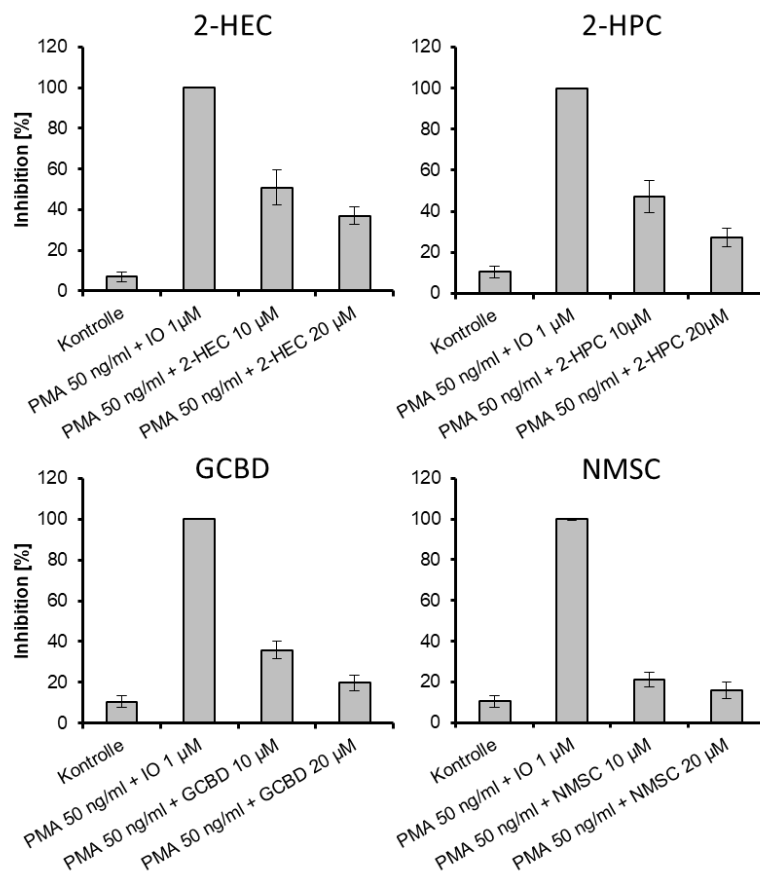
**Abb. 82:** Viabilität von Jurkat-T-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit CBD-Derivaten

### 3.5.4.1.2 Effekte auf Jurkat-T-Zellen

Die Aktivierung der Jurkat-T-Zellen mit PMA (und ggf. IO) bewirkte eine ca. 20-fache Erhöhung der Luciferase-Genexpression. Die jeweiligen Werte im aktivierten Zustand wurden als 100% angenommen und die Inhibition darauf bezogen. Von den untersuchten CBD-Derivaten inhibierte NMSC (**36**) die Aktivierung der Jurkat-T-Zellen via NF- $\kappa$ B und NFAT (Abb. 83 und Abb. 84).



**Abb. 83:** Inhibition von NF-κB in Jurkat-T-Zellen durch WIN und NMSC, ausgedrückt als verminderte Expression von NF-κB-luc; MW aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

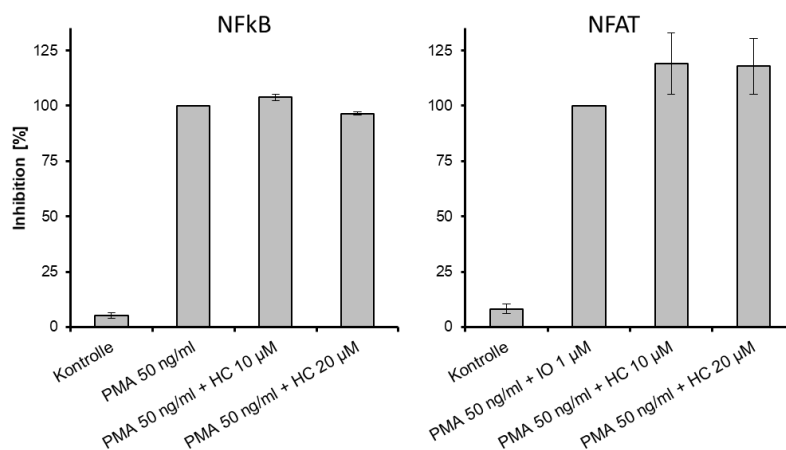


**Abb. 84:** Inhibition von NFAT in Jurkat-T-Zellen durch 2-HEC, 2-HPC, GCBD und NMSC, ausgedrückt als verminderte Expression von NFAT-luc; MW aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an



2-HEC (**31**), 2-HPC (**32**) und GCBD (**33**) zeigten eine Hemmung der NFAT-abhängigen Aktivierung der Jurkat-T-Zellen (Abb. 84).

HC (**35**) ist kein Agonist an CB2-Rezeptoren (vgl. 3.5.2.2). Interessanterweise kam es durch HC (**35**) nur zu einer marginalen Inhibition von NF- $\kappa$ B-luc und zu keiner Hemmung von NFAT-luc (Abb. 85), was die vorherigen Erkenntnisse bezüglich der intrinsischen Aktivität bestätigte.



**Abb. 85:** Geringfügige Inhibition von NF- $\kappa$ B und keine Inhibition von NFAT in Jurkat-T-Zellen durch HC; MW aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

CHC (**34**) hatte sowohl auf CB2- als auch auf CB1-Rezeptoren agonistische Wirkung gezeigt (vgl. 3.5.2.2). Die Substanz zeigte jedoch weder eine Hemmung von NF- $\kappa$ B-luc noch eine Hemmung von NFAT-luc.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die getesteten CB2-Agonisten die Aktivierung von T-Zellen eher über den NFAT-Signalweg als über den NF- $\kappa$ B-luc-Weg gehemmt werden kann.

### 3.5.4.2 IL-17-vermittelte M1-Polarisation von RAW264.7-Makrophagen

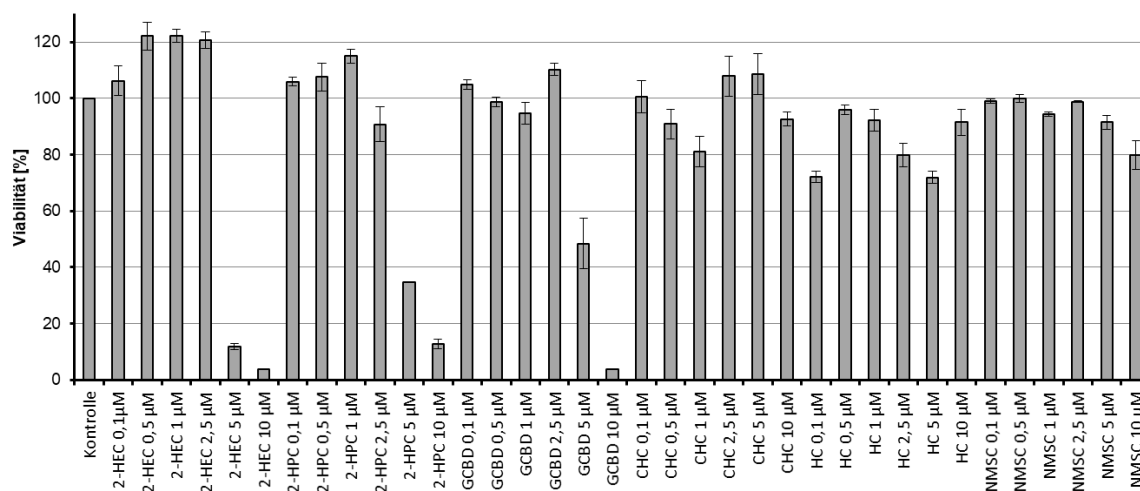
IL-17 ist ein pro-inflammatorisches und pro-fibrinogenes Zytokin, das hauptsächlich von TH17-Lymphozyten produziert wird.<sup>127</sup> CB2-Rezeptoren werden vornehmlich von Immunzellen exprimiert und vermitteln anti-inflammatorische und anti-fibrinogene Effekte.<sup>128</sup> *In vitro* konnte gezeigt werden, dass der CB2-Rezeptor immunsuppressive Wirkung auf TH17-Zellen hat.<sup>122</sup> Weiterhin zeigten *In-vitro*-Studien, dass die Aktivierung von CB2-Rezeptoren in Makrophagen die Expression von pro-inflammatorischen Genen abschwächt.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-naiven T-Zellen in TH17-Lymphozyten durch CB2-Agonisten wie das synthetische Cannabinoid JWH-133 vermindert werden kann. Dieser Effekt war verbunden mit einer verminderten Expression von TH17-Marker-mRNA und einer verminderten IL-17-Produktion.<sup>127</sup>

Um die Wirkung der CBD-Derivate auf Makrophagen zu testen, wurden diese mit ansteigenden Konzentrationen der Derivate und mit IL-17 stimuliert. Es wurde überprüft, ob die Derivate die IL-17-getriebene Polarisierung zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen unterdrücken können.

### 3.5.4.2.1 Zytotoxizität in RAW264.7-Makrophagen

Die Zytotoxizität wurde, wie in 3.5.4.2.1 und 6.6.3 beschrieben, mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Die Experimente wurden in 0,1%igem FBS (fetales Rinderserum) durchgeführt. Daher wurden die Tests auf zytotoxische Wirkungen der Testsubstanzen auch in diesem Medium durchgeführt.



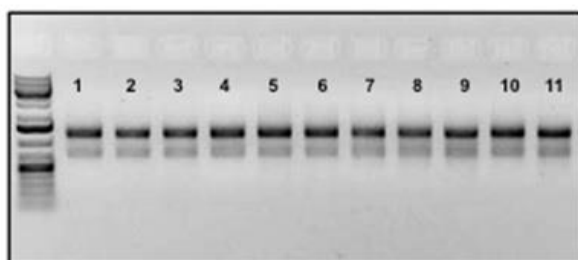
**Abb. 86:** Viabilität der RAW264.7-Makrophagen nach 24-stündiger Behandlungen mit CBD-Derivaten; MW aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

Von den getesteten CBD-Derivaten hatten 2-HEC (**31**), 2-HPC (**32**) und G CBD (**33**) bereits in den Konzentrationen von 5 und 10 µmol/l einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität. Da zu erwarten war, dass die Ergebnisse der funktionellen Tests davon beeinflusst werden würden, wurden diese Substanzen von den weiteren Untersuchungen ausgenommen. CHC (**34**), HC (**35**) und NMSC (**36**) zeigten nur moderate zytotoxische Effekte. Für sie wurden als

untere und obere Grenzkonzentrationen die Dosen von 0,5  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 10  $\mu\text{mol/l}$  festgelegt (Abb. 86).

### 3.5.4.2.2 Effekte auf die IL-17-induzierte Polarisation von Makrophagen

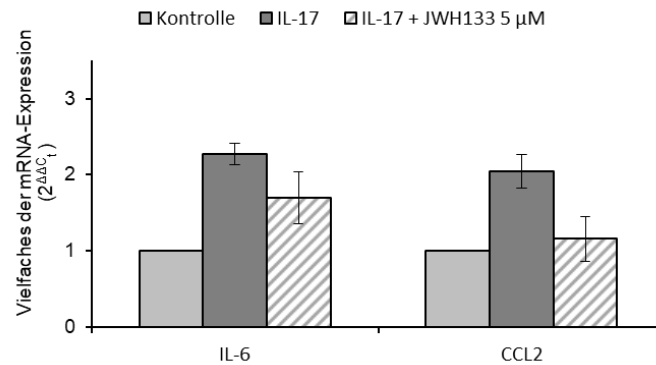
Die RAW264.7-Makrophagen wurden mit murinem IL-17 in Ab- oder Anwesenheit der Testsubstanzen für 24 h behandelt. Danach wurde ihre mRNA extrahiert. Abb. 87 zeigt die Integrität der extrahierten mRNA vor der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Die Überprüfung der Reinheit durch UV-Messung (Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm) ergab für keine der Proben ein Ergebnis von  $> 2$ , womit das Fehlen von Verunreinigungen durch Proteine belegt wurde.



Bande	Beschreibung
1	Kontrolle
2	IL-17
3	IL-17 + CHC 1 $\mu\text{M}$
4	IL-17 + CHC 5 $\mu\text{M}$
5	IL-17 + CHC 10 $\mu\text{M}$
6	IL-17 + HC 1 $\mu\text{M}$
7	IL-17 + HC 5 $\mu\text{M}$
8	IL-17 + HC 10 $\mu\text{M}$
9	IL-17 + NMSC 1 $\mu\text{M}$
10	IL-17 + NMSC 5 $\mu\text{M}$
11	IL-17 + NMSC 10 $\mu\text{M}$

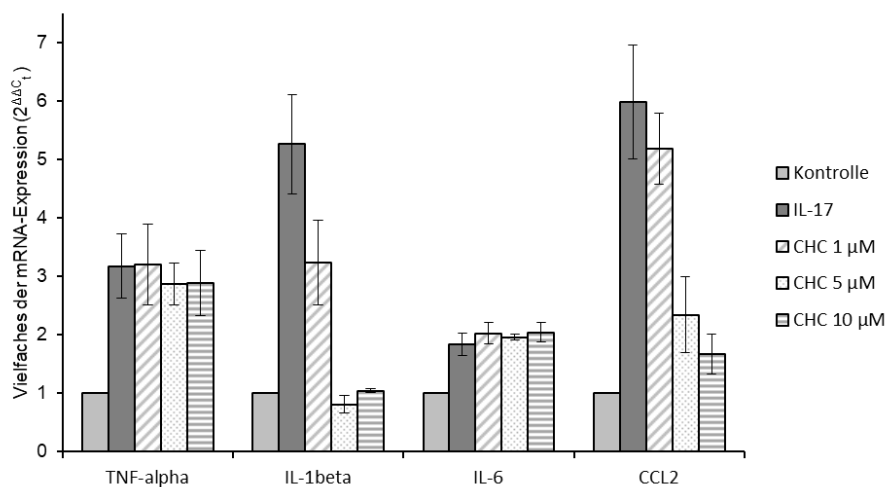
**Abb. 87:** Qualität der extrahierten mRNA aus den RAW264.7-Makrophagen; die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Experimenten

Die Behandlung von RAW264.7-Makrophagen mit IL-17 führte zu deren Polarisation zum M1-Phänotyp. Diese pro-inflammatorischen Zellen zeigten eine erhöhte Expression von  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und CCL2. Als Positivkontrolle wurde der CB2-Agonist JWH133 verwendet, der die Induktion der mRNA von IL-6 und CCL2 im Vergleich zur Stimulation mit IL-17 inhibierte (Abb. 88).



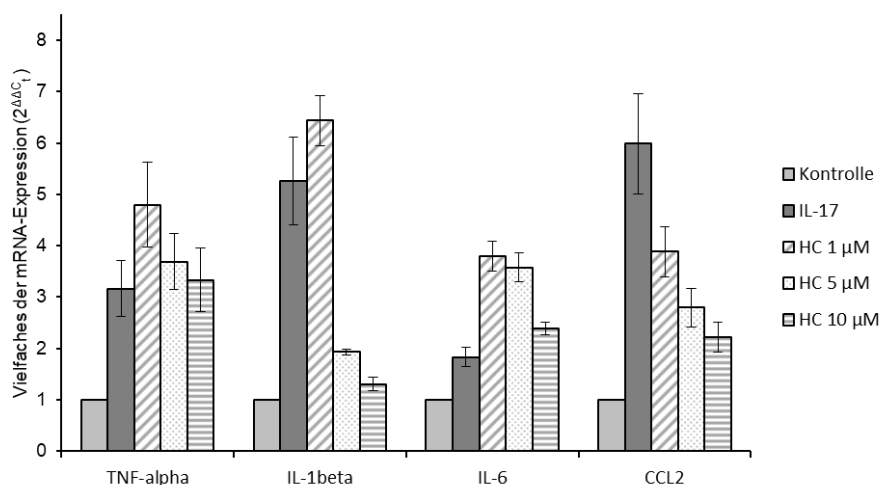
**Abb. 88:** mRNA-Expression von IL-6 und CCL2 in RAW264.7-Makrophagen, induziert durch Stimulation mit IL-17 und inhibiert durch JWH133; MW aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

RAW264.7-Makrophagen, die mit CHC (**34**) vorinkubiert wurden, inhibierten die M1-Marker IL-1 $\beta$  und CCL2. Die Hemmung von IL-6 und TNF- $\alpha$  war aufgrund der geringen Induktion durch IL-17 nicht feststellbar bzw. nur schwach ausgeprägt (Abb. 89).



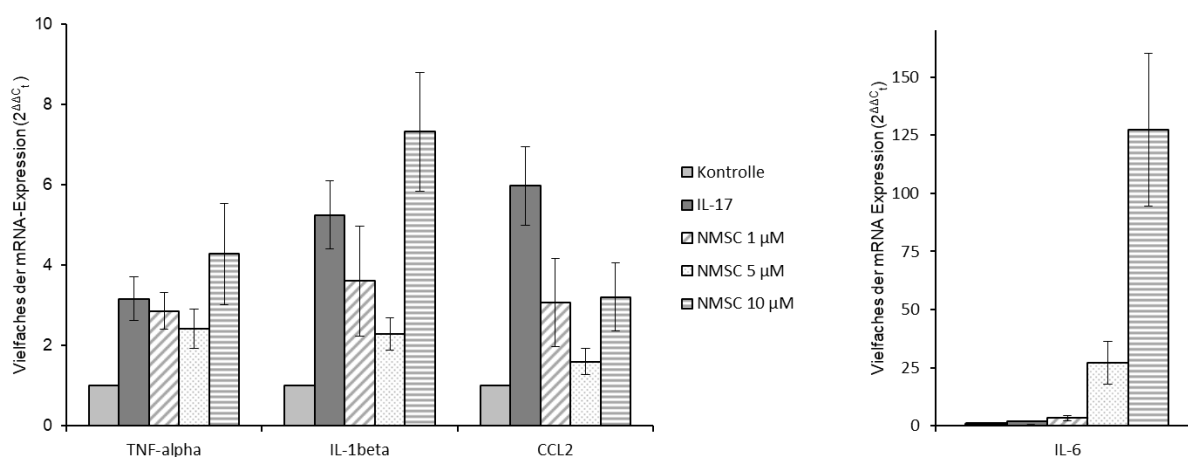
**Abb. 89:** Einfluss von CHC auf die IL-17-stimulierte mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und CCL2 in RAW264.7-Makrophagen: IL-1 $\beta$  und CCL2 wurden durch ansteigende Dosen von CHC inhibiert; MW aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

Auch HC (**35**) inhibierte die Polarisation der RAW264.7-Makrophagen bezüglich der Parameter IL-1 $\beta$  und CCL2. Wie bei CHC (**34**) war auch hier die Induktion der mRNA-Expression von IL-6 und TNF- $\alpha$  durch IL-17 nicht sehr stark, weshalb eine Aussage zur Hemmung von IL-6 und TNF- $\alpha$  nicht eindeutig zu treffen war (Abb. 90). Beide Parameter schienen durch ansteigende Dosen gehemmt zu werden.



**Abb. 90:** Einfluss von HC auf die IL-17-stimulierte mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und CCL2 in RAW264.7-Makrophagen: IL-1 $\beta$  und CCL2 wurden durch ansteigende Dosen von HC inhibiert; MW aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

Im Gegensatz zu den vorgenannten Derivaten zeigte NMSC (**36**) nur bei geringeren Dosierungen eine Inhibition von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und CCL2 und stimulierte die Expression der Gene bei höheren Konzentrationen. NMSC (**36**) co-stimulierte gleichzeitig die IL-6-Expression in einer dosisabhängigen Art und Weise (Abb. 91).



**Abb. 91:** Einfluss von NMSC auf die IL-17-stimulierte mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und CCL2 in RAW264.7-Makrophagen: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und CCL2 wurden durch geringe Dosen von NMSC inhibiert und durch hohe Dosen aktiviert (links); IL-6 wurde stark induziert (rechts); MW aus n = 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die CB2-Agonisten CHC (**34**), HC (**35**) und NMSC (**36**) die IL-17-vermittelte Polarisation von RAW264.7-Makrophagen erwartungsgemäß hemmten. Es ist auch feststellbar, dass die CBD-Derivate mit unpolaren Resten eine

einheitliche Reduktion der Expression der mRNA von IL-1 $\beta$  und CCL2 bewirkten. Das polarere NMSC (36) hatte über einen kleineren Dosisbereich ebenfalls einen hemmenden Effekt. Dies könnte mit der erhöhten Bindungsaffinität von NMSC (36) korrelieren, die bei höheren Dosen paradoxe Effekte hervorrufen könnte.

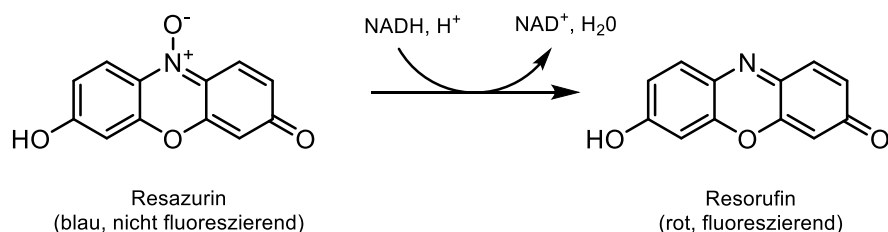
### **3.5.4.3 Primäre humane Monozyten**

Die anti-inflammatorischen Tests wurden in einer Zellkultur von primären humanen Monozyten durchgeführt. Humane Monozyten sind einer der Hauptzelltypen, die an entzündlichen Prozessen in Geweben beteiligt sind. Diese unspezifischen Immunzellen stellen den ersten Schritt in der Kaskade der Entzündungsreaktion dar, indem sie verschiedene Zytokine, z. B. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), ausschütten, wodurch sie andere Immunzellen mobilisieren und stimulieren. Die Monozyten selbst werden wiederum durch Lipopolysaccharide (LPS) stimuliert, die aus den Bruchstücken von gramnegativen Bakterien stammen. Die Verwendung von primären humanen Monozyten erlaubt eine realitätsnahe Abbildung einer inflammatorischen pathophysiologischen Situation.<sup>129,130</sup>

Um die Wirkung der CBD-Derivate auf die Monozyten zu testen, wurden diese entweder mit LPS allein oder zusammen mit dem jeweiligen CBD-Derivat inkubiert. Es wurde die Menge an IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> im aktivierten Zustand (mit LPS) mit der Menge dieser Inflammationsparameter nach Inkubation mit ansteigenden Dosen der Testsubstanzen verglichen.

#### **3.5.4.3.1 Zytotoxizität in primären humanen Monozyten**

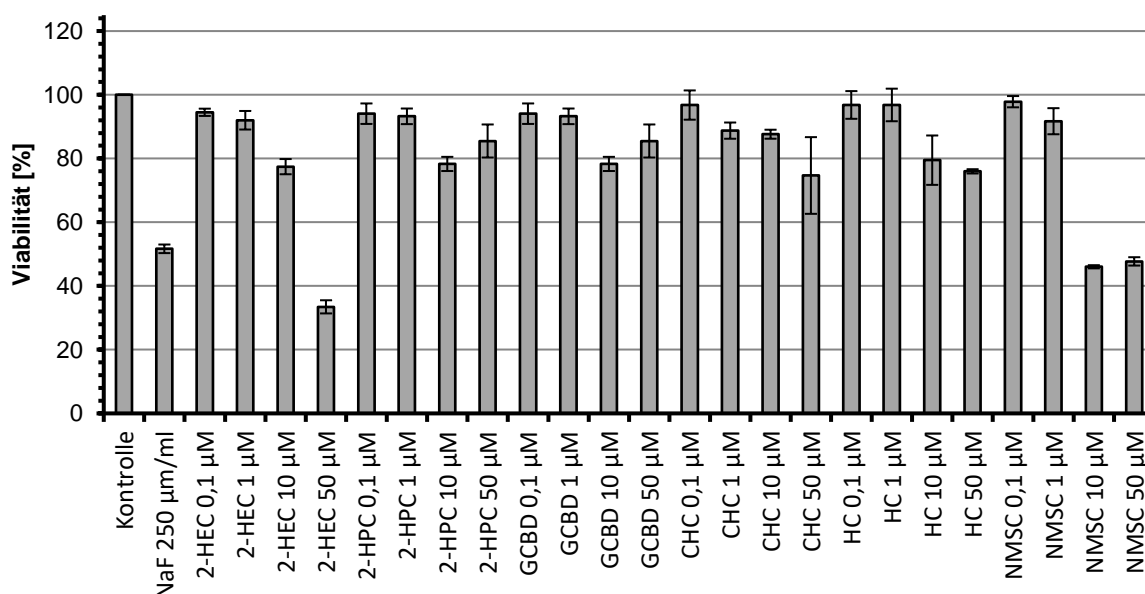
Die zytotoxischen Effekte der Testsubstanzen wurden mit dem alamarBlue<sup>®</sup>-Assay bestimmt. Der Nachweis der Zellviabilität beruht dabei auf der Reduktion von Resazurin (blau, nicht fluoreszierend) zu Resorufin (rot, fluoreszierend) (Abb. 92). Resazurin ist selbst nicht toxisch und kann durch Zellwände permeieren. In einer wässrigen Resazurinlösung reduzieren normal arbeitende Zellen das Resazurin allmählich zu Resorufin. Dies geschieht durch das natürliche Redoxpotential, das im Inneren einer metabolisch aktiven Zelle herrscht. Werden die metabolische Aktivität und damit das Redoxpotential der Zelle durch zytotoxische Stoffe vermindert, so wird die Reduktion des blauen Farbstoffes bzw. die Bildung des roten Farbstoffes verlangsamt oder sogar verhindert.



**Abb. 92:** Reaktion von Resazurin zu Resorufin nach Shahangian et al.<sup>131</sup>

Diese kolorimetrische Reaktion wurde durch eine ELISA-Messung ausgewertet, bei der die Intensität der roten Färbung als Indikator für die Stärke der Reaktion diente. Die kolorimetrische Bestimmung der Farbintensität erfolgte in arbiträr festgelegten Einheiten, da sich keine direkte Korrelation zu anderen metrischen Systemen aufstellen lässt.

Die Wirkung der Cannabinoide auf die Zellvitalität wurde im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen berechnet. Als Positivkontrolle wurde das zelltoxische Natriumfluorid verwendet (Abb. 93).



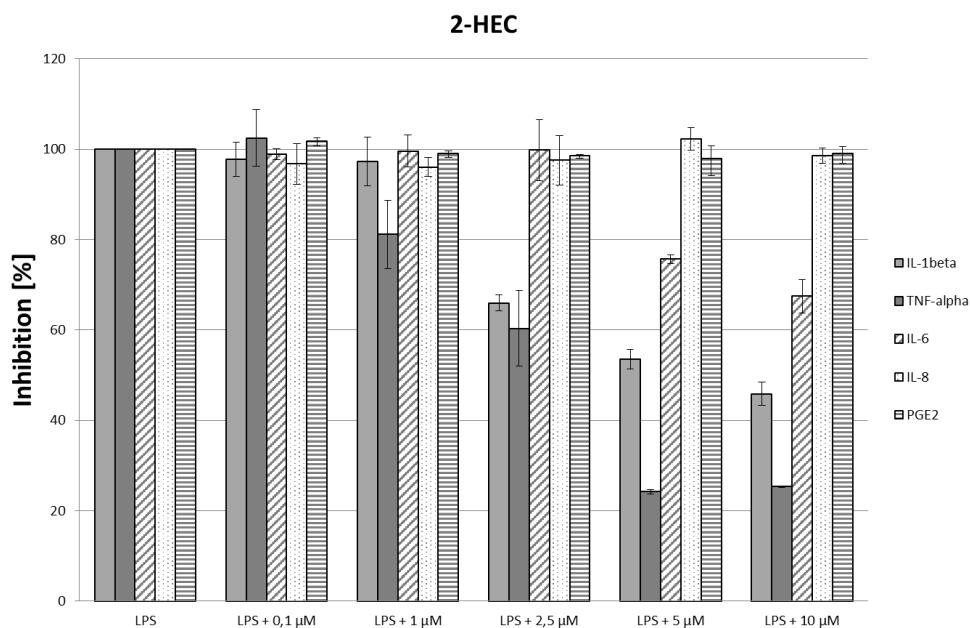
**Abb. 93:** Viabilität von primären humanen Monozyten nach 24-stündiger Behandlung mit CBD-Derivaten; MW aus  $n = 4$  unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

Mit Ausnahme von NMSC (**36**) hatten die getesteten CBD-Derivate im Bereich von 0,1–10 µmol/l nur einen geringen Einfluss auf die Zellviabilität. Moderate zytotoxische Effekte traten erst bei Konzentrationen von  $> 10$  µmol/l auf. Daher wurde für die weiteren Tests als obere Grenzkonzentration die Dosis von 10 µmol/l festgelegt. Konzentrationen von

> 50 µmol/l wurden deswegen nicht weiter getestet. Bei NMSC (36) wurden Konzentrationen von 0,01–2,5 µmol/l getestet, um zytotoxische Effekte auszuschließen.

### 3.5.4.3.2 Effekte auf humane Monozyten

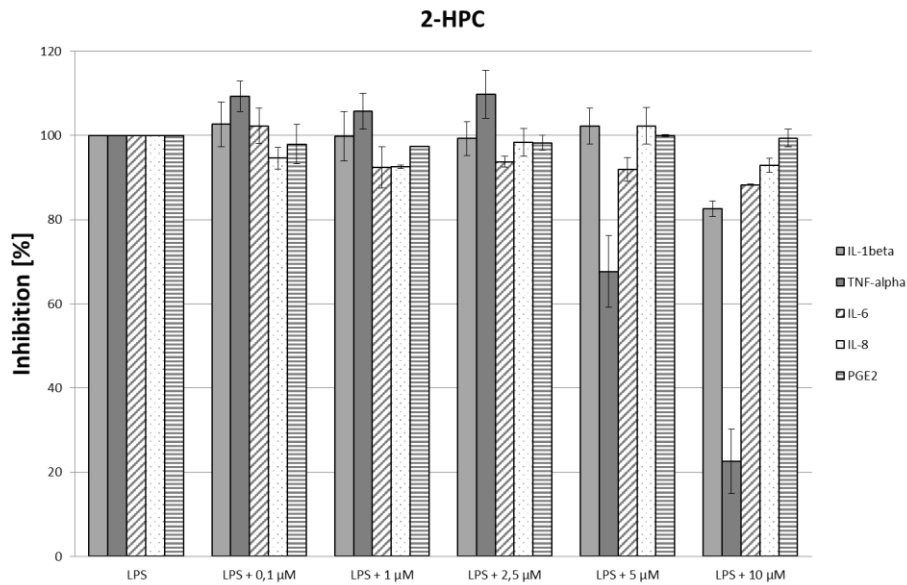
Die jeweiligen Werte im aktivierten Zustand (mit LPS) wurden als 100% angenommen und die Inhibition wurde darauf bezogen. 2-HEC (31) zeigte eine starke dosisabhängige Inhibition von IL-1β und TNF-α sowie eine moderate Inhibition von IL-6 (Abb. 94).



**Abb. 94:** Anti-inflammatorische Effekte von 2-HEC in primären humanen Monozyten; normalisiert auf die Induktion durch LPS (ohne Zugabe einer Testsubstanz); MW aus n=2 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

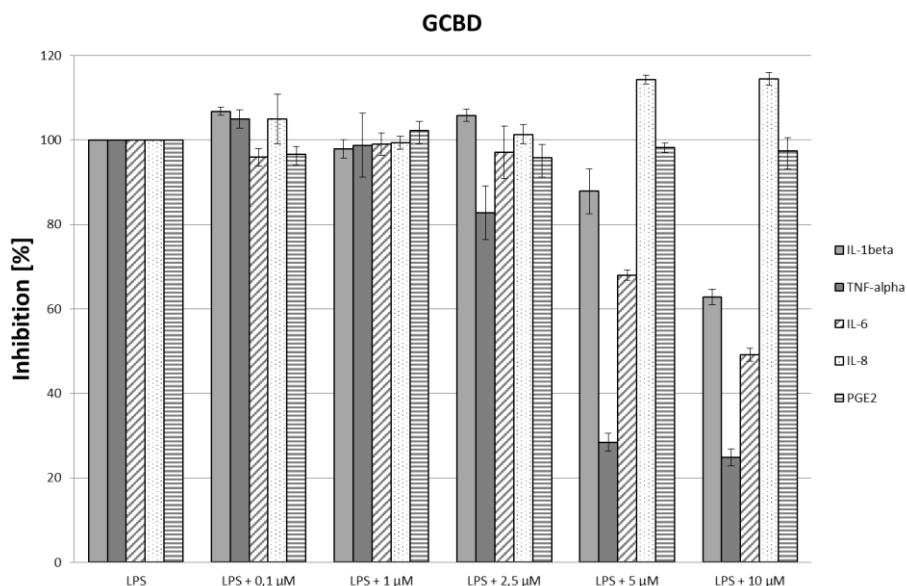
Für 2-HPC (32) war ebenfalls eine dosisabhängige Inhibition von TNF-α und IL-6 feststellbar. Auch eine Inhibition von IL-1β war erkennbar, diese war jedoch im getesteten Konzentrationsbereich nicht so stark ausgeprägt wie bei 2-HEC (31). IL-8 und PGE<sub>2</sub> wurden bei geringen Dosen gehemmt, der Effekt war für höhere Dosen aber nicht mehr gegeben (Abb. 95).





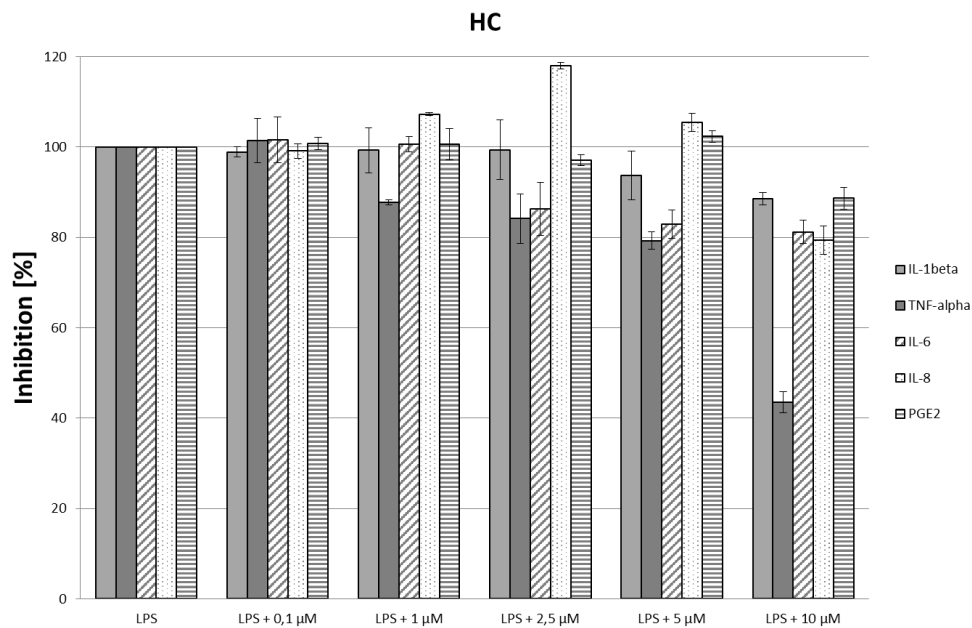
**Abb. 95:** Antiinflammatorische Effekte von 2-HPC in primären humanen Monozyten; normalisiert auf die Induktion durch LPS (ohne Zugabe einer Testsubstanz); MW aus  $n = 2$  unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

Vergleichbare Wirkungen waren für GCBD (**33**) feststellbar. Auch hier kam es zu einer dosisabhängigen Inhibition von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie zu einer moderaten Inhibition von IL-6. Die Effekte auf IL-1 $\beta$  waren nicht so stark ausgeprägt wie bei 2-HEC (**31**). In höhere Dosen wurde IL-8 signifikant co-stimuliert (Abb. 96).



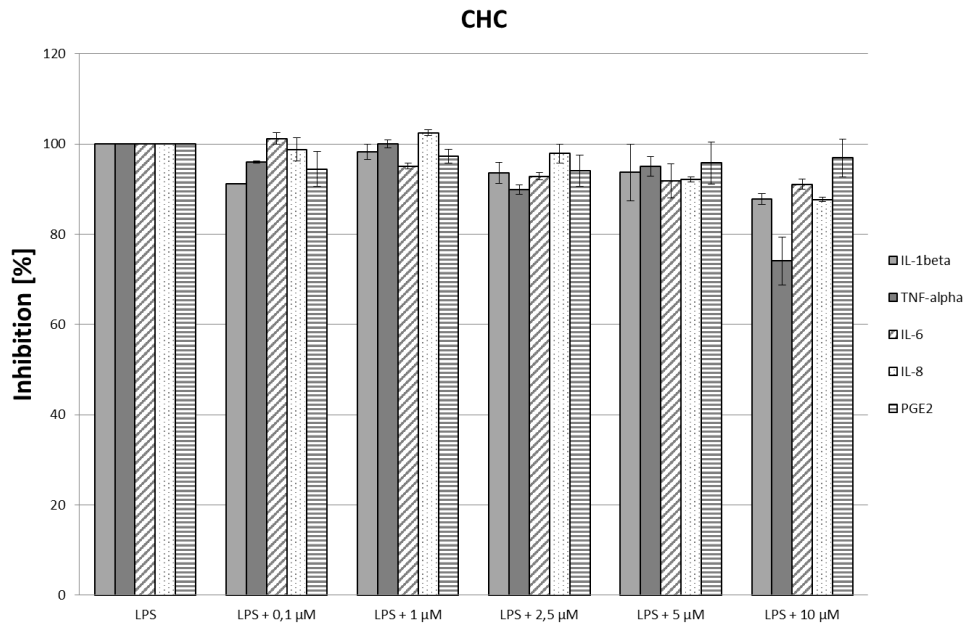
**Abb. 96:** Anti-inflammatorische Effekte von GCBD in primären humanen Monozyten; normalisiert auf die Induktion durch LPS (ohne Zugabe einer Testsubstanz); MW aus  $n = 2$  unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

HC (35) führte zu einer dosisabhängigen Inhibition von TNF- $\alpha$  und IL-6. IL-1 $\beta$  und IL-8 wurden bei höheren Dosen ebenfalls gehemmt. Die Inhibition bei einer Dosis von 10  $\mu\text{mol/l}$  könnte auf einen zytotoxischen Effekt zurückzuführen sein, was daran erkennbar ist, dass alle Parameter gleichzeitig inhibiert wurden. Dies würde auch mit den leichten zytotoxischen Effekten im alamarBlue<sup>®</sup>-Assay (vgl. 3.5.4.3.1) übereinstimmen.



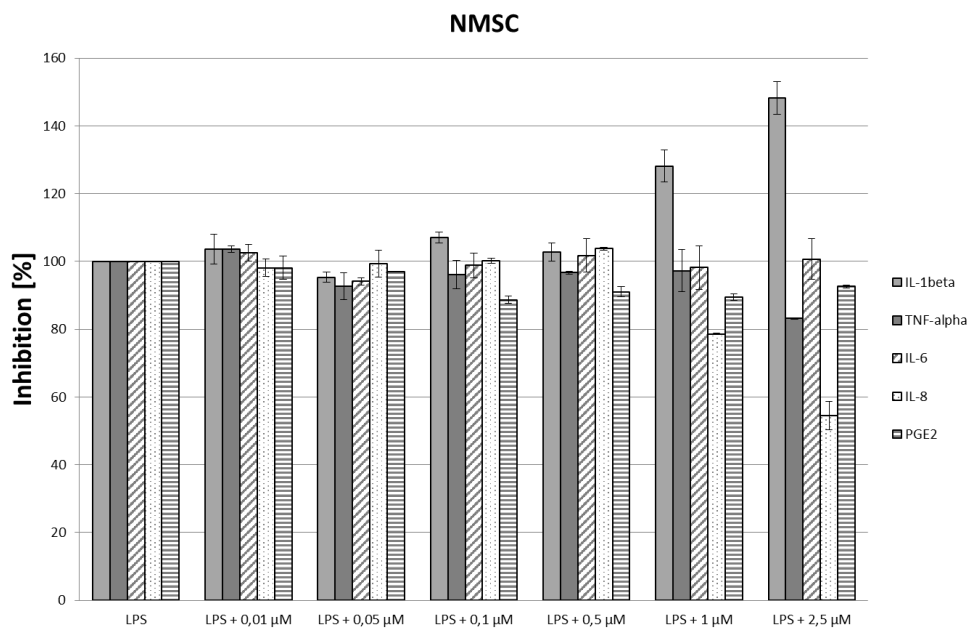
**Abb. 97:** Anti-inflammatorische Effekte von HC in primären humanen Monozyten; normalisiert auf die Induktion durch LPS (ohne Zugabe einer Testsubstanz); MW aus n=2 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

Für CHC (34) waren nahezu keine anti-inflammatorischen Effekte feststellbar (Abb. 98). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 wurden moderat und dosisabhängig von CHC (34) gehemmt.



**Abb. 98:** CHC zeigte keine anti-inflammatorischen Effekte in primären humanen Monozyten; normalisiert auf die Induktion durch LPS (ohne Zugabe einer Testsubstanz); MW aus  $n = 2$  unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

NMSC (36) stimulierte eine erhöhte Expression von IL-1 $\beta$ , was in dem betrachteten System für einen pro-inflammatorischen Effekt gehalten werden muss. Gleichzeitig regelte NMSC (36) die Bildung von TNF- $\alpha$ , IL-8 und PGE<sub>2</sub> signifikant herunter (Abb. 99).



**Abb. 99:** Effekte von NMSC in primären humanen Monozyten; normalisiert auf die Induktion durch LPS (ohne Zugabe einer Testsubstanz); MW aus  $n = 2$  unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken geben den SEM an

### 3.5.5 Korrelation zwischen Struktur und Wirkung auf CB2-Rezeptor exprimierende Immunzellen

In CB2 exprimierenden Immunzellen bestätigte sich die agonistische Wirkung der CBD-Derivate. In Jurkat-T-Zellen inhibierten 2-HEC (**31**), 2-HPC (**32**), GCBD (**33**) und NMSC (**36**) die NFAT-vermittelte Aktivierung der Zellen. NMSC (**36**) als Substanz mit dem niedrigsten logP-Wert inhibierte auch die Aktivierung der Jurkat-T-Zellen via NF- $\kappa$ B. Die unpolaren CBD-Derivate HC (**35**) und CHC (**34**) zeigten nur eine marginale bzw. keine Wirkung auf die beiden untersuchten Signalwege.

Allerdings zeigten HC (**35**) und CHC (**34**) in RAW264.7-Makrophagen dosisabhängige Inhibitionen der mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  und CCL2. Wie das stark polare NMSC (**36**) zeigten sie darüber hinaus noch eine schwache Inhibition der Expression von TNF- $\alpha$ . Die unpolaren Substanzen waren in ihrem hemmenden Einfluss auf die M1-Polarisation konsistent, während das Sulfonamid in einer höheren Dosierung zur Steigerung von inflammatorischen Markern – insbesondere IL-6 – führte.

In primären humanen Monozyten zeigten alle sechs getesteten CBD-Derivate eine Inhibition der Induktion von TNF- $\alpha$ . In folgender Reihenfolge nahm die Stärke dieses Effekts ab: 2-HEC (**31**) > GCBD (**33**) > HC (**35**) > NMSC (**36**) > 2-HPC (**32**) > CHC (**34**). Ein Zusammenhang mit der Polarität der Substanzen oder sperrigen Resten ist nicht erkennbar. Die CBD-Grundstruktur scheint eine anti-inflammatorische Wirkung in primären humanen Immunzellen zu bewirken. Die stark polare Sulfonamid-Seitenkette stimulierte hingegen eine vermehrte Bildung von IL-1 $\beta$ .

## 4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur effizienten Herstellung von (-)-trans-Cannabidiol (CBD, **10**), (-)-trans- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (Dronabinol, **21**) und (-)-trans-Cannabidivarin (CBDV, **30**) durch kontinuierliche Synthese untersucht und entwickelt.

CBD konnte durch kontinuierliche Synthese in drei Schritten aus Olivetolcarbonsäuremethylester (OM, **6**) und Menthadienol G (**3**) mit einer Ausbeute von 41% synthetisiert werden. Bei optimierten Bedingungen betrug die Reinheit nach Kristallisation > 99%. Die Stereochemie konnte durch Röntgenstrukturanalyse eindeutig als 1R,6R bestimmt werden. Vorteilhaft war dabei, dass Toluol anstatt eines chlorierten Lösungsmittels verwendet werden konnte. Weitere Vorteile waren die kurze Reaktionszeit und die Tatsache, dass die Synthese bei Raumtemperatur durchgeführt werden konnte. Es konnten fünf Nebenprodukte detektiert und identifiziert werden, wovon eines Dronabinol war.

Bei optimierten Reaktionsparametern konnte eine Ausbeute an Dronabinol von 64,5% erreicht werden. Durch Simulated Moving Bed (SMB)-Chromatographie konnte Dronabinol kontinuierlich mit einem Gehalt von > 95% hergestellt werden. Nach der Synthese waren vier Verunreinigungen detektierbar, und zwar Olivetol (**17**), CBD, Exo-Tetrahydrocannabinol (Exo-THC, **23**) und  $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC, **22**). Durch die SMB-Aufreinigung konnten alle Verunreinigungen auf einen monographiekonformen (USP 37) Gehalt abgereichert werden. Nach der finalen destillativen Aufarbeitung trat eine noch nicht identifizierte Verunreinigung in einem Gehalt von ca. 0,4 Flächen-% auf.

CBDV konnte durch kontinuierliche Synthese in drei Schritten aus Divarincarbonsäuremethylester (DM, **25**) und Menthadienol G synthetisiert werden. Die Ausbeute betrug ca. 30%, die Reinheit nach Kristallisation > 99%. Es konnten fünf Nebenprodukte detektiert werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert wurden.

Der Syntheseweg bietet durch Modifikation der Seitengruppen an Position 6 ( $R^1$ ) und Position 5 ( $R^2$ ) der Alkylbenzol-Gruppe Zugang zu synthetischen Cannabinoiden mit einem CBD- oder CBDV-Grundgerüst. Es wurden neun neue Cannabinoide hergestellt: 2-Hydroxyethylcannabidiolat (2-HEC, **31**), 2-Hydroxypentylcannabidiolat (2-HPC, **32**), Glycerilcannabidiolat (GCBD, **33**), Cyclohexylcannabidiolat (CHC, **34**), Hexylcannabidiolat (HC, **35**), N-Methylsulfonylcannabidiolat (NMSC, **36**), 2-Hydroxyethylcannabidivarinolat

(2-HECBDV, **37**), Cyclohexylcannabidivarinolat (CHCBDV, **38**) und Hexylcannabidivarinolat (HCBDV, **39**).

Die Bindungsaffinität wurde in Cannabinoid-Rezeptor-transfizierten HEK293EBNA-Zellen untersucht, die intrinsische Aktivität in CHO-Zellen, die Induktion von NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) sowie von NFAT (nuclear factor of activated T cells) in Jurkat-T-Zellen, die Induktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Interleukin(IL)-6, IL-1 $\beta$ , CC-Chemokinligand 2' (CCL2) und Tumornekrosefaktor(TNF)- $\alpha$ ) auf mRNA-Ebene in RAW264.7-Makrophagen und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) auf Proteinebene in primären humanen Monozyten.

Die CBD-Derivate zeigten eine höhere Selektivität für CB2-Rezeptoren. Die CBDV-Derivate HCBDV und CHCBDV zeigten eine spezifische Bindung an CB1- und CB2-Rezeptoren im nanomolaren Bereich. 2-HEC, 2-HPC, GCBD und NMSC wirkten als Agonisten an CB2- und als Antagonisten am CB1-Rezeptor. CHC band an CB1 und CB2 im submikromolaren Bereich und schien ein Agonist für beide Rezeptoren zu sein. 2-HECBD wirkte als Agonist auf CB2-Rezeptoren und als Antagonist auf CB1-Rezeptoren. In Jurkat-T-Zellen hemmte NMSC dosisabhängig die Aktivität von NF- $\kappa$ B sowie von NFAT. 2-HEC, 2-HPC und GCBD hemmten die Expression von NFAT ebenfalls dosisabhängig. CHC und HC reduzierten dosisabhängig die Expression von IL-1 $\beta$ - und CCL2-mRNA in RAW264.7-Makrophagen. NMSC hemmte in geringeren Dosen IL-1 $\beta$ , CCL2 sowie TNF- $\alpha$  und induzierte in höheren Dosen einen starken Anstieg der IL-6-mRNA. In primären humanen Monozyten hemmten 2-HEC und GCBD konzentrationsabhängig die Synthese von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ . 2-HPC hemmte dosisabhängig die Bildung von TNF- $\alpha$  und IL-6. HC verminderte dosisabhängig die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-6. NMSC steigerte die durch LPS erhöhte Freisetzung von IL-1 $\beta$  noch weiter, hemmte aber TNF- $\alpha$ , IL-8 und PGE<sub>2</sub>.

Die hier untersuchten CBD- und CBDV-Derivate sind geeignet, gezielt an Cannabinoid-Rezeptoren zu wirken. Einige der Derivate könnten als selektive CB2-Agonisten genutzt werden. Die Länge des aliphatischen Rests an R<sup>2</sup> von CBD (Pentyl-Cannabinoiden) und CBDV (Propyl-Cannabinoiden) korrelierte nicht mit der Bindungsaffinität. Eine höhere Polarität an R<sup>1</sup> (2-HECBDV > NMSC > GCBD > 2-HEC) schien demgegenüber die agonistische Aktivität an CB2 zu begünstigen. Um den Ergebnissen zur Beziehung zwischen

---

Struktur und Wirkung noch mehr Bedeutung zu geben, wären weitere synthetische Derivate und deren Testung notwendig.

## 5 Summary

In this thesis a process for the efficient production of (–)-trans-cannabidiol (CBD, **10**), (–)-trans- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (dronabinol, **21**) und (–)-trans-cannabidivarin (CBDV, **30**) by means of continuous synthesis was researched and developed.

CBD was synthesized in three steps using a continuous synthesis process from olivetol-carboxylic acid methyl ester (OM, **6**) and Menthadienol G (**3**) with a yield of 41%. With optimized conditions, the purity after crystallization was >99%. The stereochemistry was distinctly determined as 1R,6R by X-ray crystal analysis. Beneficial was the fact that toluene was used instead of a chlorinated solvent. Further advantages comprised a short reaction time and the fact that the synthesis can be carried out at room temperature. Five by-products were detected and identified, one of them being dronabinol.

With optimized reaction parameters, a yield of up to 64.5% of dronabinol was achieved. By simulated moving bed (SMB) chromatography, dronabinol was produced repeatedly with a purity of >95%. After the synthesis process, four impurities were detectable, namely olivetol (**17**), CBD, exo-tetrahydrocannabinol (exo-THC, **23**) and  $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC, **22**). All impurities were depleted to a monograph (USP 37) conforming level through SMB purification. After the final distillation, one further unidentified impurity occurred with a content of about 0.4 area%.

CBDV was synthesized through continuous synthesis in three steps from divarin-carboxylic acid methyl ester (DM, **25**) und Menthadienol G. The yield was approximately 30%, the purity after crystallization >99%. Five by-products were detected which were not further characterized within the scope of this thesis.

Through modification of the side groups at position 6 ( $R^1$ ) and position 5 ( $R^2$ ) of the alkyl benzene moiety, the synthesis route offers access to synthetic cannabinoids with a CBD or CBDV scaffold. Nine new cannabinoids have been produced: 2-hydroxyethyl cannabidiolate (2-HEC, **31**), 2-hydroxypentyl cannabidiolate (2-HPC, **32**), glyceryl cannabidiolate (GCBD, **33**), cyclohexyl cannabidiolate (CHC, **34**), hexyl cannabidiolate (HC, **35**), N-methyl-sulfonyl

cannabidiolate (NMSC, **36**), 2-hydroxyethyl cannabidivarinolate (2-HECBDV, **37**), cyclohexyl cannabidivarinolate (CHCBDV, **38**), hexyl cannabidivarinolate (HCBDV, **39**).

Binding affinity was studied in CB receptor-transfected HEK293EBNA cells, the intrinsic activity in CHO cells, the induction of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and nuclear factor of activated T-cells (NFAT) in Jurkat T cells, the induction of pro-inflammatory cytokines and chemokines (interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , CC-chemokine ligand 2 (CCL2) and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ) on the mRNA level in RAW264.7 macrophages and the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) on the protein level in primary human monocytes.

The CBD derivatives showed higher selectivity for CB2. The CBDV derivatives HCBDV and CHCBDV showed specific binding at CB1 and CB2 receptors in the nanomolar range. 2-HEC, 2-HPC, GCBD and NMSC acted as agonists at CB2 and as antagonists at CB1 receptors. CHC bound CB1 and CB2 at the submicromolar range, and acted as an agonist for both receptors. 2-HECBDV was demonstrated to be an agonist at CB2 and an agonist at CB1. In Jurkat T cells, NMSC inhibited both NF- $\kappa$ B and NFAT activity in a dose-dependent fashion. 2-HEC, 2-HPC and GCBD inhibited the expression of NFAT, also in a dose-dependent manner. CHC and HC dose-dependently reduced the expression of IL-1 $\beta$  and CCL2 mRNA in RAW264.7 macrophages. NMSC inhibited at lower doses IL-1 $\beta$ , CCL2 and TNF- $\alpha$  and at higher doses induced a pronounced increase in IL-6 mRNA. In human primary monocytes, 2-HEC and GCBD inhibited IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  synthesis in a dose-dependent fashion. 2-HPC dose-dependently prevented the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in high concentrations. HC decreased TNF- $\alpha$  and IL-6 release in a dose-dependent fashion. NMSC further increased LPS-elevated IL-1 $\beta$  release but inhibited TNF- $\alpha$ , IL-8 und PGE<sub>2</sub>.

The CBD and CBDV derivatives studied here are suitable for targeting CB receptors. Some of the derivatives might be used as selective CB2 agonists. The length of the aliphatic rest at R<sup>2</sup> of CBD (pentyl) and CBDV (propyl) did not correlate with binding affinity. Higher polarity at R<sup>1</sup> (2-HECBDV > NMSC > GCBD > 2-HEC) however appeared to favor the agonistic activity at CB2 receptors. To give the results on the relationship between structure and effect more significance, further synthetic derivatives and their testing would be necessary.



## 6 Experimentalteil

### 6.1 Methoden und Materialien

#### 6.1.1 Analytik

##### 6.1.1.1 Flüssigchromatographie (LC)

###### 6.1.1.1.1 Analytik von Cannabidiol und Cannabidivarin sowie neuer Cannabinoide

Für die chromatographischen Arbeiten wurden HPLC-Geräte der Fa. Agilent, Modelle HP 1100 und 1200, verwendet.

**Methode A:** Als stationäre Phase diente eine Agilent Poroshell 120 EC-C18 (C18, Octadecylsilan, 50 mm × 3 mm; 2,7 µm). Die Temperatur war 25 °C. Der Eluent bestand aus 80% MeOH und 20% Wasser und wurde isokratisch geführt. Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 0,5 ml/min festgelegt.

Als Detektionswellenlänge wurde 205 nm für CBD, Olivetol und Toluol bzw. 220 nm für Olivetolmethylester, (-)-trans-Methylcannabidiolat und die neuen Cannabinoide gewählt.

**Methode B:** Zur Optimierung der Trennung wurde später eine Säule der Fa. Restek, Modell Raptor ARC-18 (C18, Octadecylsilan; 150 mm × 4,6 mm; 2,7 µm) gewählt. Als Temperatur wurden ebenfalls 25 °C festgelegt.

Für die Gradientenelution wurde mit einem binären System aus mit Phosphorsäure auf pH 2,8 eingestelltem Wasser (A) und Acetonitril (B) gearbeitet (Tab. 25).

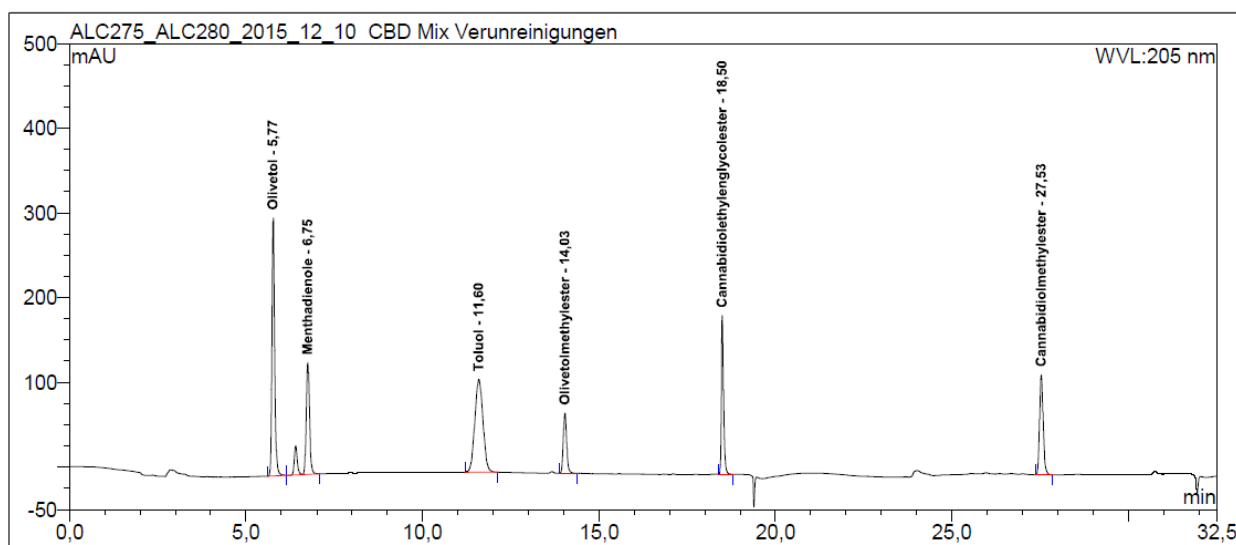
**Tab. 25:** Gradient für CBD

Zeit [min]	C <sub>A</sub> [%]	C <sub>B</sub> [%]
0,0–5,1	45,0	55,0
5,1–12,5	50,0	50,0
12,5–15,0	15,0	85,0
15,0–15,1	5,0	95,0
15,1–20,1	70,0	30,0
20,1–27,6	5,0	95,0
27,6–32,5 (Ende)	45,0	55,0

Die Auswertung wurde anhand der Retentionszeiten durch Vergleich mit dem jeweiligen Standard vorgenommen. Bei der Analytik von CBD ergaben die Standards die in Tab. 26 aufgeführten und in Abb. 100 dargestellten Retentionszeiten. Tab. 27 und Abb. 101 zeigen analog die Retentionszeiten für die Analytik von CBDV. Die Werte in den Tabellen stellen Mittelwerte aus drei Messungen dar, daher können sie geringfügig von den Werten im Chromatogramm abweichen.

**Tab. 26:** Retentionszeiten in der CBD-Analytik (MW aus n = 3 Messungen)

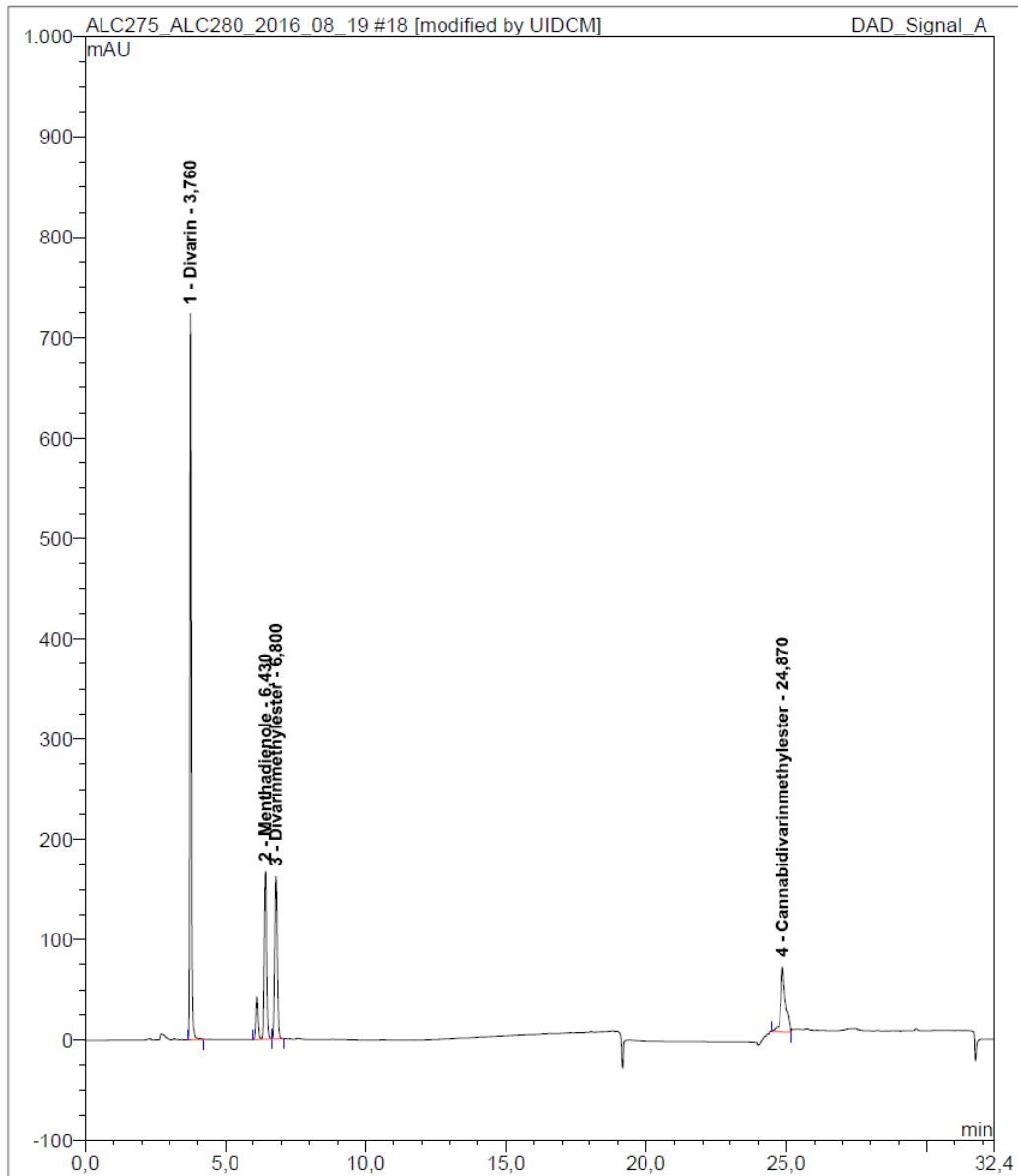
Signale	Wellenlänge [nm]	RT [min]	Bezeichnung
1	205	5,7	Olivetol
2	205	6,6	Menthadienol
3	205	11,5	Toluol
4	220	13,9	Olivetolmethylester
5	205	18,1	CBD
6	220	18,4	CBD-Ethylenglycolester (2-HEC)
7	220	27,4	CBD-Methylester



**Abb. 100:** HPLC-Chromatogramm der bekannten Verunreinigungen von CBD

**Tab. 27:** Retentionszeiten in der CBDV-Analytik (MW aus n = 3 Messungen)

Signale	Wellenlänge [nm]	RT [min]	Bezeichnung
1	205	3,9	Divarin
2	205	6,6	Menthadienol
3	220	7,1	Divarinmethylester
4	205	16,5	CBDV
5	220	24,8	CBDV-Methylester



**Abb. 101:** HPLC-Chromatogramm der bekannten Verunreinigungen von CBDV

Die Quantifizierung der einzelnen Komponenten erfolgte mit Hilfe des jeweiligen externen Standards durch Korrelation der Signale. Der Gehalt berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\text{Gehalt der Probe [\%]} = \frac{F_{\text{Probe}} \cdot m_{\text{Standard}} \cdot C_{\text{Standard}}}{F_{\text{Standard}} \cdot m_{\text{Probe}}}$$

$F_{\text{Probe}}$  = Fläche der Probenkurve [mAU\*min]

$F_{\text{Standard}}$  = Fläche der Standardkurve [mAU\*min]

$C_{\text{Standard}}$  = Konzentration des Standards [%]

$m_{\text{Standard}}$  = Gewicht des Standards [mg]

$m_{\text{Probe}}$  = Gewicht der Probe [mg]

Ein Korrelationskoeffizient von  $> 0,9950$  war in einem Bereich von 22,6–800 ng (CBD) bzw. 39,2–762 ng (CBDV) auf der Säule gegeben. Damit konnte bei 2  $\mu\text{l}$  Injektionsvolumen in einem Konzentrationsbereich von 16,8–400 mg/l (CBD) bzw. 19,6–381 mg/l (CBDV) die Linearität der Methode angenommen werden.

**Methode C:** Abweichend von Methode B wurde hier mit einer Säule der Fa. YMC ODS-AQ (C18, Octadecylsilan; 150 mm  $\times$  3 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) bei einer Temperatur von 40 °C gearbeitet. Der Eluent war aus Wasser und mit einem Anteil von 0,1% Ameisensäure und MeOH im Verhältnis 50 : 50 zusammengesetzt. Die Flussrate betrug 0,6 ml/min.

### 6.1.1.1.2 Analytik von Dronabinol

Dronabinol wurde gemäß der USP 37 auf Identität, Gehalt und Reinheit untersucht (**Methode D**). Dazu wurde ein HPLC-System der Smartline-Serie der Fa. Knauer, Berlin, mit der dazugehörigen Pumpe (Modell 1050), einem Multiwellenlängen-Spektralfotometer (Modell Smartline Detector 2600) und einem Autosampler (Modell Optimas 1.02) verwendet.

Als Eluent wurde ein Gemischt aus 45% MeOH, 25% Wasser, 20% THF und 10% Acetonitril gemäß USP verwendet. Als feste Phase wurde eine Säule der Fa. Restek, Modell Raptor ARC-18 (C18, Octadecylsilan; 150 mm  $\times$  4,6 mm; 2,7  $\mu\text{m}$ ). Die Flussrate betrug 0,8 ml/min, die Ofentemperatur 20 °C und das Injektionsvolumen 10  $\mu\text{l}$ .

20 mg des Standards für Dronabinol (z. B. Cerilliant, Fa. Sigma-Aldrich) wurden in 100 ml MeOH (Chromasolv<sup>®</sup>, für HPLC  $\geq 99,8\%$ , Fa. Honeywell) gelöst. Die Proben wurden ebenfalls zu ca. 20 mg Dronabinol in einen 100 ml Messkolben eingewogen und in MeOH gelöst.

Die Auswertung wurde anhand der Retentionszeiten durch Vergleich mit dem jeweiligen Standard vorgenommen. Es ergaben sich die in Tab. 28 aufgeführten Retentionszeiten. Diese stimmen für Exo-THC und  $\Delta 8$ -THC mit den von der USP 37 angegebenen relativen Retentionszeiten (RT) weitgehend überein (Tab. 29). Die USP nennt Cannabinol als potentielle Verunreinigung. Cannabinol entsteht bei der Reaktionsführung, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, nicht. Jedoch sind als weitere Verunreinigungen Olivetol und

CBD detektierbar. Ihre Anwesenheit in der Analysenlösung könnte die geringfügige Abweichung der tatsächlichen von den nach USP berechneten Retentionszeiten erklären.

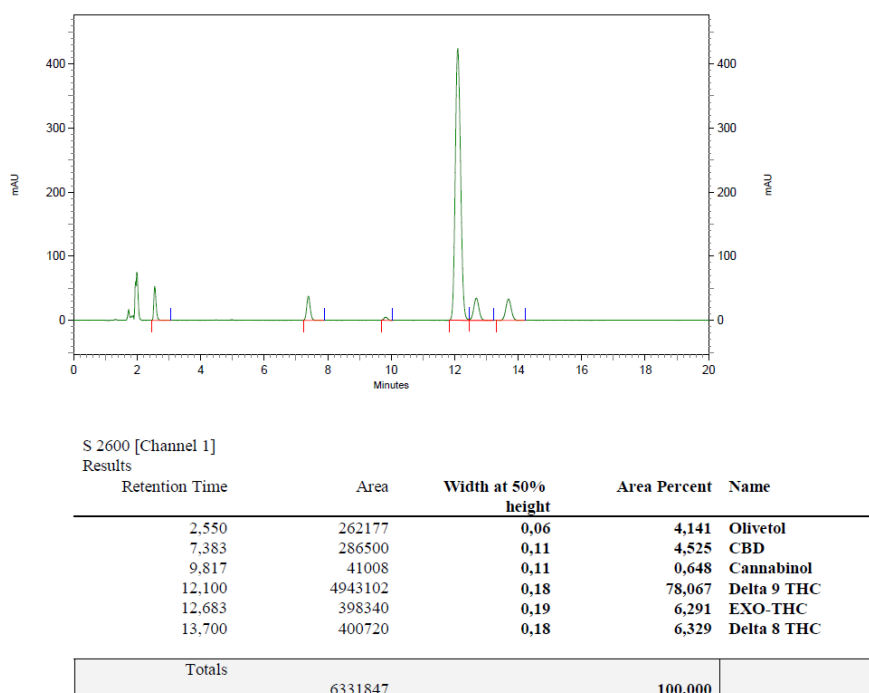
**Tab. 28:** Retentionszeiten gemäß der USP-Analytik

Signale	Wellenlänge [nm]	RT [min]	Relative RT (USP)	Berechnete RT (USP) [min]	Bezeichnung
1	228	2,6	–	–	Olivetol
2	228	7,4	–	–	CBDV
3	228	9,8	0,78	9,4	Cannabinol
4	228	12,1	1	12,1	$\Delta$ 9-THC
5	228	12,7	1,07	12,9	Exo-THC
6	228	13,7	1,18	14,3	$\Delta$ 8-THC

**Tab. 29:** Verunreinigungsprofil laut USP 37

Relative RT	Relative Signalstärke	Limit [%]	Bezeichnung
0,78	2,7	1,5	Cannabinol
1,00	1,0	–	$\Delta$ 9-THC
1,07	0,92	0,5	Exo-THC
1,18	0,90	2,0	$\Delta$ 8-THC
–	1,0	1,0	Andere

Ein eigens zu diesem Zweck hergestelltes Gemisch aus den bekannten Verunreinigungen ist in Abb. 102 zu sehen.



**Abb. 102:** Mit Hilfe von Standards nachgestelltes Verunreinigungsprofil von Dronabinol

Die Quantifizierung der einzelnen Komponenten erfolgte mit Hilfe des jeweiligen externen Standards durch Korrelation der Signale. Die Monographie schreibt einen Systemeignungstest vor, der die Parameter Auflösung, Peaksymmetrie und Wiederholbarkeit enthält. Die verwendete Methode erfüllte alle Parameter. Die Empfindlichkeit der Methode wurde entsprechend der Vorgabe der Monographie ebenfalls getestet. Ein Beispiel für die Ergebnisse des Systemeignungs- und Empfindlichkeitstests ist in Tab. 30 dargestellt.

**Tab. 30:** Ergebnisse eines Systemeignungs- und Empfindlichkeitstests nach USP 37 für Dronabinol

<b>Systemeignung</b>		
<b>1. Auflösung zwischen Dronabinol und Exo-THC</b>		
Retentionszeit Dronabinol:	12,1	min
Retentionszeit Exo-THC:	12,6	min
Halbwertsbreite Dronabinol:	0,2	min
Halbwertsbreite Exo-THC:	0,18	min
<b>Auflösung:</b>	<b>1,71</b>	Soll: > 1,5
<b>2. Peaksymmetrie Dronabinol</b>		
<b>Tailingfaktor:</b>	<b>1,1</b>	Soll: < 2,0
<b>3. Wiederholbarkeit</b>		
	<b>Peakfläche Dronabinol</b>	
1. Injektion	4 697 389	
2. Injektion	4 665 721	
3. Injektion	4 707 005	
4. Injektion	4 705 797	
5. Injektion	4 740 832	
<b>Mittelwert</b>	<b>4 703 348</b>	
<b>SD</b>	<b>26 812</b>	
<b>rel. SD [%]</b>	<b>0,57</b>	Soll: < 2 %
<b>Empfindlichkeit</b>		
<b>S/N Dronabinol</b>	<b>13,8</b>	Soll: > 10

Die Linearität der Methode wurde in einem Bereich 0,05–0,6 mg/ml überprüft. Dafür wurden folgende Lösungen hergestellt:

0,05 mg/ml: 500 µl der 0,1-mg/ml-Lösung mit 500 µl MeOH verdünnt.

0,1 mg/ml: 500 µl der 0,2-mg/ml-Lösung mit 500 µl MeOH verdünnt.

0,2 mg/ml: 1000 µl Dronabinol-Lösung (Cerillant, 1,0 mg/ml) mit MeOH auf 5 ml verdünnt.

0,4 mg/ml: 400 µl Dronabinol-Lösung (Cerilliant, 1,0 mg/ml) mit 600 µl MeOH verdünnt.

0,6 mg/ml: 600 µl Dronabinol-Lösung (Cerilliant, 1,0 mg/ml) mit 400 µl MeOH verdünnt.

Es wurden Doppelbestimmungen (zwei unabhängige Proben) und sechs Bestimmungen pro Probe vorgenommen. Ein Korrelationskoeffizient von  $> 0,9950$  war für Dronabinol in einem Bereich von 0,05–0,2 mg/ml auf der Säule gegeben. Damit konnte die Linearität der Methode für Dronabinol in diesem Bereich angenommen werden.

### 6.1.1.1.3 LC-MS/MS

Die qualitative Bestimmung von  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC und Exo-THC mittels LC-MS/MS wurde durch visuellen Vergleich von Chromatogrammen der MRM-Übergänge mit Referenzspektren unter Berücksichtigung der Retentionszeit durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über einen internen Standard des jeweiligen Analyten. Die Analysen wurden mit dem System Agilent 1290, das mit einem Agilent 6460 Triple Quad gekoppelt war, durchgeführt. Als stationäre Phase diente eine Säule der Fa. Restek, Modell Raptor ARC-18 (C18, Octadecylsilan; 150 mm  $\times$  4,6 mm; 2,7 µm). Die Flussrate betrug 0,8 ml/min, die Ofentemperatur 30 °C und das Injektionsvolumen 10 µl. Als Eluent wurde, wie zuvor, ein Gemisch aus 45 % MeOH, 25 % Wasser, 20 % THF und 10 % Acetonitril gemäß USP verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Agilent-Software MassHunter. Die Parameter für die oben genannten Analyten sind in Tab. 31 angegeben.

Die Auswertung wurde anhand der Retentionszeiten durch Vergleich mit dem jeweiligen Standard vorgenommen. Zeigten die Massenspektren für den jeweiligen Analyten einen Peak bei der entsprechenden Retentionszeit, so wurde dessen Anwesenheit bestätigt.

**Tab. 31:** Parameter der LC-MS/MS-Analytik

Name (mol. Masse [g/mol])	MRM1 (Quantifier)	MRM2 (Qualifier)	Frag V	CE1	CE2	RT [min]	Ratio [%]	LOQ [mg/l]
$\Delta^9$ -THC (314,5)	313,2→245,0	313,2→191,1	-250	-19	-22	12,1	113	< 5
$\Delta^8$ -THC (314,5)	313,2→245,0	313,2→191,1	-265	-18	-14	13,6	62	< 5
Exo-THC (314,5)	313,2→245,0	313,2→191,1	-216	-14	-9	12,6	59	< 5

MRM1 = erster Massenübergang; MRM2 = zweiter Massenübergang; Frag V = engl. Fragmentor Voltage; Fragmentierungsspannung an den Glaskapillaren; CE1/2 = Kollisionsenergie für den ersten bzw. zweiten Übergang; Retentionszeit = Zeit, zu welcher der Peak im Chromatogramm auftritt; Ratio = Verhältnis Quantifier/Qualifier; LOQ = Bestimmungsgrenze

Die Quantifizierung der einzelnen Komponenten erfolgte mit Hilfe des jeweiligen externen Standards durch Korrelation der Signale. Für jeden Analyten wurde der Peak in der Massenspur des Quantifiers integriert und die erhaltene Fläche mit der Fläche des internen Standard-Quantifiers ins Verhältnis gesetzt („relative response“). Das Verhältnis aus dazugehöriger Analyten-Konzentration und dem internen Standard-Quantifier („relative concentration“) wurde gegen die „relative response“ aufgetragen. Die Methode zeigte im Messbereich von 5–100 mg/l bei 5 µl Injektionsvolumen eine zufriedenstellende Linearität. Der Korrelationskoeffizient war > 0,99.

### **6.1.1.2 Gaschromatographie (GC)**

#### **6.1.1.2.1 GC-FID**

Gaschromatographische Bestimmungen wurden auf einem Gaschromatographen 7890A (Fa. Agilent) durchgeführt. Als stationäre Phase diente die polare Säule ZB-WAX (Polyethylenglycol, id: 0,18 mm, Länge: 20 m, df: 18 µm, Fa. Phenomenex) oder die unpolare Säule ZB-1MS (Dimethylpolysiloxan, id: 0,18 mm, Länge: 20 m, df: 0,18 µm (Fa. Phenomenex). Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet, als Make-up-Gas Stickstoff. Die Säulenströmung betrug in der Regel konstant 1,3 ml/min über 17 min, danach wurde die Flussrate um 0,5 ml/min bis 3 ml/min graduell erhöht. Die Ofentemperatur betrug anfangs 60 °C und wurde dann mit 9 °C/min auf 240 °C gesteigert. Das Injektionsvolumen betrug 1,0 µl bei einem Split von 1 : 70. Die Probe wurde in den Trägergasstrom eingebracht und auf die Kapillartrennsäule überführt. Die Detektion erfolgte mittels eines Flammenionisationsdetektors (FID) bei 275 °C.

#### **6.1.1.2.2 GC-MS**

Um massenspektrometrische Untersuchungen durchzuführen, wurde ein Shimadzu GC 2010 verwendet. Die Trennung wurde an der unpolaren Säule ZB-1MS (Dimethylpolysiloxan, id: 0,18 mm, Länge: 20 m, df: 0,18 µm, Fa. Phenomenex) durchgeführt. Als Trägergas wurde



Helium verwendet. Die Säulenströmung betrug in der Regel konstant 1,02 ml/min. Die Ofentemperatur betrug anfangs 60 °C und wurde dann mit 9 °C/min auf 300 °C gesteigert. Das Injektionsvolumen betrug 1,0 µl bei einem Split von 1:30. Die Elektronspray-Ionisation (ESI)-Massenspektren wurden mit dem Shimadzu QP2010 in der Regel im positiven Modus gemessen. Im Falle, dass im negativen Modus gemessen wurde, ist dies beim jeweiligen Messwert angegeben.

### 6.1.1.2.3 Chirale GC

Zur gaschromatographischen Bestimmung (Gaschromatograph Agilent 6890) der Enantiomerenzusammensetzung von chiralen Verbindungen auf einer chiralen Phase wurde ein Aliquot einer flüssigen Probe im Injektor verdampft. Folgende Säulen wurden verwendet:

- Hydrodex-β-3P (Heptakis-(2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl)-β-cyclodextrin, id: 0,25 mm, Länge: 20 m, Fa. Macherey-Nagel)
- Hydrodex-β-6 TBDM (Heptakis-(2,3-di-O-methyl-6-O-t-butyldimethylsilyl)-β-cyclodextrin, id: 0,25 mm, Länge: 25 m (Fa. Macherey-Nagel)
- Lipodex G (Octakis-(2,3-di-O-pentyl-6-O-methyl)-gamma-cyclodextrin, id: 0,25 mm, Länge: 25 m, Fa. Macherey-Nagel)

Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet, als Make-up-Gas Stickstoff. Die Säulenströmung betrug in der Regel 2 ml/min im konstanten Fluss. Die Aufgabe erfolgte mit einer Injektortemperatur von 220 °C. Das Injektionsvolumen betrug 1,0 µl bei einem Split von 1:50, die FID-Detektortemperatur 230 °C. Das Temperaturprogramm wurde von 180 °C mit 1 °C/min zu 220 °C geführt. Der Nachlauf betrug 20 min. Die Detektion erfolgte mittels eines FID oder eines FTIR-Spektrometers (Nicolet 6700, Fa. Thermo Scientific). Die Auswertung erfolgte mit dem Dionex-Labordatensystem Chromeleon.

Die Auswertung ergibt den Enantiomerenüberschuss (ee) nach folgender Berechnung:

$$A_{\text{Peak 1}} [\%] = \frac{A_{\text{Peak 1}} \cdot 100}{\sum A_{\text{Peak i}}}$$

$$A_{\text{Peak 2}} [\%] = \frac{A_{\text{Peak 2}} \cdot 100}{\sum A_{\text{Peak i}}}$$

$$ee [\%] = |A_{\text{Peak 1}} [\%] - A_{\text{Peak 2}} [\%]|$$

### **6.1.1.3 Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie (FTIR)**

Die Bestimmung von Infrarot-Absorptionsspektren wurde mit einem Nicolet 6700 (Fa. Thermo Scientific) Infrarotspektrometer vorgenommen. Die Proben wurden entweder als Film auf NaCl-Platten, als KBr-Presslinge oder in einer Diamant-Golden-Gate-ATR (engl. attenuated total reflection)-Apparatur vorbereitet. Die Messung wurde als Fourier-Transform-Infrarotspektrum vermessen.  $\tilde{\nu}$  bezeichnet die Wellenzahl. Die Auflösung von  $\tilde{\nu}$  betrug jeweils  $1 \text{ cm}^{-1}$ .

### **6.1.1.4 Röntgeneinkristallstrukturanalyse**

Ein einzelner Einkristall der zu untersuchenden Verbindung wurde unter dem Stereomikroskop ausgewählt und für die anschließende Kristallstrukturanalyse mittels eines hochviskosen Perfluorpolyethers auf einen Träger aus Kaptonfolie montiert. Die Datensammlung erfolgte bei einer Temperatur von 100 K mit einem Proteum-Diffraktometersystem der Fa. Bruker AXS GmbH unter Verwendung von Cu-K $\alpha$ -Strahlung, die mit Hilfe einer Drehanode des Typs FR591 erzeugt wurde.

Die Beugungsbilder wurden unter Verwendung der APEX2-Software ausgewertet und die resultierenden Beugungsintensitäten nach Skalierung mit dem Programm SADABS für die anschließende Strukturlösung und -verfeinerung mit den SHELX-Programmen aufbereitet.

### **6.1.1.5 Refraktionsindex**

Der Refraktionsindex wurde mit einem Abbémat- (Fa. Dr. Kernchen) oder DUR-Refraktometer (Fa. Schmidt + Haensch) bestimmt. Die verwendete Wellenlänge betrug 589,3 nm (Natrium-D-Linie). Die Messeinheit und die Proben waren auf 20 °C temperiert.

### **6.1.1.6 Spezifische Drehung**

Die spezifische Drehung wurde mittels eines automatischen Polarimeters Propol (Fa. Anton Paar OptoTec GmbH) gemessen. Als Lichtquelle wurde eine Wolfram-Halogen-Lampe mit einem Wellenlängenfilter für die Natrium-D-Linie (589,3 nm) verwendet. Die Messzelle war thermostatisiert und wurde bei 20 °C, 23 °C oder 25 °C (jeweils  $\pm 1 \text{ °C}$ ) verwendet. Wenn

nicht anders angegeben, wurde die Probe in EtOH (96 %) klar gelöst und vermessen. Die optische Drehung wurde wie folgt berechnet:

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha}{l}$$

Dabei bezeichnet  $\alpha$  den gemessenen Rotationswinkel [°],  $t$  die Temperatur [°C],  $\lambda$  die Wellenlänge [nm] und  $l$  den Lichtweg in der Messzelle [dm].

Die spezifische Rotation wurde wie folgt berechnet:

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha \cdot 100}{\beta \cdot l}$$

Dabei bezeichnet  $\alpha$  den gemessenen Rotationswinkel [°],  $t$  die Temperatur [°C],  $\lambda$  die Wellenlänge [nm],  $l$  den Lichtweg in der Messzelle [dm] und  $\beta$  die Konzentration der Lösung [g/100 ml].

#### 6.1.1.7 NMR-Spektroskopie

$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden bei 300 K mittels eines AV-III-Spektrometers mit 400- / 600 MHz (Fa. Bruker) aufgenommen (bei 400 oder 600 MHz für Protonenspektren und 100 oder 150 MHz für  $^{13}\text{C}$ -Spektren). Die Daten wurden mit der Software Mnova (Fa. Mestrelab Research) ausgewertet. Alle Spektren wurden mit der Mnova-Datenbank abgeglichen. Als Lösungsmittel wurden  $\text{CDCl}_3$  oder Benzen- $\text{d}_6$  (Fa. Sigma-Aldrich) verwendet. Als interner Standard diente Tetramethylsilan.

Zur Beschreibung der Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, p = Pentett, sext = Sextett, m = Multiplett und ihre entsprechenden Zusammensetzung (z.B. ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett).

Die Angabe der chemischen Verschiebung  $\delta$  erfolgt in ppm, die Angabe der Kopplungskonstante  $J$  in Hz.

## **6.1.2 Synthese**

### **6.1.2.1 OptiMax 1001**

Die Synthese von Dronabinol wurde mit Hilfe der Synthese-Arbeitsstation OptiMax 1001 (Fa. Mettler-Toledo) durchgeführt. Der Glasreaktor wird durch zwei Dosiereinheiten (SP50) über Schläuche vollautomatisch beschickt. Die Apparatur verfügt über einen online steuerbaren Festkörperthermostat, der die Temperierung des Doppelmantelreaktors automatisch steuert. Die Apparatur wird durch die Software iControl gesteuert, die alle am Prozess beteiligten Parameter dokumentiert. Dazu zählen die Temperaturen im Reaktor ( $T_r$ ) und des Reaktormantels ( $T_j$ ), die sich daraus ergebende Temperaturdifferenz, das Reaktionsvolumen im Reaktor ( $V_r$ ), das zudosierte Volumen und die Rührgeschwindigkeit.

### **6.1.3 Präparative HPLC**

Präparative HPLC-Trennungen wurden auf einem Knauer-Smartline-HPLC-System durchgeführt, bestehend aus zwei WellChrom-präparativen Pumpen K-1800, dem WellChrom-DAD K-2800 sowie den Injektions- und Schaltventilen K-6 und K-16 und kontrolliert durch die Software EZChrom Elite. Als stationäre Phase wurde die Säule Eurosphere 2 100-10 (C18, Octadecylsilan; 250 mm × 20 mm; 10  $\mu$ m) der Fa. Knauer verwendet. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus MeOH und Wasser (Verhältnis 90:10). Es erfolgte eine isokratische Elution bei einer Flussrate von 30 ml/min, einem Druck von 55 bar und Raumtemperatur. Die Detektion erfolgte bei  $\lambda = 228$  nm. Typischerweise wurden ca. 3,0 g des zu extrahierenden Gemisches in 30 ml MeOH gelöst und in 10 Zyklen extrahiert.

### **6.1.4 Reinigung mittels SMB-Chromatographie**

Für den SMB-Prozess wurde die SMB-Anlage C9116 der Fa. Knauer verwendet. Das System besteht aus acht Vertex-Plus-Trennsäulen (250 mm × 8 mm) sowie den dazu benötigten Pumpen. Die Bewegung der einzelnen Säulen wird durch ein 64-Port Rotorventil ermöglicht. Das Ventil und die HPLC-Säulen befinden sich in einem temperierten Säulenofen. Die Flussraten wurden mit dem Humonics Optiflow 520 gemessen.

Für die Trennung sind Umkehrphasensilikate (Eurosphere 2; C18P, Octadecylsilan) mit einer Korngröße von 10–100  $\mu$ m geeignet. Es wurden Partikel mit einer Korngröße von 20–45  $\mu$ m verwendet.

---

Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus MeOH, THF und Wasser (Verhältnis 62:17:21) verwendet. Zusätzlich wurde dem Gemisch 0,1% Ascorbinsäure als Oxidationsschutz zugefügt.<sup>132</sup>

### 6.1.5 Verwendete Chemikalien

Sämtliche für die Säulenchromatographie und die SMB-Chromatographie verwendeten Lösungsmittel – bis auf das Wasser – wurden kommerziell erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

- Wasser: Reinstwasser oder deionisiertes Wasser (Reinwassersystem arium<sup>®</sup> advance RO, Fa. Sartorius)
- Acetonitril (Acetonitril Chromasolv<sup>®</sup>, für HPLC  $\geq 99,9\%$ , Fa. Honeywell, zuvor von Fa. Sigma-Aldrich)
- Methanol (Methanol Chromasolv<sup>®</sup>, für HPLC  $\geq 99,9\%$ , Fa. Honeywell, zuvor von Fa. Sigma-Aldrich)
- Tetrahydrofuran (Tetrahydrofuran Chromasolv<sup>®</sup> Plus, für HPLC  $\geq 99,9\%$ , Fa. Honeywell, zuvor von Fa. Sigma-Aldrich)

Zusätzlich zu den oben genannten wurden für die extraktive Reinigung noch folgende Chemikalien verwendet:

- Cyclohexan (geeignet für Pestizidrückstandsanalytik,  $> 99,5\%$ , Fa. Honeywell Fluka)
- Ascorbinsäure (kristallin, in Reagenzqualität, Fa. Sigma-Aldrich)

Reaktionen mit Luft- und/oder feuchtigkeitsempfindlichen Substanzen wurden in temperierten Apparaturen unter Stickstoff- oder Argon-Atmosphäre durchgeführt. Alle Zwischenprodukte, die Lösungsmittel enthielten, wurden unter Stickstoff- oder Argon-Atmosphäre gelagert.

Als Lösungsmittel für GC-Proben, insbesondere bei der chiralen GC, wurde MTBE (Chromasolv<sup>®</sup>,  $> 99,8\%$ , Fa. Honeywell, zuvor von Fa. Sigma-Aldrich) verwendet.

Chemikalien zur Synthese, die nicht durch Symrise selbst hergestellt wurden, wurden von folgenden Firmen erworben: Acros (New Jersey, USA), Dow Chemicals (Midland, USA),

Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland), Honeywell Fluka (Seelze, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland).

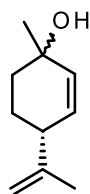
### 6.1.5.1 Menthadienol G

Menthadienol G wird von der Fa. Symrise großtechnisch hergestellt. Die folgenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erhoben:

Menthadienol G hat einen Gehalt von 97% (+)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol.

Summenformel: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O

M<sub>r</sub>: 152,2 g/mol



Refraktionsindex von Menthadienol G  $n_D^{20}$ : 1,4898

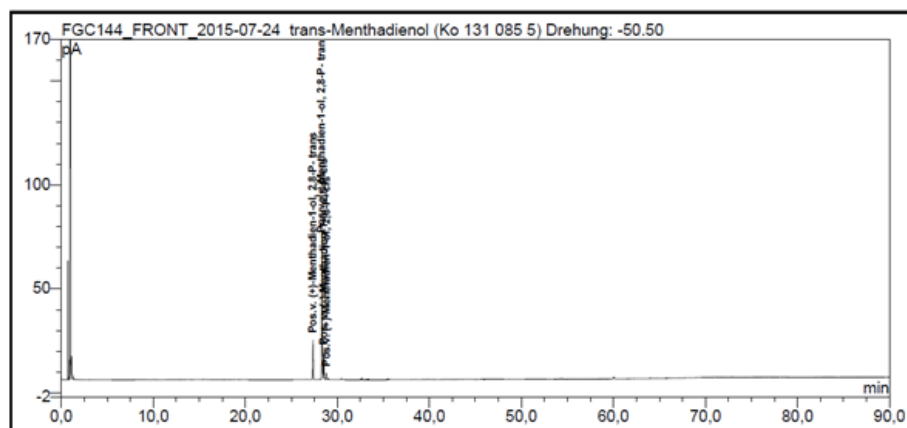
Spezifische Drehung von Menthadienol G  $[\alpha]_D^{25,9}$ : +98,9° in EtOH (96%)

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5,71 (ddd, J = 10,0, 2,3, 1,3 Hz, 1H); 5,70 (dd, J = 10,1, 2,2 Hz, 1H); 5,66 (ddd, J = 10,0, 2,4, 1,0 Hz, 1H); 5,61 (dd, J = 10,1, 3,3 Hz, 1H); 4,78 (p, J = 1,5 Hz, 2H); 4,75 (p, J = 1,0 Hz, 1H); 4,67 (p, J = 1,0 Hz, 1H); 2,74 (tt, J = 6,2, 2,9 Hz, 1H); 2,68–2,63 (m, 1H); 1,93–1,86 (m, 1H); 1,86–1,75 (m, 3H); 1,75–1,74 (m, 3H); 1,74–1,73 (m, 3H); 1,69–1,51 (m, 4H); 1,30 (s, 3H); 1,29 (s, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 148,1; 147,2; 134,5; 133,9; 132,1; 130,8; 110,9; 110,6; 68,6; 67,5; 43,4; 42,5; 36,7; 36,1; 29,4; 28,9; 25,0; 24,9; 21,2; 20,9

IR (NaCl),  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 673, 738, 815, 833, 890, 906, 951, 979, 1008, 1060, 1107, 1123, 1163, 1198, 1220, 1289, 1326, 1372, 1450, 1644, 1716, 2865, 2937, 2967, 3017, 3075, 3360

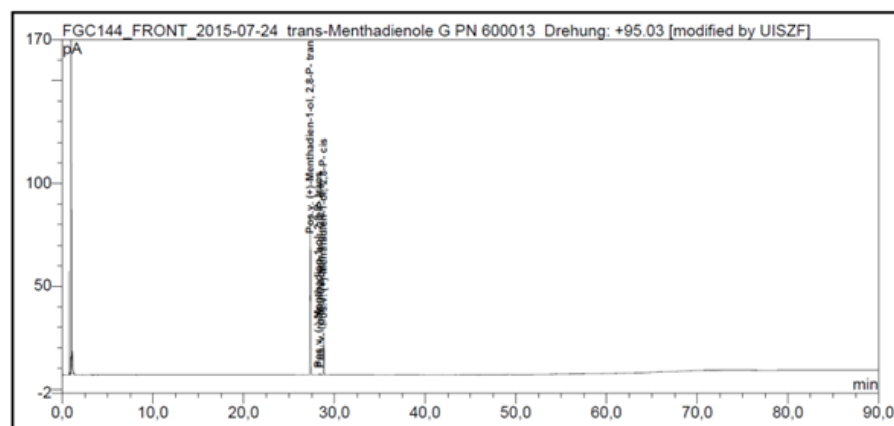
Aus einer eigens erstellten Mischung der möglichen Enantiomere von (-)- und (+)-Menthadienol wurden deren Retentionszeiten auf einer chiralen Säule (Lipodex-G, Fa. Macherey-Nagel) bestimmt (Abb. 103).



Ret. Time min	Ret. Index	Area mV*min	Type	Rel. Area %	Peak Name
27,357	n.a.	1,308	BMB	15,211	Pos.v. (+)-Menthadien-1-ol, 1S,4R
28,053	n.a.	0,001	BMB	0,009	n.a.
28,313	n.a.	5,747	BM	66,845	Pos.v. (-)-Menthadien-1-ol, 1R,4S
28,525	n.a.	0,952	MB	11,070	Pos. v. (-)-Menthadien-1-ol, 1S,4S
28,810	n.a.	0,214	BM	2,489	Pos.v. (+)-Menthadien-1-ol, 1R,4R

**Abb. 103:** GC-Chromatogramm einer Mischung von (-)- und (+)-Menthadienol (rot umrahmt) mit ihren Diastereomeren und den zugehörigen Retentionszeiten

Die GC-Analyse des Menthadienol G zeigte, dass (-)-Menthadien-1-ol (1R,4S und 1S,4S) nur in Spuren in Menthadienol G enthalten ist (Abb. 104).



Ret. Time min	Ret. Index	Area mV*min	Type	Rel. Area %	Peak Name
27,340	n.a.	6,075	BMB	78,082	Pos.v. (+)-Menthadien-1-ol, 1S,4R
27,842	n.a.	0,006	BMB	0,073	n.a.
28,288	n.a.	0,028	BM *	0,363	Pos.v. (-)-Menthadien-1-ol, 1R,4S
28,402	n.a.	0,038	M *	0,491	n.a.
28,538	n.a.	0,016	MB*	0,202	Pos. v. (-)-Menthadien-1-ol, 1S,4S
28,828	n.a.	1,509	BM	19,399	Pos.v. (+)-Menthadien-1-ol, 1R,4R

**Abb. 104:** GC-Chromatogramm von Menthadienol G mit den beiden Diastereomeren (+)-(1S,4R)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol und (+)-(1R,4R)-p-Mentha-2,8-dien-1-ol (beide grün umrahmt) und den Positionen der (-)-Enantiomere

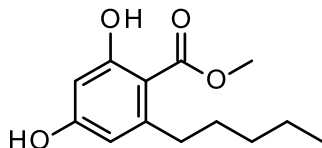
## 6.1.5.2 Resorcin-Derivate

### 6.1.5.2.1 Olivetolcarbonsäuremethylester (OM)

OM wird von der Fa. Symrise großtechnisch hergestellt. Die folgenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erhoben:

Summenformel: C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>

M<sub>r</sub>: 238,3 g/mol



<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11,78 (s, 1H); 6,29 (d, J = 2,5 Hz, 1H); 6,24 (d, J = 2,6 Hz, 1H); 5,92 (s, 1H); 3,92 (s, 3H); 2,87–2,76 (m, 2H); 1,52 (p, J = 7,2 Hz, 2H); 1,33 (m, 4H); 0,96–0,84 (m, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172,0; 165,1; 160,5; 149,0; 110,9; 105,0; 101,4; 52,0; 36,8; 32,1; 31,5; 22,5; 14,1

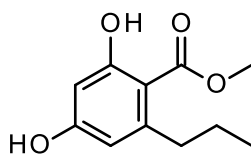
IR (KBr),  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 617, 641, 672, 710, 739, 767, 805, 813, 838, 856, 950, 976, 1007, 1020, 1030, 1072, 1104, 1160, 1173, 1193, 1211, 1257, 1285, 1320, 1351, 1382, 1432, 1445, 1495, 1585, 1645, 2866, 2930, 2951, 3366

### 6.1.5.2.2 Divarincarbonsäuremethylester (DM)

DM wurde von der Fa. Symrise (Labore Koch und Dilk) zur Verfügung gestellt. Die folgenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erhoben:

Summenformel: C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

M<sub>r</sub>: 210,2 g/mol



<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11,74 (s, 1H); 6,29 (d, J = 2,6 Hz, 1H); 6,24 (d, J = 2,6 Hz, 1H); 5,62 (s, 1H); 3,93 (s, 3H); 2,86–2,78 (m, 2H); 1,60–1,49 (m, 2H); 0,95 (t, J = 7,4 Hz, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172,0; 165,2; 160,3; 148,7; 110,9; 105,1; 101,4; 52,0; 38,8; 24,9; 14,3



IR (NaCl),  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 619, 723, 813, 846, 888, 980, 1020, 1053, 1071, 1084, 1106, 1143, 1163, 1194, 1241, 1263, 1276, 1310, 1323, 1376, 1435, 1577, 1619, 1648, 2832, 2872, 2928, 2962, 3071, 3411

## 6.2 Kontinuierliche Synthese von Cannabidiol

Der dazu verwendete Versuchsaufbau (Abb. 105) bestand aus zwei Drehkolbentaumelpumpen (Fa. Ismatec) und einer in der hauseigenen Schlosserei gefertigten Edelstahl-Reaktionszelle (id: 2,7 cm, Höhe: 3,6 cm) einschließlich Turbinenrührer. Die Verbindungsschläuche bestanden aus PTFE (id: 3 mm).

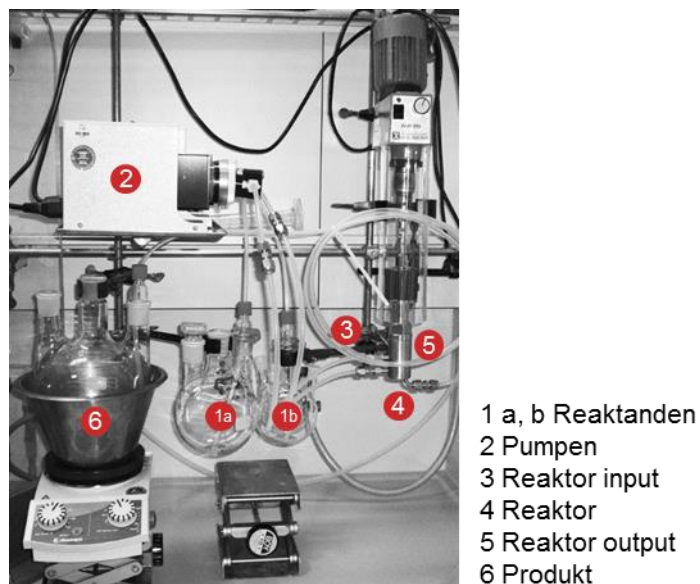


Abb. 105: Versuchsaufbau zur kontinuierlichen Synthese von Cannabidiolcarbonsäureestern

### 6.2.1 Schritt 1: Kupplung im kontinuierlichen Verfahren

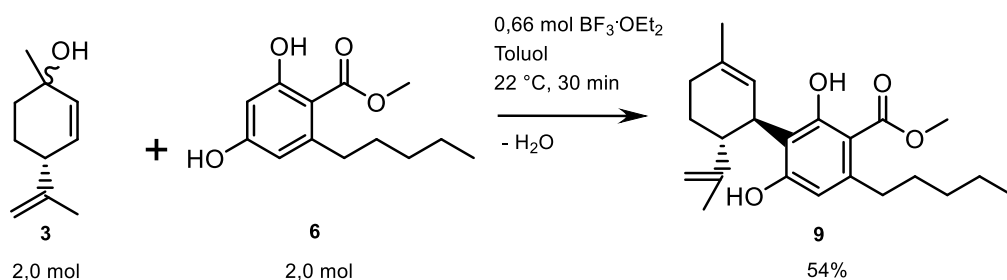


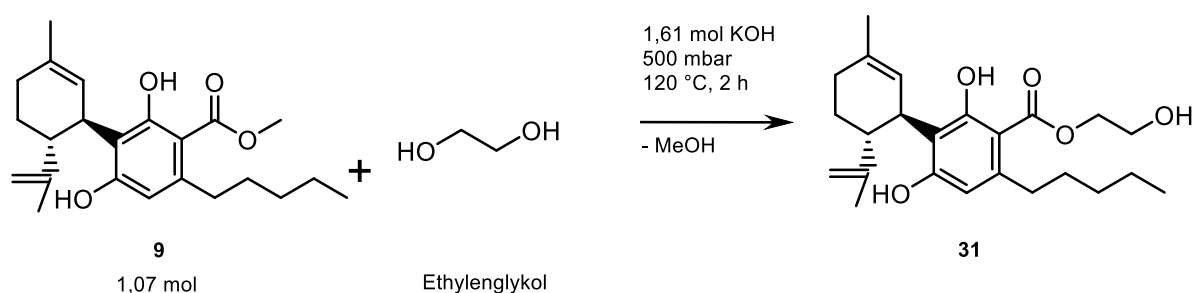
Abb. 106: Optimierte Synthese von (-)-trans-Cannabidiolcarbonsäuremethylester

300 g (2,0 mol) Menthadienol G (**3**) und 476 g (2,0 mol) OM (**6**) wurden bei 22 °C in 1600 g Toluol gelöst (2680 ml Lösung A). Ebenso wurden bei ca. 22 °C 94 g (0,66 mol) BF<sub>3</sub>-Etherat (Fa. Acros) in 600 g Toluol (Fa. Symrise) gelöst (800 ml Lösung B). Über zwei getrennte Dosierpumpen wurden dann Lösung A mit einer Flussrate von 89 ml/min und Lösung B mit einer Flussrate von 27 ml/min in eine gerührte (1100 U/min) Reaktorzelle gepumpt. Aus der Reaktorzelle lief das Reaktionsgemisch über einen 2,50 m langen PTFE-Schlauch in eine gerührte 1000 g NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (gesättigt, Fa. Symrise). Die Gesamtreaktionsdauer betrug ca. 20 min (Dosierung). Nach Ende der Dosierung wurde die hydrolysierte Reaktionslösung noch für ca. 10 min nachgerührt. Lange Reaktionszeiten wie bei Petrzilka et al.<sup>68</sup> oder starke Kühlung wie bei Crombie<sup>70</sup> et al. waren nicht notwendig.

Die hydrolysierte Reaktionslösung wurde in ein 5-Liter-Doppelmantel-Reaktionsgefäß übertragen und die wässrige Phase (ca. 1000 g) abgetrennt. Die organische Phase wurde viermal mit NaOH (1 %, aq) gewaschen. Von der organischen Phase wurde das Lösungsmittel zuerst bei 300–100 mbar, dann bei 100–10 mbar und 70 °C Badtemperatur abdestilliert. Es verblieben ca. 600 g Rohprodukt mit einem Gehalt von ca. 83 % Cannabidiolcarbonsäuremethylester (**9**) (GC). Es konnte eine Ausbeute von 54 % erzielt werden (Abb. 106).

Dieses erste Zwischenprodukt diente als Ausgangsverbindung für die anschließende Umesterung.

### 6.2.2 Schritt 2: Umesterung





Cannabidiolcarbonsäureester entspricht. Dieses Öl wurde in ca. 200 g n-Heptan innerhalb von 3 h auf  $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, wobei das CBD langsam auskristallisierte. CBD konnte in einer Menge von ca. 278 g mit einem Gehalt von  $> 99\%$  (GC) erhalten werden.

Die Kristallisation aus n-Heptan war nur dann erfolgreich, wenn der CBD-Gehalt bei  $\geq 80\%$  lag. In den Fällen, in denen dieser Gehalt unterschritten wurde, konnte durch Zusatz von zuvor erhaltenem Kristallisat – zur Aufkonzentrierung des DV-Destillats – eine Kristallisation erreicht werden.

In den Versuchen variierten die Ausbeuten nach DV-Destillation zwischen 76 und 87% und der Wertstoffgehalt zwischen 63 und 89% (vgl. Tabelle in Anhang 1). Die zuvor beschriebene Durchführung ist repräsentativ für die Gesamtheit der Versuche.

Auf diese Weise hergestelltes CBD hat eine spezifische Drehung von  $[\alpha]_D^{20} = -127^{\circ}$  in EtOH (96%) und korreliert damit sehr gut mit der Literaturangabe von  $[\alpha]_D^{25,9} = -129^{\circ 66}$ .

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,27$  (s, 1H); 6,17 (s, 1H); 5,97 (s, 1H); 5,57 (hept,  $J = 1,8, 1,2$  Hz, 1H); 4,66 (p,  $J = 2,2, 1,5$  Hz, 2H); 4,56 (dp,  $J = 2,2, 0,8$  Hz, 1H); 3,84 (ddt,  $J = 10,6, 4,5, 2,3$  Hz, 1H); 2,47–2,41 (m, 2H); 2,4 (td,  $J = 10,6, 3,7$  Hz, 1H); 2,31–2,17 (m, 1H); 2,09 (dp,  $J = 17,8, 2,5$  Hz, 1H); 1,88–1,81 (m, 1H); 1,81–1,78 (m, 3H); 1,81–1,72 (m, 1H); 1,65 (dd,  $J = 1,5, 0,8$  Hz, 3H); 1,60–1,51 (m, 2H); 1,37–1,22 (m, 4H); 0,88 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 156,0; 153,8; 149,4; 143,0; 140,0; 124,1; 113,8; 110,8; 109,7; 108,0; 46,2; 37,3; 35,5; 31,5; 30,6; 30,4; 28,4; 23,7; 22,5; 20,5; 14,0$

IR (ATR),  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 625, 658, 730, 748, 804, 826, 850, 861, 870, 883, 896, 961, 984, 1002, 1019, 1032, 1050, 1080, 1099, 1150, 1171, 1214, 1236, 1278, 1301, 1311, 1323, 1341, 1374, 1443, 1514, 1582, 1623, 1643, 2828, 2855, 2924, 2965, 3074, 3405, 3517

## 6.2.4 Röntgeneinkristallstrukturanalyse von CBD

**Tab. 32:** Struktur- und Ortsparameter der Röntgeneinkristallstrukturanalyse von CBD

Parameter	Wert
Identifikations-Nr.	10099
Summenformel	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$
Molekulargewicht	314,45 g/mol
Farbe	farblos
Temperatur	200 K

Wellenlänge	1,54178 Å
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>
Größe der Elementarzelle	a = 10,4804(4) Å, α = 90°, b = 10,8510(4) Å, β = 95,4478(13)° c = 16,8797(6) Å, γ = 90°
Volumen	1910,94(12) Å <sup>3</sup>
Z	4
Kristalldichte (berechnet)	1,093 mg · m <sup>-3</sup>
Absorptionskoeffizient	0,527 mm <sup>-1</sup>
F(000)	688 e
Maße des gemessenen Kristalls	0,213 mm × 0,159 mm × 0,094 mm
θ-Bereich der Datensammlung	2,629–67,638°
Index-Bereiche	-12 ≤ h ≤ 12, -11 ≤ k ≤ 12, -20 ≤ l ≤ 20
Anzahl der gesammelten Reflexe	88928
Unabhängige Reflexe	6370 [R <sub>int</sub> = 0,0534]
Verfeinerungsmethode	full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Daten / Einschränkungen / Parameter	6370 / 1 / 438
Güte der Anpassung an F <sup>2</sup>	1,052
R-Werte [I > 2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0,0501, wR <sup>2</sup> = 0,1344
R-Werte (alle Daten)	R <sub>1</sub> = 0,0552, wR <sup>2</sup> = 0,1406

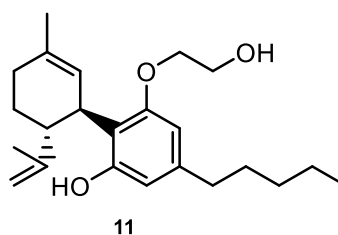
## 6.2.5 Verunreinigungsprofil

### 6.2.5.1 3-(2-Hydroxyethoxy)-2-[(1R,6R)-6-isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl]-5-pentyl-phenol (11)

Summenformel: C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>

M<sub>r</sub>: 358,5 g/mol

Ausbeute: > 0,6 mol (> 30%)



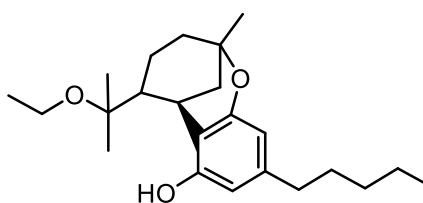
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6,33 (s, 1H); 6,23 (d, J = 1,5 Hz, 1H); 6,13 (s, 1H); 5,61–5,53 (s, 1H); 4,61 (t, J = 1,8 Hz, 1H); 4,47 (s, 1H); 4,05–3,94 (m, 3H); 3,90 (s, 2H); 2,51–2,46 (m, 2H); 2,45–2,36 (m, 1H); 2,25–2,15 (m, 1H); 2,07 (d, J = 17,8 Hz, 1H); 1,98 (s, J = 5,4 Hz, 1H); 1,85–1,78 (m, 2H); 1,80–1,77 (m, <3H); 1,62–1,60 (m, 3H); 1,60–1,55 (m, 2H); 1,31 (tt, J = 14,4, 7,9, 2,8 Hz, 4H); 0,88 (td, J = 7,1, 1,6 Hz, 3H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 156,7; 156,0; 148,5; 143,0; 140,0; 124,1; 115,2; 110,5; 110,1; 103,9; 69,4; 61,7; 45,8; 36,4; 36,0; 31,5; 30,8; 30,0; 27,7; 23,7; 22,6; 20,5; 14,1$

**6.2.5.2 5-(1-Ethoxy-1-methylethyl)-2-methyl-9-pentyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-2,6-methano-1-benzoxocin-7-ol (12)**

Summenformel:  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_3$

$M_r$ : 360,5 g/mol



12

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,31$  (s, 1H); 6,31 (d,  $J = 1,7$  Hz, 1H); 6,19 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H); 3,70–3,56 (m, 2H); 3,16 (d,  $J = 3,1$  Hz, 1H); 2,50–2,41 (m, 2H); 1,92 (dt,  $J = 14,9, 3,6$  Hz, 1H); 1,76–1,68 (m, 1H); 1,69–1,62 (m, 1H); 1,67–1,47 (m, 4H); 1,45 (s, 3H); 1,43–1,37 (m, 1H); 1,31 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H); 1,31–1,24 (m, 4H); 1,20 (s, 3H); 1,16 (s, 3H); 1,09–0,93 (m, 1H); 0,91–0,83 (m, 3H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 154,5; 152,6; 143,1; 113,6; 108,4; 107,7; 79,4; 73,2; 57,0; 52,4; 35,8; 34,4; 31,5; 30,8; 30,8; 29,0; 24,4; 23,6; 22,6; 19,0; 17,3; 15,5; 14,0$

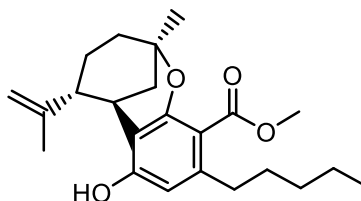
**6.2.5.3 Benzoxocin-10-carbonsäuremethylester, Methyl-(2R,5R,6R)-7-hydroxy-2-methyl-9-pentyl-5-(prop-1-en-2-yl)-3,4,5,6-tetrahydro-2H-2,6-methano-1-benzoxocin-10-carboxylat (13)**

Aus der Mutterlauge wurde mittels präp.-HPLC ein Gemisch aus zwei Substanzen isoliert. 10 g der Mischung wurden in einer Konzentration von ca. 200 mg/ml gelöst und 50  $\mu\text{g}$  15-mal auf einer polaren Säule (Fa. Phenomenex, Luna Silica, Metall-freie Silica-Partikel, 250 mm  $\times$  10 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Porengröße: 100 Å) getrennt. Als Gradient wurde eine Mischung aus n-Hexan ( $C_A$ ) und MTBE ( $C_B$ ) verwendet (Tab. 33). Fraktion 1 enthielt 4 mg und Fraktion 2 3,5 mg. Die Strukturaufklärung mittels MS und NMR-Spektroskopie ergab zwei neue tricyclische Derivate.

**Tab. 33:** Gradient für Verunreinigungen aus CBD-Mutterlauge

Zeit [min]	C <sub>A</sub> [%]	C <sub>B</sub> [%]
0,0–20,0	90,0	10,0
20,0–21,0	87,0	13,0
21,0–26,0 (Ende)	0,0	100,0

 Summenformel: C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>

 M<sub>r</sub>: 372,5 g/mol

**13**

Abweichend von der sonstigen MS-Methodik wurde die molekulare Masse der Substanz mittels high-resolution electrospray ionisation mass spectrometry (HR-ESI-MS, auf einer UHPLC Acquity mit Photodiode Array Detector (PDA), Fa. Waters, gekoppelt mit einem quadrupole time-of-flight mass spectrometer, micrOTOF-QII, Fa. Bruker) untersucht.

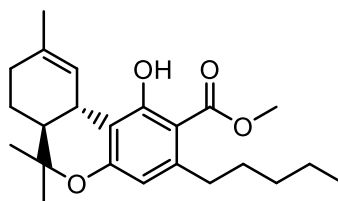
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, Benzen-d<sub>6</sub>): δ = 5,80 (s, 1H); 5,04 (s, 1H); 4,91 (h, J = 1,4 Hz, 1H); 4,83–4,81 (m, 1H); 3,68 (s, 3H); 3,60–3,56 (m, 1H); 2,71 (dt, J = 13,5, 7,6 Hz, 1H); 2,64 (dt, J = 13,6, 7,6 Hz, 1H); 2,47–2,41 (m, 1H); 1,79 (p, J = 0,7 Hz, 3H); 1,74–1,64 (m, 5H); 1,59–1,53 (m, 1H); 1,53–1,45 (m, 1H); 1,36–1,25 (m, 5H); 1,21 (s, 3H); 0,88 (t, J = 7,1 Hz, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, Benzen-d<sub>6</sub>): δ = 169,5; 155,8; 154,0; 146,0; 140,5; 115,0; 111,8; 111,1; 106,7; 75,4; 51,5; 43,3; 35,6; 34,1; 32,1; 31,5; 30,3; 29,3; 28,4; 22,9; 22,7; 21,3; 14,2

#### 6.2.5.4 Methyl-(6aS,10aS)-1-hydroxy-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-2-carboxylat (14)

Es kam dieselbe Analytik wie für **13** (siehe 6.2.5.3) zum Einsatz.

 Summenformel: C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>

 M<sub>r</sub>: 372,5 g/mol

**14**

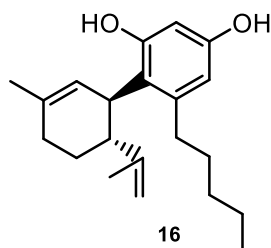
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, Benzen-d<sub>6</sub>): δ = 6,59 (h, J = 1,7 Hz, 1H); 5,76 (s, 1H); 4,87 (s, 1H); 3,68 (s, 3H); 3,22 (dt, J = 11,1, 2,7 Hz, 1H); 2,67 (ddd, J = 13,5, 8,6, 7,0 Hz, 1H); 2,59 (ddd, J = 13,6, 8,8, 6,9 Hz, 1H); 1,89–1,79 (m, 2H); 1,70–1,63 (m, 5H); 1,58 (ddd, J = 13,0, 11,1, 2,2 Hz, 1H); 1,45 (ddt, J = 12,5, 6,5, 2,2 Hz, 1H); 1,35–1,27 (m, 4H); 1,22 (s, 3H); 1,02–0,93 (m, 1H); 0,89 (s, 3H); 0,89–0,86 (m, 3H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz, Benzen- $d_6$ ):  $\delta = 169,3; 155,8; 153,2; 140,4; 133,2; 124,7; 117,4; 109,9; 108,1; 77,8; 51,4; 45,4; 34,2; 33,8; 32,0; 31,3; 31,3, 27,5; 25,0; 23,6; 22,9; 19,3; 14,2$

**6.2.5.5 4-[(1R,6R)-6-Isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl]-5-pentyl-benzen-1,3-diol (16)**

Summenformel:  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$

$M_r$ : 314,5 g/mol



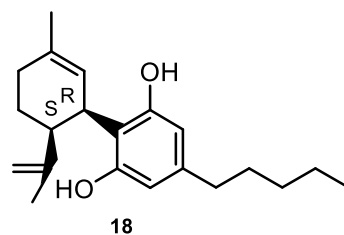
$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,21$  (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H);  $6,19$  (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H);  $6,04$  (s, 1H);  $5,52$  (m, 1H);  $4,65$  (t,  $J = 1,7$  Hz, 1H);  $4,53$  (m, 1H);  $4,46$  (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H);  $3,56$ – $3,49$  (m, 1H);  $2,59$  (ddd,  $J = 13,9, 9,2, 6,4$  Hz, 1H);  $2,47$  (ddd,  $J = 12,7, 9,9, 3,2$  Hz, 1H);  $2,30$ – $2,22$  (m, 1H);  $2,24$ – $2,19$  (m, 1H);  $2,13$ – $2,06$  (m, 1H);  $1,89$ – $1,74$  (m, 2H);  $1,79$ – $1,72$  (m, 3H);  $1,53$  (d,  $J = 0,9$  Hz, 3H);  $1,50$ – $1,44$  (m, 2H);  $1,39$ – $1,24$  (m, 4H);  $0,89$  (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 156,5; 154,5; 147,7; 144,0; 139,9; 124,7; 120,0; 111,5; 108,5; 102,1; 45,0; 40,0; 34,0; 31,9; 31,1; 30,3; 28,1; 23,7; 22,6; 21,3; 14,1$

**6.2.5.6 2-[(1R,6S)-6-Isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl]-5-pentyl-benzen-1,3-diol (18)**

Summenformel:  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$

$M_r$ : 314,5 g/mol



$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,25$  (s, 2H);  $5,81$  (dq,  $J = 5,0, 1,6$  Hz, 1H);  $4,81$ – $4,79$  (m, 2H);  $4,00$  (t,  $J = 6,2, 5,8$  Hz, 1H);  $2,69$  (ddd,  $J = 13,3, 6,2, 2,7$  Hz, 1H);  $2,44$  (td,  $J = 7,4, 1,7$  Hz, 2H);  $2,25$ – $2,21$  (m, 2H);  $2,00$  (tdd,  $J = 13,4, 10,4, 6,7$  Hz, 1H);  $1,84$ – $1,83$  (m, 3H);  $1,67$  (ddtd,  $J = 13,3, 5,5, 2,7, 1,0$  Hz, 1H);  $1,58$ – $1,53$  (m, 2H);  $1,44$  (t,  $J = 1,1$  Hz, 3H);  $1,34$ – $1,23$  (m, 4H);  $0,87$  (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H)

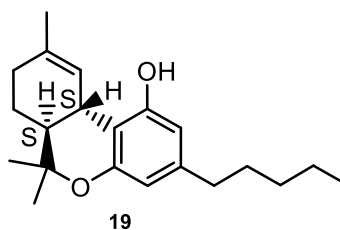
$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 157,5; 154,8; 151,3; 143,9; 140,6; 124,4; 112,3; 111,0; 110,4; 109,5; 47,0; 37,2; 35,4; 31,4; 31,0; 30,6; 24,0; 23,7; 22,5; 20,7; 14,0$



### 6.2.5.7 Dronabinol und (+)-trans- $\Delta^9$ -THC (19)

Summenformel:  $C_{21}H_{30}O_2$

$M_r$ : 314,5 g/mol



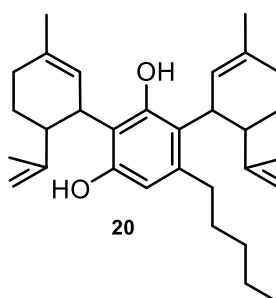
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6,30 (p,  $J$  = 1,7 Hz, 1H); 6,27 (d,  $J$  = 1,5 Hz, 1H); 6,14 (d,  $J$  = 1,6 Hz, 1H); 4,80 (s, 1H); 3,20 (dp,  $J$  = 10,6, 2,5 Hz, 1H); 2,43 (td,  $J$  = 7,6, 3,7 Hz, 2H); 2,18–2,14 (m, 2H); 1,94–1,89 (m, 1H); 1,69 (s, 1H); 1,69–1,66 (m, 3H); 1,58–1,52 (m, 2H); 1,41 (s, 3H); 1,40–1,37 (m, 1H); 1,34–1,24 (m, 4H); 1,09 (s, 3H); 0,88 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 154,8; 154,2; 142,8; 134,4; 123,7; 110,1; 109,0; 107,5; 77,2; 45,8; 35,5; 33,6; 31,5; 31,2; 30,7; 27,6; 25,0; 23,4; 22,6; 19,3; 14,0

### 6.2.5.8 2,4-Bis(6-isopropenyl-3-methyl-cyclohex-2-en-1-yl)-5-pentyl-benzen-1,3-diol (20)

Summenformel:  $C_{31}H_{44}O_2$

$M_r$ : 448,7 g/mol

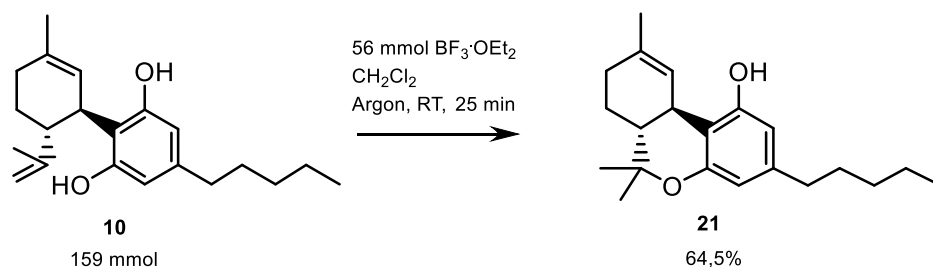


$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6,20 (s, 1H); 5,92 (s, 1H); 5,78 (s, 1H); 5,58 (s, 1H); 5,49 (s, 1H); 4,60 (p,  $J$  = 1,8 Hz, 1H); 4,52–4,44 (m, 2H); 4,44–4,42 (m, 1H); 4,01 (d,  $J$  = 9,8 Hz, 1H); 3,56–3,44 (m, 1H); 2,57–2,50 (m, 1H); 2,48–2,40 (m, 2H); 2,28–2,18 (m, 3H); 2,12–2,04 (m, 2H); 1,82 (m, 4H); 1,78 (m, 3H); 1,76 (m, 3H); 1,70 (s, 3H); 1,49 (m, 3H); 1,48–1,43 (m, 2H); 1,36–1,27 (m, 4H); 0,89 (t,  $J$  = 7,0 Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 154,0; 153,7; 147,9; 147,6; 141,2; 139,7; 139,1; 125,0; 124,8; 119,1; 115,3; 111,4; 111,3; 109,4; 46,6; 44,3; 40,5; 35,7; 33,9; 32,0; 31,2; 30,5; 30,4; 28,5; 28,4; 23,7; 23,7; 22,6; 21,5; 18,9; 14,1

## 6.3 Synthese und Reinigung von Dronabinol

### 6.3.1 Synthese von Dronabinol



**Abb. 109:** Optimierte Synthese von Dronabinol

Als Versuchsaufbau wurde ein Dreihalskolben mit Rührer, Innenthermometer und Dosiertrichter verwendet. Die Reaktion wurde unter Schutzgas (Argon) bei Raumtemperatur durchgeführt. 50 g (159 mmol) CBD (**10**) wurden in 400 g Dichlormethan vorgelegt. 56 mmol  $\text{BF}_3$ -Etherat wurde in 33 g Dichlormethan gelöst und über 5 min zugetropft. Nach 25 min wurde der gesamte Ansatz mit 330 g Eiswasser versetzt und für 10 min lang nachgerührt. Die organische Phase wurde zweimal mit 330 g gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen. Lag der pH-Wert der wässrigen Phase anschließend noch unter 7, wurde ein weiterer Waschschritt vorgenommen. Die organische Phase wurde im Vakuum abdestilliert und mittels SMB-Chromatographie weiter gereinigt.

Bei optimierten Reaktionsparametern lag die Selektivität der Reaktion bei 70%. Es ergab sich eine Ausbeute an Dronabinol (**21**) von 64,5%. Nach der Synthese waren vier Verunreinigungen detektierbar, und zwar Olivetol (**17**), CBD (**10**), Exo-THC (**23**) und  $\Delta^8$ -THC (**22**).

Auf diese Weise hergestelltes Dronabinol zeigt einen spezifischen Drehwert von  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -202^\circ$  in EtOH (96%), der annähernd dem Literaturwert von ca.  $-200^\circ$ <sup>54</sup> entspricht.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,30$  (p,  $J = 1,7$  Hz, 1H); 6,27 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H); 6,14 (d,  $J = 1,7$  Hz, 1H); 4,81 (s, 1H); 3,20 (dp,  $J = 10,6, 2,5$  Hz, 1H); 2,43 (td,  $J = 7,4, 1,4$  Hz, 2H); 2,16 (dddd,  $J = 8,2, 3,9, 1,9, 1,0$  Hz, 2H); 1,91 (dtt,  $J = 12,5, 4,3, 2,3$  Hz, 1H); 1,68 (d,  $J = 1,0$  Hz, 3H); 1,68 (ddd,  $J = 12,7, 11,1, 2,2$  Hz, 1H); 1,60–1,50 (m, 2H); 1,46–1,35 (m, 1H); 1,41 (s, 3H); 1,35–1,23 (m, 4H); 1,09 (s, 3H); 0,92–0,83 (m, 3H)

---

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 154,8; 154,2; 142,8; 134,4; 123,8; 110,1; 109,1; 107,6; 45,8; 35,5; 33,6; 31,6; 31,2; 30,7; 27,6; 25,0; 23,4; 22,6; 19,3; 14,0$

### 6.3.2 Reinigung von Dronabinol

Alle hier beschriebenen Arbeitsschritte wurden aufgrund des luftlabilen Dronabinols unter Schutzgasatmosphäre (Argon) durchgeführt. Die Säulenkonfiguration der SMB-Anlage C9116 (Fa. Knauer) entsprach der 2-2-2-2-Anordnung in Abb. 53. Die Schaltzeit des Ventils betrug 10,81 s, die Temperatur des chromatographischen Systems 30 °C.

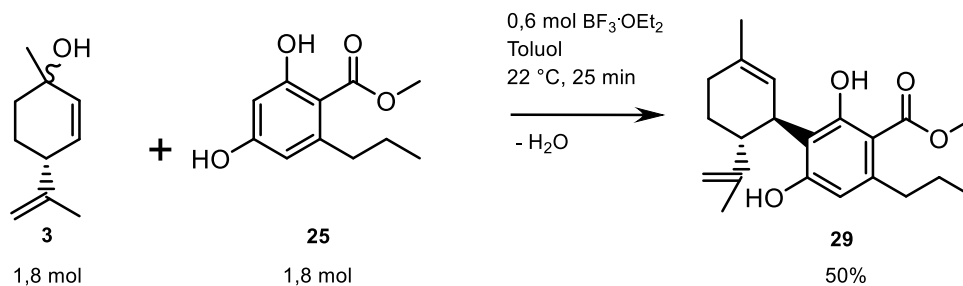
Die „feed“-Lösung beinhaltete das oben beschriebene Rohprodukt gelöst im Eluentengemisch mit einer Konzentration von 12,5 g/l. Die Eluent-, die Extrakt- und die Raffinatpumpe leisteten jeweils eine maximale Flussrate von 50 ml/min, die „feed“-Pumpe leistete eine maximale Flussrate von 10 ml/min. Im hier beschriebenen Prozess wurden folgende Flussraten verwendet: Eluentpumpe (Zone 1): 4,4 ml/min, Extraktpumpe (Zone 2): 3,2 ml/min, Raffinatpumpe (Zone 4): 1,3 ml/min, „feed“-Pumpe (Zone 3): 0,2 ml/min.

Die Versorgung der Anlage mit Eluent- und „feed“-Lösung erfolgte aus geeigneten Vorratsgebinden, die brandschutztechnisch gesichert waren. Die Eluent- und die „feed“-Lösung wurden periodisch mit Argon überschichtet, um Luftsauerstoff auszuschließen. Vor Eintritt in das System wurden sie durch einen Entgaser gepumpt. Inprozesskontrollen wurden einmal pro Tag durchgeführt.

## 6.4 Synthese von Cannabidivarin

Der verwendete Versuchsaufbau entsprach dem in 6.2 beschriebenen.

### 6.4.1.1 Schritt 1: Kupplung im kontinuierlichen Verfahren



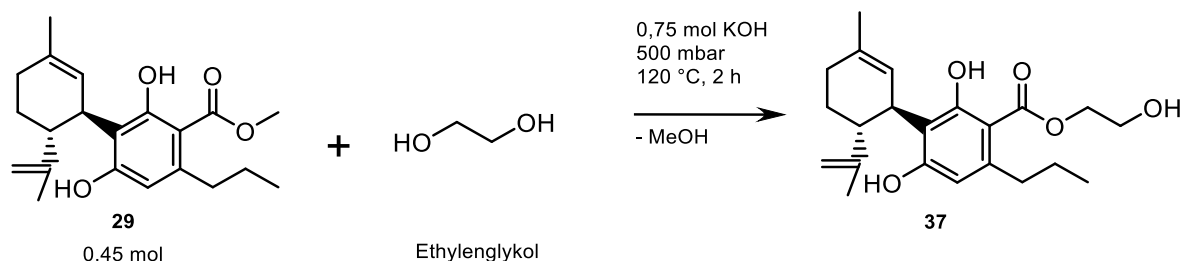
**Abb. 110:** Optimierte Synthese von (-)-trans-Cannabidivarin-carbonsäuremethylester

273 g (1,8 mol) Menthadienol G (**3**) und 377 g (1,8 mol) DM (**25**) wurden bei 22 °C in 1450 g Toluol gelöst (2300 ml Lösung A). Ebenso wurden 85 g (0,6 mol) BF<sub>3</sub>-Etherat (Fa. Acros) in 540 g Toluol gelöst (710 ml Lösung B). Über zwei getrennte Dosierpumpen wurden dann Lösung A mit einem Fluss von 93 ml/min und Lösung B mit einem Fluss von 29 ml/min in eine mit 1100 U/min gerührte Reaktorzelle gepumpt. Aus der Reaktorzelle lief das Reaktionsgemisch über einen 2,5 m langen PTFE-Schlauch in eine gerührte 1000 g gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Die Gesamtreaktionsdauer betrug ca. 25 min. Nach Ende der Dosierung wurde die hydrolysierte Reaktionslösung noch für ca. 1 h nachgerührt.

Die hydrolysierte Reaktionslösung wurde in ein 5-Liter-Doppelmantel-Reaktionsgefäß übertragen und die wässrige Phase (ca. 1000 g) abgetrennt. Die organische Phase wurde siebenmal mit NaOH (1 %, aq) gewaschen. In der organischen Phase befanden sich ca. 320 g Cannabidivarin-carbonsäuremethylester (**29**), was einer Ausbeute von ca. 50 % entspricht. Zu der toluolischen Phase wurden 800 g Wasser gegeben und mit 7 g Schwefelsäure (10 %, aq) auf pH 6–6,5 eingestellt. Danach wurden 1900 g Toluol abdestilliert. Schon in Vorversuchen hatte sich bei niedrigen Temperaturen eine Tendenz zur Kristallisation gezeigt. Nach Abkühlen auf 10 °C wurde mit Cannabidivarin-carbonsäuremethylester-Kristallisat angeimpft. Nach Absaugen und Trocken (3 mbar, 50 °C) konnten 220 g Cannabidivarin-carbonsäuremethylester (35 %) in einer Reinheit von 96,9 % (GC) gewonnen werden. Durch Rekristallisation konnte die Reinheit auf 99,7 % (GC) erhöht werden. Der auf diese Weise hergestellte Cannabidivarin-carbonsäuremethylester hat eine spezifische Drehung

von  $[\alpha]_D^{20} = -148^\circ$  in EtOH (96%). Dieses erste Zwischenprodukt diente als Ausgangsverbindung für die anschließende Umesterung.

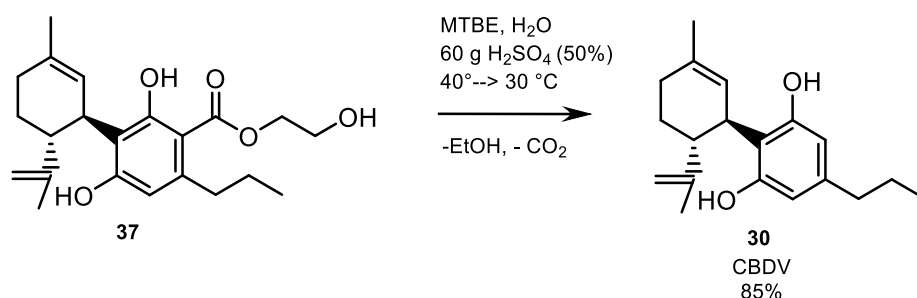
### 6.4.1.2 Schritt 2: Umesterung



**Abb. 111:** Umesterung zu 2-Hydroxyethylcannabidivarinolat

1210 g einer Toluol-Lösung von 155 g (0,45 mol) Cannabidivarin-carbonsäuremethylester (**29**) aus Schritt 1 wurden vorgelegt und 900 g Toluol im Vakuum (500 mbar) bei 120 °C abdestilliert. Zum verbliebenen Rückstand wurden unter Rühren 220 g (3,55 mol) Ethylenglykol gegeben und mit einer Lösung von 42 g (0,75 mol) KOH in 140 g (2,26 mol) Ethylenglykol versetzt. Das resultierende Produktgemisch umfasste hauptsächlich 2-HECBDV (**37**).

### 6.4.1.3 Schritt 3: Verseifung und Decarboxylierung



**Abb. 112:** Verseifung und Decarboxylierung zu CBDV

An den Dreihalskolben mit **37** wurde ein Vakuum von 500 mbar angelegt. Es wurde auf 150 °C für 2 h erhitzt, um ca. 25 g eines Gemisches aus Toluol und Methanol abdestillieren. Danach wurde auf 40 °C abgekühlt und mit 800 g Wasser sowie mit 400 g MTBE versetzt. Zur Neutralisation wurden 60 g halbkonzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben. Der Ansatz schäumte durch die Decarboxylierung stark auf. Er wurde noch für 15 min nachgerührt und

dann auf 30 °C abgekühlt. Nach Phasentrennung wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mittels eines Dünnschichtverdampfers im Vakuum (1 mbar) und bei einer Manteltemperatur von 230 °C destilliert. Es konnten ca. 135 g Rohprodukt in Form eines viskosen, gelblichen Öls mit einer Reinheit von ca. 81 % (GC) an CBDV (**30**) erhalten werden, was einer Ausbeute von 85 % bezogen auf den eingesetzten Cannabidivarin-carbonsäureester entspricht. Dieses Öl wurde dann bei ca. 60–70 °C in 135 g n-Heptan unter Rühren gelöst und über 45 min auf 50 °C abgekühlt, wobei die Kristallisation eintrat. Es wurde bis auf Raumtemperatur abgekühlt und mit kaltem n-Heptan abermals gewaschen und abgesaugt. Nach 1 h Trocknung bei 50 °C und 10 mbar lagen 66 g CBDV in einer Reinheit von 99 % (GC) als weißes Kristallisat vor. Die Ausbeute bezogen auf die gesamte Synthese betrug 30 %.

Auf diese Weise hergestelltes CBDV hat eine spezifische Drehung von  $[\alpha]_D^{25,0} = -134^\circ$  in EtOH (96%).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 6,28$  (s, 1H); 6,16 (s, 1H); 5,99 (s, 1H); 5,57 (dp, J = 2,4, 1,3 Hz, 1H); 4,72 (d, J = 11,5 Hz, 1H); 4,66 (dq, J = 2,2, 1,5 Hz, 1H); 4,55 (dp, J = 2,2, 0,7 Hz, 1H); 3,85 (dtq, J = 10,3, 4,1, 2,3 Hz, 1H); 2,44–2,34 (m, 2H); 2,4 (td, J = 11,9, 10,2, 3,3 Hz, 1H); 2,23 (dddqt, J = 17,8, 11,6, 5,9, 3,5, 2,4, 1,2 Hz, 1H); 2,09 (ddt, J = 17,8, 5,2, 2,5 Hz, 1H); 1,83 (ddt, J = 12,9, 5,9, 3,3, 2,6 Hz, 1H); 1,81–1,77 (m, 3H); 1,78 (qd, J = 13,1, 11,6, 5,2 Hz, 1H); 1,67–1,64 (m, 3H); 1,58 (h, J = 7,4 Hz, 2H); 0,9 (t, J = 7,3 Hz, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 156,1$ ; 153,9; 149,4; 142,8; 140,1; 124,1; 113,8; 110,9; 109,8; 108,0; 46,2; 37,6; 37,2; 30,4; 28,4; 24,0; 23,7; 20,5; 13,8

IR (ATR),  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 618, 655, 749, 782, 805, 824, 860, 891, 972, 1005, 1025, 1048, 1087, 1148, 1217, 1240, 1290, 1311, 1346, 1376, 1435, 1520, 1585, 1628, 2867, 2930, 2955, 3365

#### 6.4.2 Röntgeneinkristallstrukturanalyse von CBDV

**Tab. 34:** Struktur- und Ortsparameter der Röntgeneinkristallstrukturanalyse von CBDV

Parameter	Wert
Identifikations-Nr.	10086sadabs
Summenformel	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	286,40 g/mol
Farbe	hellgelb
Temperatur	200 K

Wellenlänge	1,54178 Å
Kristallsystem	orthorhombisch
Raumgruppe	P 21 21 21, (no. 19)
Größe der Elementarzelle	a = 9,5225(13) Å, $\alpha = 90^\circ$ b = 12,3446(17) Å, $\beta = 90^\circ$ c = 14,3366(19) Å, $\gamma = 90^\circ$
Volumen	1685,3(4) Å <sup>3</sup>
Z	4
Kristalldichte (berechnet)	1,129 mg · m <sup>-3</sup>
Absorptionskoeffizient	0,554 mm <sup>-1</sup>
F(000)	624 e
Maße des gemessenen Kristalls	0,235 mm × 0,220 mm × 0,125 mm
$\theta$ -Bereich der Datensammlung	4,727–68,003°
Index-Bereiche	$-11 \leq h \leq 11$ , $-14 \leq k \leq 14$ , $-17 \leq l \leq 16$
Anzahl der gesammelten Reflexe	45 728
Unabhängige Reflexe	3053 [ $R_{\text{int}} = 0,0891$ ]
Verfeinerungsmethode	full-matrix least-squares on $F^2$
Daten / Einschränkungen / Parameter	3053 / 0 / 196
Güte der Anpassung an $F^2$	0,998
R-Werte [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0,0562$ , $wR^2 = 0,1418$
R-Werte (alle Daten)	$R_1 = 0,0648$ , $wR^2 = 0,1484$

### 6.4.3 Isolierung von CBDV aus der Mutterlauge

510 g der Mutterlauge aus 6.2.3 wurden bei 50 °C und 200 mbar auf 49,4 g eingengt. Die konzentrierte Mutterlauge wurde in 1650 ml MeOH (85%) aufgenommen und mit derselben Menge Cyclohexan extrahiert. Die extrahierte methanolische Lösung wurde als „feed“-Lösung verwendet und mittels SMB mit einem Gemisch aus MeOH und Wasser (Verhältnis 85:15) als Eluenten getrennt. Die „feed“-Lösung beinhaltete das oben beschriebene Rohprodukt gelöst im Eluentengemisch mit einer Konzentration von 12,5 g/l. Es wurden folgende Flussraten verwendet: Eluentpumpe (Zone 1): 2,9 ml/min, Extraktpumpe (Zone 2): 3,5 ml/min, Raffinatpumpe (Zone 4): 3,13 ml/min, „feed“-Pumpe (Zone 3): 0,2 ml/min.

3095 g des Raffinats wurden bei einer Temperatur von 50 °C und einem Druck von 200 mbar auf 20% des Ausgangsvolumens aufkonzentriert. Durch Zugabe von NaOH (50%) wurde die Konzentration auf 0,1% NaOH eingestellt. Nachfolgend wurde dreimal mit n-Heptan im Verhältnis 2:1 gewaschen. Aus n-Heptan konnte, wie in 6.2.3 beschrieben, 99%iges CBDV kristallisiert werden.

## 6.5 Synthesen neuer Cannabinoide

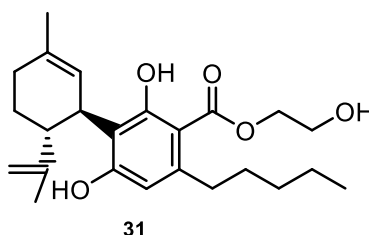
### 6.5.1 2-Hydroxyethylcannabidiolat (2-HEC, 31)

IUPAC: 2-Hydroxyethyl-(1'R,2'R)-2,6-dihydroxy-5'-methyl-4-pentyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat

Summenformel: C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>

M<sub>r</sub>: 402,2 g/mol

MS (ESI): m/z = 401,2 [M-H]<sup>-</sup>



logP = 5,21 (berechnet nach Ghose und Crippen<sup>112</sup>)

125 g (0,34 mol) Methylcannabidiolat (Synthese wie in 6.2.1 beschrieben) wurden in 150 g Ethylenglykol gelöst. Die Lösung wurde auf 80 °C temperiert. Unter Rühren wurde eine Lösung von 19 g (0,34 mol) KOH in 75 g Ethylenglykol hinzugefügt. Die Lösung wurde bei 120 °C für 2 h gerührt. Bei 400–500 mbar und 60 °C wurden ca. 13 g leicht siedende Verbindungen abdestilliert. Danach wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, je 200 g n-Heptan und Eiswasser unter Rühren hinzugefügt und das Gemisch mit Schwefelsäure (10%, aq) auf pH 6 eingestellt. Nach Phasentrennung wurde die organische Phase im Vakuum eingeeengt (111 g) und mittels Kieselgel chromatographisch gereinigt. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus n-Heptan und MTBE (Verhältnis 95 : 5) verwendet.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 11,88 (s, 1H); 6,54 (s, 1H); 6,22 (s, 1H); 5,54 (s, 1H); 4,52 (dq, J = 2,9, 1,5 Hz, 1H); 4,48–4,44 (m, 2H); 4,39 (s, 1H); 4,09 (d, J = 9,8 Hz, 1H); 3,95 (q, J = 5,1, 4,4 Hz, 2H); 2,93–2,83 (m, 1H); 2,78 (ddd, J = 13,1, 8,7, 6,9 Hz, 1H); 2,39 (q, J = 7,3 Hz, 1H); 2,29–2,15 (m, 1H); 2,15–2,04 (m, 1H); 1,84–1,76 (m, 2H); 1,79 (s, 3H); 1,71 (s, 3H); 1,60–1,50 (m, 2H); 1,36–1,28 (m, 4H); 0,89 (t, J = 7,0 Hz, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172,3; 163,2; 160,1; 147,2; 145,8; 140,2; 124,0; 114,5; 111,6; 111,2; 103,7; 66,7; 61,1; 46,6; 36,9; 35,4; 32,0; 31,5; 30,2; 27,8; 23,7; 22,6; 18,8; 14,1

### 6.5.2 2-Hydroxypentylcannabidiolat (2-HPC, 32)

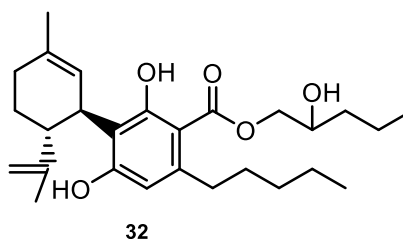
IUPAC: 2-Hydroxypentyl(1'R,2'R)-2,6-dihydroxy-5'-methyl-4-pentyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat



Summenformel: C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>

M<sub>r</sub>: 444,3 g/mol

MS (ESI): m/z = 443,3 [M-H]<sup>-</sup>



logP = 6,43 (berechnet nach Ghose und Crippen<sup>112</sup>)

2-HPC wurde ähnlich wie 2-HEC (siehe 6.5.1) hergestellt. Anstelle von Ethylenglykol wurden 78 g 1,2-Pentandiol (Hydrolite 5<sup>®</sup>, Fa. Symrise), 25 g (0,44 mol) KOH sowie 144 g (0,3 mol) Methylcannabidiolat in 182 g 1,2-Pentandiol verwendet. Die Reinigung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

<sup>1</sup>H-NMR (400-MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 11,61 (s, 1H), 9,89 (s, 1H), 6,21 (s, 1H); 5,11–5,06 (m, 1H); 4,88 (d, J = 5,4 Hz, 1H); 4,47 (d, J = 2,9 Hz, 1H); 4,43 (dt, J = 2,9, 1,5 Hz, 1H); 4,22–4,10 (m, 2H); 3,91 (d, J = 10,5 Hz, 1H); 3,81–3,72 (m, 1H); 3,03 (td, J = 12,1, 10,5, 3,2 Hz, 1H); 2,83–2,67 (m, 2H); 2,20–2,03 (m, 1H); 1,99–1,89 (m, 1H); 1,76–1,63 (m, 2H); 1,61 (s, 3H); 1,61–1,58 (m, 3H); 1,53–1,34 (m, 6H); 1,33–1,22 (m, 4H); 0,89 (t, J = 7 Hz, 3H), 0,86 (t, J = 6,7 Hz, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 171,3; 162,1; 160,4; 148,6; 144,1; 130,7; 125,6; 114,8; 110,2; 109,9; 103,5; 69,0; 67,3; 43,3; 35,7; 35,6; 35,5; 31,4; 31,0; 30,2; 29,2; 23,1; 22,0; 18,9; 18,1; 13,9

IR (ATR),  $\tilde{\nu}$  [1 cm<sup>-1</sup>]: 762, 823, 887, 1004, 1024, 1049, 1110, 1167, 1277, 1308, 1376, 1423, 1638, 2007, 2873, 2930, 2957, 3282, 3400

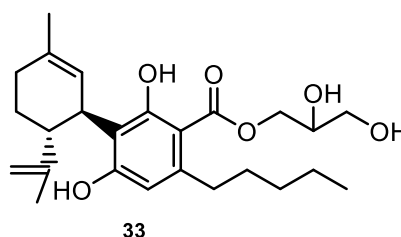
### 6.5.3 Glycerlcannabidiolat (GCBD, 33)

IUPAC: 2,3-Dihydroxypropyl(1'R,2'R)-2,6-dihydroxy-5'-methyl-4-pentyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat

Summenformel: C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>

M<sub>r</sub>: 432,3 g/mol

MS (ESI): m/z = 431,2 [M-H]<sup>-</sup>



$\log P = 4,68$  (berechnet nach Ghose und Crippen<sup>112</sup>)

GCBD wurde ähnlich wie 2-HEC (siehe 6.5.1) hergestellt. Anstelle von Ethylenglykol wurden 78 g Glycerol und 25 g (0,44 mol) KOH sowie 144 g (0,3 mol) Methylcannabidiolat verwendet. Die Reinigung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta = 6,20$  (s, 2H); 5,09 (s, 2H); 4,48 (d,  $J = 2,8$  Hz, 2H); 4,42 (p,  $J = 2,8, 1,4$  Hz, 2H); 4,30 (dd,  $J = 11,1, 3,9$  Hz, 1H); 4,30 (dd,  $J = 11,1, 4,0$  Hz, 1H); 4,18 (dd,  $J = 11,1, 3,9$  Hz, 1H); 4,16 (dd,  $J = 11,1, 3,9$  Hz, 1H); 3,93 (dd,  $J = 10,8, 4,0$  Hz, 2H); 3,81–3,75 (m, 2H); 3,49–3,34 (m, 4H); 3,14–3,00 (m, 2H); 2,82–2,59 (m, 4H); 2,19–2,02 (m, 2H); 1,99–1,88 (m, 2H); 1,78–1,58 (m, 4H); 1,61 (s, 6H); 1,60 (s, 6H); 1,51–1,39 (m, 4H); 1,33–1,20 (m, 8H); 0,93–0,77 (m, 6H)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 171,4; 162,2; 162,2; 148,8; 144,0; 130,4; 126,1; 114,7; 110,9; 109,7; 102,3; 69,2; 66,5; 62,8; 43,4; 35,8; 35,4; 31,3; 31,0; 30,2; 29,3; 23,2; 22,0; 19,0; 13,9$

IR (ATR),  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 761, 823, 889, 1004, 1024, 1050, 1110, 1168, 1279, 1309, 1376, 1422, 1611, 1639, 2127, 2254, 2926, 3411

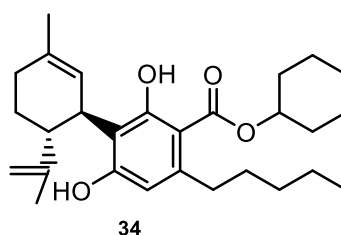
#### 6.5.4 Cyclohexylcannabidiolat (CHC, 34)

IUPAC: Cyclohexyl(1'R,2'R)-2,6-dihydroxy-5'-methyl-4-pentyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat

Summenformel: C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>

M<sub>r</sub>: 440,3 g/mol

MS (ESI):  $m/z = 439,3$  [M-H]<sup>-</sup>



$\log P = 7,28$  (berechnet nach Ghose und Crippen<sup>112</sup>)

2,5 g (16 mmol) Menthadienol G (**3**) und 5 g (16 mmol) Olivetolcyclohexylester (**40**) wurden in 20 g Toluol gelöst. Die Lösung wurde gekühlt und unter Rühren wurde über 2 min 1 g (7 mmol) BF<sub>3</sub>-Etherat hinzugegeben. Die Temperatur wurde dabei zwischen 20 und 25 °C gehalten. Nach weiterem Rühren für 2 min wurde die Lösung in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> hydrolysiert. Nach Phasentrennung wurde die organische Phase mit

100 g Toluol verdünnt und der nicht umgesetzte Olivetolcyclohexylester durch fünffache Extraktion mit je 50 g NaOH (1%, aq) extrahiert. Die organische Phase wurde neutral gewaschen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels verblieb ein Rückstand von 6 g. Dieser wurde mittels Kieselgel mit einem Gemisch aus n-Heptan und Ethylacetat (Verhältnis 50:1) gereinigt. Es konnten 3 g CHC isoliert werden, was einer Ausbeute von 43 % entspricht.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 12,22 (s, 1H); 6,47 (s, 1H); 6,20 (s, 1H); 5,55 (s, 1H); 5,04 (tt,  $J$  = 9,5, 4,0 Hz, 1H); 4,53 (dd,  $J$  = 2,4, 1,4 Hz, 1H); 4,41–4,39 (m, 1H); 4,11–4,07 (m, 1H); 2,88 (ddd,  $J$  = 13,0, 9,3, 6,3 Hz, 1H); 2,78 (ddd,  $J$  = 13,0, 9,3, 6,4 Hz, 1H); 2,39 (q,  $J$  = 8,1 Hz, 1H); 2,27–2,15 (m, 1H), 2,13–2,05 (m, 1H); 2,05–1,98 (m, 2H); 1,84–1,77 (m, 4H); 1,80–1,77 (m, 3H); 1,71 (t,  $J$  = 1,0 Hz, 3H); 1,65–1,55 (m, 1H); 1,61–1,48 (m, 4H); 1,48–1,37 (m, 2H); 1,35–1,26 (m, 4H); 1,32–1,22 (m, 1H); 0,89 (t,  $J$  = 7,0 Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 171,8; 163,2; 159,7; 147,3; 145,9; 140,1; 124,1; 114,4; 111,3; 111,2; 104,4; 74,2; 46,6; 36,9; 35,4; 32,0; 31,8; 31,8; 31,6; 30,2; 27,8; 25,4; 24,1; 24,1; 23,7; 22,8; 18,9; 14,1

IR (ATR),  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 729, 812, 849, 887, 979, 1014, 1039, 1074, 1108, 1147, 1165, 1270, 1308, 1376, 1395, 1425, 1458, 1507, 1577, 1619, 1643, 2211, 2859, 2930, 2957, 3421

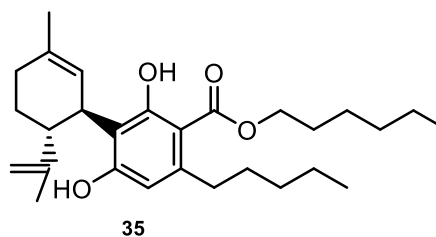
### 6.5.5 Hexylcannabidiolat (HC, 35)

IUPAC: Hexyl-(1'R,2'R)-2,6-dihydroxy-5'-methyl-4-pentyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat

Summenformel:  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_4$

$M_r$ : 442,3 g/mol

MS (ESI):  $m/z$  = 441,3  $[\text{M-H}]^-$



$\log P$  = 7,81 (berechnet nach Ghose und Crippen<sup>112</sup>)

HC wurde ähnlich wie CHC (siehe 6.5.16.5.4) hergestellt. Anstelle von Olivetolcyclohexylester wurden 5 g (16 mmol) Olivetol-n-hexylester (**41**) verwendet. Es konnten 4 g HC isoliert werden, was einer Ausbeute von 56% entspricht.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 12,13$  (s, 1H); 6,48 (s, 1H); 6,21 (s, 1H); 5,55 (s, 1H); 4,52 (dd,  $J = 2,4, 1,4$  Hz, 1H); 4,41–4,38 (m, 1H); 4,36–4,24 (m, 2H); 4,12–4,05 (m, 1H); 2,87 (ddd,  $J = 13,1, 9,2, 6,5$  Hz, 1H); 2,76 (ddd,  $J = 13,0, 9,0, 6,6$  Hz, 1H); 2,45–2,33 (m, 1H); 2,28–2,16 (m, 1H); 2,09 (dq,  $J = 17,7, 3,6$  Hz, 1H); 1,80–1,77 (m, 3H); 1,77–1,72 (m, 4H); 1,71 (s, 3H); 1,59–1,48 (m, 2H); 1,48–1,38 (m, 2H); 1,38–1,27 (m, 8H); 0,91 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H); 0,89 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 172,4; 163,2; 159,8; 147,3; 145,9; 140,2; 124,1; 114,4; 111,4; 111,2; 104,1; 65,5; 46,7; 36,8; 35,4; 32,1; 31,5; 31,5; 30,2; 28,6; 27,8; 25,9; 23,7; 22,71; 22,5; 18,9; 14,1; 14,1$

IR (ATR),  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 729, 812, 849, 887, 979, 1014, 1039, 1074, 1108, 1147, 1165, 1270, 1308, 1376, 1395, 1425, 1458, 1507, 1577, 1619, 1643, 2211, 2859, 2930, 2957, 3421

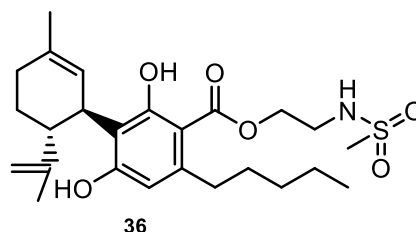
### 6.5.6 N-Methylsulfonylcannabidiolat (NMSC, 36)

IUPAC: 2-(Methylsulfonylamino)ethyl(1'R,2'R)-2,6-dihydroxy-5'-methyl-4-pentyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat

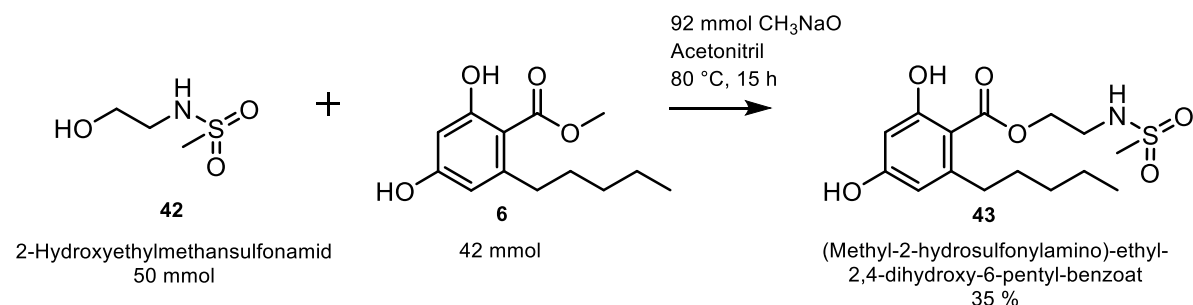
Summenformel:  $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{NO}_6\text{S}$

$M_r$ : 479,2 g/mol

MS (ESI):  $m/z = 478,2$   $[\text{M-H}]^-$



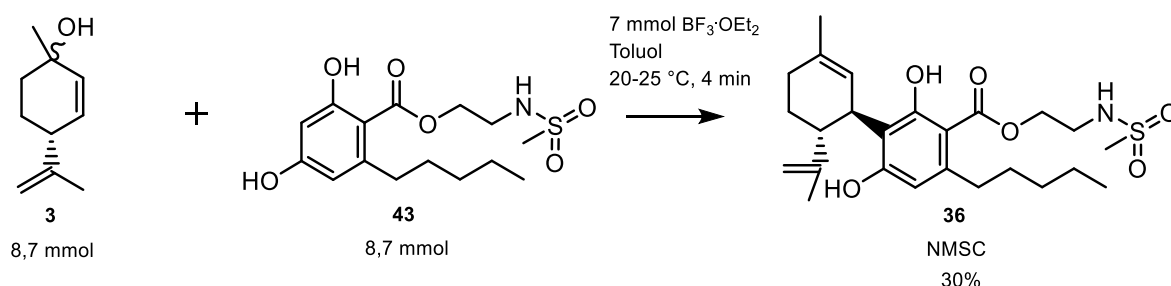
$\log P = 3,84$  (berechnet nach Broto et al.<sup>113</sup>)



**Abb. 113:** Synthese von (Methyl-2-hydrosulfonylamino)-ethyl-2,4-dihydroxy-6-pentyl-benzoat

2-Hydroxyethylmethansulfonamid (**42**) wurde nach Kim et al. hergestellt.<sup>133</sup> 5 g (92 mmol) Natriummethanolat wurde zu einer Lösung von 10 g (42 mmol) OM (**6**) und 7 g (50 mmol)

(42) in 70 g Acetonitril gegeben. Die Mischung wurde bei 80 °C für 15 h gerührt, wobei sich der Großteil des Lösungsmittels verflüchtigte. Unter kontinuierlichem Rühren wurden 100 g MTBE und 50 g Eiswasser zugegeben. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von Schwefelsäure (10%, aq) neutralisiert. Nach Phasentrennung wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde mittels Kieselgel und MTBE als mobiler Phase gereinigt. Es konnten 5 g des Produktes (43) isoliert werden, was einer Ausbeute von 35% entspricht.



**Abb. 114:** Synthese von NMSC

3 g (8,7 mmol) **43** und 1,4 g (8,7 mmol) Menthadienol G wurden in Toluol unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre vorgelegt. 0,55 g (3,8 mmol)  $\text{BF}_3$ -Etherat wurden über 2 min zugetropft. Die Temperatur wurde durch Kühlung bei 22–26 °C gehalten. Es wurde für 1 min nachgerührt und in 50 g gesättigte  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung überführt. Nach Phasentrennung wurde die organische Phase einmal mit Wasser gewaschen (pH 6). Das Produkt wurde mittels Kieselgel und Cyclohexan als mobiler Phase gereinigt. Die Ausbeute betrug ca. 30%.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 11,76 (s, 1H); 6,57 (s, 1H); 6,23 (s, 1H); 5,55 (s, 1H); 4,63 (s, 1H); 4,52 (dq,  $J$  = 2,9, 1,5 Hz, 1H); 4,49 (t,  $J$  = 5,4 Hz, 2H); 4,38 (d,  $J$  = 2,2 Hz, 1H); 4,09 (s, 1H); 3,54 (td,  $J$  = 6,0, 5,0 Hz, 2H); 2,98 (s, 3H); 2,84 (dt,  $J$  = 13,3, 7,6 Hz, 1H); 2,79–2,70 (m, 1H); 2,45–2,32 (m, 1H); 2,22 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 1H); 2,15–2,07 (m, 1H); 1,87–1,72 (m, 5H); 1,71 (d,  $J$  = 1,2 Hz, 3H); 1,52 (q,  $J$  = 7,5 Hz, 2H); 1,38–1,29 (m, 4H); 0,95–0,85 (m, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 171,2; 163,4; 160,4; 147,2; 145,6; 140,5; 123,8; 114,7; 111,8; 111,3; 103,3; 64,0; 46,7; 42,4; 41,0; 36,9; 35,4; 32,0; 31,4; 30,2; 27,8; 23,7; 22,7; 18,8; 14,1

IR (ATR),  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 706, 752, 805, 848, 889, 972, 1037, 1143, 1186, 1268, 1316, 1375, 1421, 1625, 1647, 1718, 2000, 2018, 2183, 2218, 2871, 2931, 3286

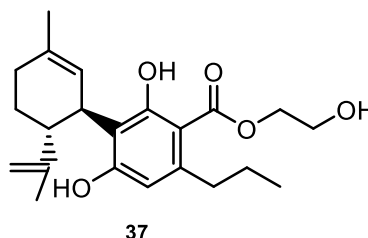
### 6.5.7 2-Hydroxyethylcannabidivarinolat (2-HECBDV, 37)

IUPAC: 2-Hydroxyethyl-(1'R,2'R)-2,6-dihydroxy-5'-methyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-4-propyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat

Summenformel: C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>

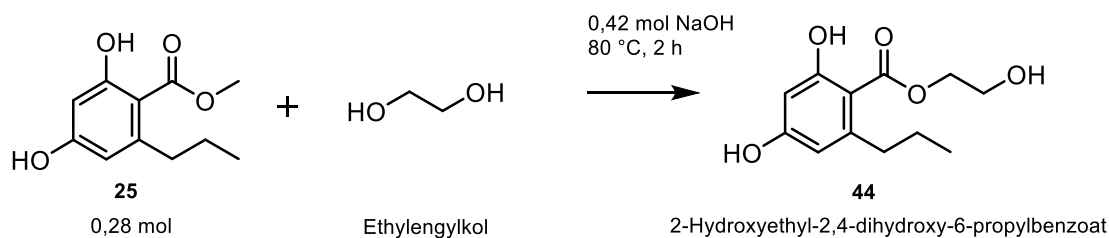
M<sub>r</sub>: 374,2 g/mol

MS (ESI): m/z = 373,2 [M-H]<sup>-</sup>



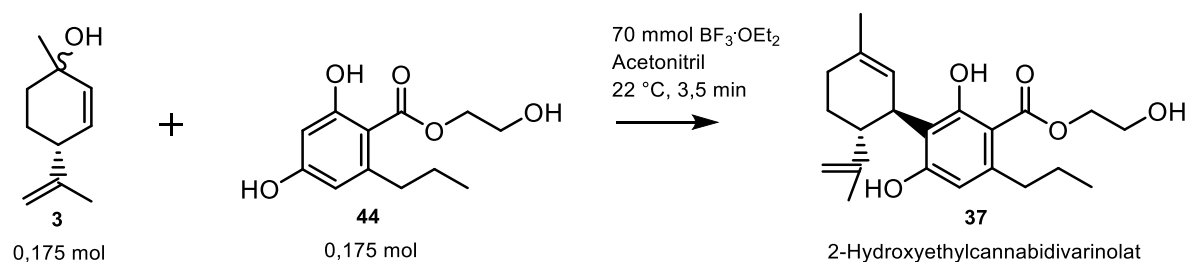
logP = 4,38 (berechnet nach Ghose und Crippen<sup>112</sup>)

Bei der Synthese von CBDV (siehe 6.3) entsteht bei der Verseifung in Glykol/KOH der CBDV-Glykolester. Nachfolgend wird eine alternative Syntheseroute beschrieben:



**Abb. 115:** Synthese von 2-Hydroxyethyl-2,4-dihydroxy-6-propylbenzoat

58 g (0,28 mol) DM (**25**) wurden bei Raumtemperatur in 100 g Ethylenglykol gelöst, mit einer Lösung von 17 g (0,42 mol) NaOH in 120 g Ethylenglykol versetzt und der Ansatz unter Rühren für 2 h auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung auf 200 g Eiswasser gegeben und 200 g MTBE hinzugefügt. Die Mischung wurde unter Rühren mit halbkonzentrierter Schwefelsäure auf pH 6 eingestellt. Nach Phasentrennung wurde das Lösungsmittel entfernt. Der erhaltene bräunlich gefärbte Feststoff wurde in Toluol umkristallisiert, wonach 42 g helles Kristallinat des Divaringlykolesters **44** vorlagen. Dies entspricht einer Ausbeute von 60 %.



**Abb. 116:** Synthese von 2-HECBDV

27 g (0,175 mol) **3** und 42 g (0,175 mol) **44** wurden bei Raumtemperatur in 140 g Acetonitril gelöst (250 ml Lösung A). 10 g (70 mmol)  $\text{BF}_3$ -Etherat wurden in 63 g Acetonitril bei Raumtemperatur gelöst (95 ml Lösung B). Über zwei getrennte Dosierpumpen wurden diese beiden Lösungen dann mit jeweils konstanter Flussrate (72 ml/min für Lösung A und 27 ml/min für Lösung B) in eine gerührte Reaktorzelle gepumpt. Aus der Reaktorzelle lief das Reaktionsgemisch über einen PTFE-Schlauch in eine gerührte und gesättigte  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, die auf 22 °C gehalten wurde. Die Dosierdauer betrug ca. 3,5 min. Nach Ende der Dosierung wurde die hydrolysierte Reaktionslösung noch für ca. 30 min nachgerührt. Nach Zugabe von 200 g Toluol wurde die sich absetzende wässrige Phase abgetrennt und das azeotrope Gemisch aus Toluol und Acetonitril bei Normaldruck abdestilliert. Zur Abtrennung des nicht umgesetzten Divaringlykolesters **44** wurde der Rückstand mit 200 g frischem Toluol vermischt und durch viermalige Zugabe von je 100 g NaOH (1%, aq) extrahiert. Nach Neutralisation der Toluolphase durch Waschen mit verdünnter wässriger Schwefelsäure und Abdestillieren des Toluols im Vakuum lagen 40 g Rohprodukt vor. Durch säulenchromatographische Reinigung mittels Kieselgel sowie Cyclohexan und Essigsäureethylester als mobiler Phase ließ sich reines 2-Hydroxyethylcannabidivarinolat (**37**) isolieren.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 11,89 (s, 1H); 6,53 (s, 1H); 6,23 (s, 1H); 5,58–5,53 (m, 1H); 4,52 (dq,  $J$  = 3,0, 1,5 Hz, 1H); 4,49–4,43 (m, 2H); 4,41–4,35 (m, 1H); 4,10–4,06 (m, 1H); 3,96 (q,  $J$  = 4,9, 3,7 Hz, 2H); 2,87 (ddd,  $J$  = 13,1, 8,7, 6,8 Hz, 1H); 2,76 (ddd,  $J$  = 13,0, 8,6, 6,8 Hz, 1H); 2,38 (q,  $J$  = 8,1 Hz, 1H); 2,29–2,16 (m, 1H); 2,10 (dd,  $J$  = 17,2, 3,2 Hz, 1H); 1,83–1,77 (m, 2H); 1,81–1,75 (m, 3H); 1,73–1,68 (m, 3H); 1,63–1,51 (m, 2H); 0,95 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 172,4; 163,3; 160,1; 147,2; 145,5; 140,3; 124,0; 114,6; 111,8; 111,3; 103,7; 66,7; 61,2; 46,7; 39,0; 35,4; 30,2; 27,8; 24,8; 23,7; 18,8; 14,2

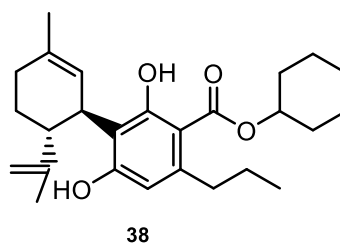
### 6.5.8 Cyclohexylcannabidivarinolat (CHCBDV, 38)

IUPAC: Cyclohexyl-(1'R,2'R)-2,6-dihydroxy-5'-methyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-4-propyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat

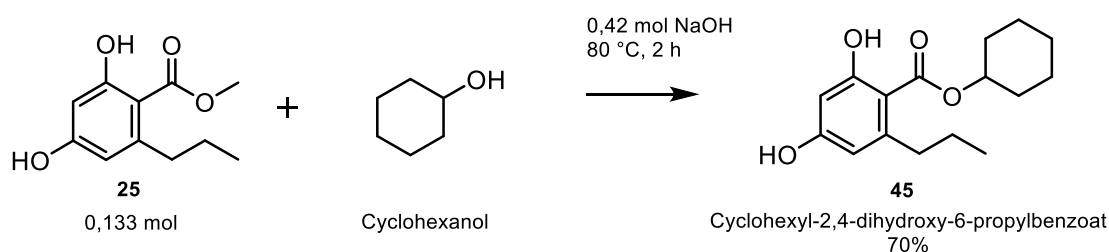
Summenformel: C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>

M<sub>r</sub>: 412,3 g/mol

MS (ESI): m/z = 411,3 [M-H]<sup>-</sup>

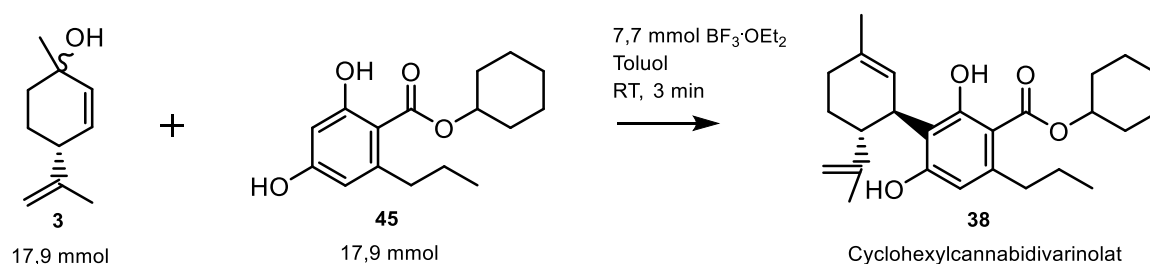


logP = 6,44 (berechnet nach Ghose und Crippen<sup>112</sup>)



**Abb. 117:** Synthese von Cyclohexyl-2,4-dihydroxy-6-propylbenzoat

28 g (0,133 mol) DM (**25**) wurden bei Raumtemperatur in 133 g Cyclohexanol gelöst und wie in 6.5.7 beschrieben umgesetzt. Nach Kristallisation aus MTBE konnten 26 g weißes Kristallinat von **45** isoliert werden, was einer Ausbeute von 70% entspricht.



**Abb. 118:** Synthese von CHCBDV



2,7 g (17,9 mmol) Menthadienol G (**3**) und 5 g (17,9 mmol) **45** wurden bei Raumtemperatur in 20 g Toluol gelöst und als Vorlage verwendet. 1,1 g (7,7 mmol) BF<sub>3</sub>-Etherat wurden über eine Spritze (Lösung B) zudosiert und der Ansatz für 1 min bei Raumtemperatur nachgerührt. Die Mischung wurde auf 50 g gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben. Das Edukt wurde fünfmal mit je 50 g NaOH (1 %, aq) extrahiert und die organische Phase mit verdünnter wässriger Schwefelsäure neutralisiert. Nach Abdestillieren des Toluols lagen 5,9 g des Rohproduktes vor, welches chromatographisch aufgereinigt wurde.

Die Synthese konnte auch im größeren Maßstab in der unter 3.1.4 und 6.2 beschriebenen Apparatur durchgeführt werden.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 12,22 (s, 1H); 6,48 (s, 1H); 6,20 (s, 1H); 5,58–5,51 (m, 1H); 5,04 (tt, J = 9,6, 4,0 Hz, 1H); 4,53 (dq, J = 3,0, 1,5 Hz, 1H); 4,42–4,37 (m, 1H); 4,11–4,07 (m, 1H); 2,86 (ddd, J = 12,9, 9,4, 6,0 Hz, 1H); 2,76 (ddd, J = 12,9, 9,5, 6,1 Hz, 1H); 2,39 (q, J = 8,1, 8,1, 6,1 Hz, 1H); 2,27–2,17 (m, 1H); 2,09 (dq, J = 18,1, 3,9 Hz, 1H); 2,04–1,98 (m, 2H); 1,85–1,79 (m, 4H); 1,79–1,75 (m, 3H); 1,71 (t, J = 1,0 Hz, 3H); 1,64–1,49 (m, 5H); 1,47–1,38 (m, 2H); 1,33–1,28 (m, 2H); 0,94 (t, J = 7,4 Hz, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171,7; 163,2; 159,7; 147,3; 145,6; 140,1; 124,1; 114,4; 111,5; 111,2; 104,3; 74,2; 46,6; 38,9; 35,4; 31,8; 31,8; 30,2; 27,8; 25,4; 24,9; 24,1; 24,1; 23,7; 18,9; 14,2

IR (ATR),  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>]: 746, 811, 843, 865, 890, 948, 976, 1011, 1036, 1075, 1101, 1121, 1146, 1167, 1185, 1238, 1260, 1321, 1350, 1376, 1424, 1450, 1576, 1619, 1638, 2861, 2933, 3413

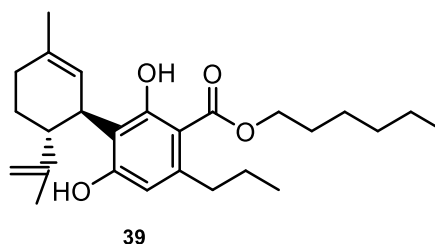
### 6.5.9 Hexylcannabidivarinolat (HCBDV, **39**)

IUPAC: Hexyl-(1'R,2'R)-2,6-dihydroxy-5'-methyl-2'-(prop-1-en-2-yl)-4-propyl-1',2',3',4'-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat

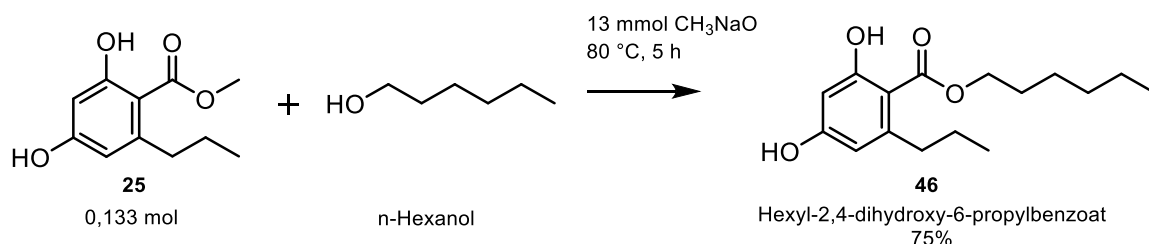
Summenformel: C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>

M<sub>r</sub>: 414,3 g/mol

MS (ESI): m/z = 413,3 [M-H]<sup>-</sup>

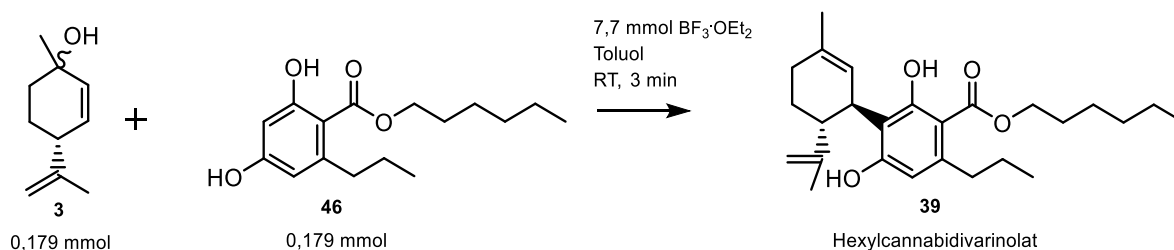


$\log P = 6,97$  (berechnet nach Ghose und Crippen<sup>112</sup>)



**Abb. 119:** Synthese von Hexyl-2,4-dihydroxy-6-propylbenzoat

28 g (0,133 mol) DM (**25**) wurden bei Raumtemperatur in 136 g n-Hexanol gelöst und mit 0,7 g (13 mmol) Natriummethanolat versetzt. Unter Rühren und Rückfluss wurde die Mischung für 5 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde n-Hexanol abdestilliert, je 100 g Toluol und Eiswasser unter Rühren zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur mit halbkonzentrierter Schwefelsäure auf pH 6 eingestellt. Nach Phasentrennung wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in Cyclohexan aufgenommen, gekühlt und kristallisiert. Es konnten 28 g weißes Kristallisat von **46** erhalten werden. Die Ausbeute betrug 75%.



**Abb. 120:** Synthese von HCBDV

Die weitere Synthese wurde wie in 6.5.7 beschrieben durchgeführt. Es wurden nahezu die dieselben Mengen an Edukten eingesetzt. Es konnten 5,2 g des Rohproduktes erhalten werden, welches chromatographisch aufgereinigt wurde.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 12,14$  (s, 1H); 6,49 (s, 1H); 6,21 (s, 1H); 5,55 (s, 1H); 4,52 (dd, J = 2,4, 1,4 Hz, 1H); 4,39 (s, 1H); 4,35–4,26 (m, 2H); 4,15–4,06 (m, 1H); 2,85 (ddd, J = 13,0, 9,3, 6,2 Hz, 1H); 2,75 (ddd, J = 13,1, 9,3, 6,3 Hz, 1H); 2,38 (q, J = 8,3, 7,7 Hz, 1H); 2,27–2,18 (m, 1H); 2,09 (dq, J = 18,0, 3,5 Hz, 1H); 1,79 (s, 3H); 1,84–1,73 (m, 4H); 1,73–1,70 (m, 3H); 1,62–1,51 (m, 2H); 1,48–1,40 (m, 2H); 1,38–1,30 (m, 4H); 0,93 (t, J = 7,3 Hz, 3H); 0,91 (t, J = 7,1 Hz, 3H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 172,4; 163,2; 159,8; 147,3; 145,6; 140,2; 124,1; 114,4; 111,5; 111,2; 104,1; 65,5; 46,7; 38,8; 35,4; 31,5; 30,2; 28,5; 27,8; 25,9; 24,8; 23,7; 22,6; 18,8; 14,2; 14,0$

IR (ATR),  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 726, 811, 843, 865, 886, 975, 1017, 1052, 1073, 1101, 1145, 1164, 1184, 1239, 1265, 1307, 1375, 1395, 1421, 1451, 1576, 1618, 1641, 2871, 2928, 2957, 3403

## 6.6 Zellassay-basierte pharmakologische Charakterisierung neuer Cannabinoide

### 6.6.1 Bindungsaffinität von CBD- und CBDV-Derivaten zu CB1- und CB2-Rezeptoren

Es wurden Membranen von HEK293EBNA-Zellen verwendet, in die CB1- bzw. CB2-Rezeptoren mittels cDNA transfiziert worden war (RBHCB1M400UA und RBXCB2M400UA, Fa. PerkinElmer Life). In einem beispielhaften Experiment lag die Protein-Konzentration der CB1-Rezeptor-tragenden Membranen bei 8,0 mg/ml und die der CB2-Rezeptor-tragenden Membranen bei 4,0 mg/ml (Angaben des Herstellers).

Die Membransuspensionen wurden 1:20 mit Pufferlösung verdünnt (Puffer für CB1: 50 nmol/l TrisCl, 5 nmol/l  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2,5 nmol/l EDTA, 0,5 mg/ml BSA mit pH 7,4; Puffer für CB2: 50 nmol/l TrisCl, 5 nmol/l  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2,5 nmol/l EGTA, 1 mg/ml BSA mit pH 7,5). Als Radioligand wurde  $[\text{}^3\text{H}]$ -CP55940 (144 Ci/mmol, Fa. PerkinElmer) eingesetzt, dessen Konzentration für die CB1-Bindungsstudien 0,10 nmol/l (finales Volumen: 200  $\mu\text{l}$ ) und für die CB2-Bindungsstudien 0,15 nmol/l (finales Volumen: 600  $\mu\text{l}$ ) betrug. Die Membranen wurden im Puffer resuspendiert und mit dem Radioliganden sowie mit jeder Substanz für 90 min bei 30 °C inkubiert. Unspezifische Bindungen wurden mit Hilfe des klassischen Liganden WIN55212-2 bestimmt. Die 100%ige Bindung des Radioliganden wurde dadurch bestimmt, dass die Membranen ohne eine andere Substanz inkubiert wurden. Die Substanzen wurden mit einem Gehalt von  $\geq 95\%$  [m/m] in den jeweils genannten Konzentrationen eingesetzt.

Für die Vortests wurden die Testsubstanzen in einer Konzentration von 40  $\mu\text{mol/l}$  appliziert. Gesammelt wurden die Daten von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils drei Messungen beinhalteten. Bei einer Bindung von  $> 50\%$  wurden die Testsubstanzen mit Konzentrationen von  $10^{-4}$ – $10^{-11}$  mol/l appliziert und die Verdrängung von  $[\text{}^3\text{H}]$ -CP55940 gemessen. Auch hier wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils drei Messungen

durchgeführt. Die Daten wurden mit GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.01 (Fa. GraphPad Software Inc) analysiert.

Filtrationen wurden mit einem Harvester<sup>®</sup> Filtermat (Fa. PerkinElmer) mit Filtermat A GF/C Filtern durchgeführt. Die Filter wurden zuvor mit Polyethylenimin behandelt. Nach Filtration des jeweiligen Ansatzes wurde dieser neunmal mit dem jeweiligen Bindungspuffer gewaschen und anschließend getrocknet. Die Radioaktivität wurde mit einem Flüssigszintillationsspektrometer (Wallac MicroBeta, TriLux, Fa. PerkinElmer) bestimmt.

### **6.6.2 Messung der intrinsischen Aktivität in einem CB1-, bzw. CB2-Rezeptor-transfizierten Hamster-ovarial-Zellmodell**

CHO-Zellen wurden mit CB1- oder CB2-Rezeptoren durch CB1- bzw. CB2-cDNA transfiziert (IMIBIC). Die gewonnenen transfizierten Zellen (CHO-CB1 und CHO-CB2,  $10^5$ /ml) wurden in 24-Loch-Mikrotiterplatten inkubiert und transient mit dem Plasmid CRE-luc transfiziert, welches die Gene für sechs „consensus cAMP responsive“(CRE)-Elemente und Leuchtkäfer-Luciferase (luc) enthält. Die Transfektion wurde mit Roti<sup>®</sup>-Fect (Fa. Carl Roth) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden nach 24 h geerntet. Es resultierten folgende transfizierte Zellen: CHO-CB1-CREluc und CHO-CB2-CREluc.

Um eine mögliche agonistische Aktivität an CB1-Rezeptoren zu messen, wurden die CHO-CB1-CREluc-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen (unter Berücksichtigung der vorherigen Tests auf Cytotoxizität) für 6 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde FSK (10  $\mu$ mol/l) verwendet. Um eine mögliche antagonistische Wirkung auf CB1-Rezeptoren zu untersuchen, wurden die CHO-CB1-CREluc-Zellen mit den Testsubstanzen für 15 min vorinkubiert und dann mit WIN (1  $\mu$ mol/l) für 6 h stimuliert. Um eine mögliche agonistische Wirkung auf CB2-Rezeptoren zu untersuchen, wurden die CHO-CB2-CREluc-Zellen mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen für 15 min und dann mit FSK (10  $\mu$ mol/l) für 6 h inkubiert. Als Positivkontrolle diente hier WIN als klassischer nicht spezifischer Agonist an CB2. Um die agonistische Wirkung einer Testsubstanz auf CB2-Rezeptoren zu bestätigen, wurden die CHO-CB2-CREluc-Zellen mit dem inversen Agonisten AM630 (6-Iodopravadolin, 1  $\mu$ mol/l) vorinkubiert und dann mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanz versehen.

Nach der Stimulation und Inkubation wurden die Zellen jeweils in einer Lösung mit 25 mmol/l Tris-Phosphat (pH = 7,8), 8 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l Dithiothreitol, 1 % Triton

---

X-100 und 7% Glycerol lysiert und die Luciferase-Aktivität mit einem dem Autolumat LB 9501 (Fa. Berthold Technologies) unter Verwendung des Luciferase Assay Kit (Fa. Promega) nach Herstellerangaben gemessen. Die Hintergrundaktivität (Puffer) wurde jeweils vom Ergebnis abgezogen. Es wurden der Mittelwert aus drei Experimenten und dessen Standardfehler bestimmt.

### **6.6.3 Zytotoxizität in CHO-Zellen, Jurkat-T-Zellen und RAW264.7-Makrophagen (MTT-Assay)**

Die Substanzen wurden in einer Konzentration von annähernd 100 mmol/l in DMSO gelöst. Aus dieser Lösung wurden Verdünnungen hergestellt, welche wiederum in den Zelltests verwendet wurden. Die DMSO-Konzentration in den Tests überschritt nie 1%.

Die Zellen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit einem Volumen von 100 µl pro Loch bis zu einer Dichte von  $7 \times 10^3$  Zellen/Loch im Nährmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10% FBS für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen (0,5, 1, 5, 10 und 25 µmol/l) behandelt. Danach wurden 50 µl eines Gemischs aus MTT (5 mg/ml) und DMEM zu jedem Loch hinzugefügt und für 4 h bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Daraufhin wurde die Reaktion mit der „Stop-Solution“ des Kits beendet, der Überstand abgezogen, 100 µg DMSO hinzugefügt und die Platte für 10 min vorsichtig geschüttelt. Die Absorption bei 550 nm wurde mit einem TriStar LB 941 (Fa. Berthold Technologies) gemessen. Aus den Messungen von je drei Experimenten wurde der Mittelwert und dessen Standardfehler bestimmt.

### **6.6.4 Jurkat-T-Zellen**

Die Jurkat-T-Zellen (American Type Culture Collection, Manassas) wurden im Medium RPMI 1640 (Fa. Sigma), das mit 10% Hitze-inaktiviertem FBS, 2 mmol/l L-Glutamin, 1 mmol/l HEPES Puffer (alle vier Fa. Life Technologies) sowie je 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin (in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung, Fa. Sigma) versetzt wurde, kultiviert. Die Zellen (ca.  $10^6$ /ml) wurden transient mit den Plasmiden NFAT-luc und KBF-luc transfiziert. Das verwendete NFAT-luc-Plasmid enthielt drei Kopien der NFAT-Bindungsstelle eines IL-2-Promotors und war mit einem Luciferase-Gen gekoppelt.<sup>134</sup> Das KBF-luc-Plasmid enthielt einen Conalbumin-Promotor, der vor einem Luciferase-Gen lag. Als Enhancer waren drei Kopien einer MHC-Protein-codierenden (engl. major histocompatibility complex) κB-Bindungsstelle enthalten, die upstream vom Promotor und dem Gen lagen.<sup>135</sup>

Die Transfektion wurde mit Lipofectin™ (Fa. Life Technologies) durchgeführt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit ansteigenden Dosen der Testsubstanzen oder mit WIN (Fa. Tocris) für 30 min vorstimuliert und danach mit PMA (50 ng/ml) plus IO (0,5 µg/ml) (beide Fa. Sigma) für 6 h stimuliert. Danach wurden die Zellen in einer Lösung mit 25 mmol Tris-Phosphat (pH = 7,8), 8 mmol MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol DTT, 1% Triton X-100 und 7% Glycerol lysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde mit einem Autolumat LB 953 (Fa. Berthold Technologies) unter Verwendung des Luciferase Assay Kit (Fa. Promega) nach Herstellerangaben gemessen. Die Hintergrundaktivität (Puffer) wurde jeweils vom Ergebnis abgezogen. Es wurden der Mittelwert aus drei Experimenten und dessen Standardfehler bestimmt.

### **6.6.5 IL-17-vermittelte M1-Polarisation von RAW264.7-Makrophagen**

Pro Petrischale wurden 10<sup>6</sup> RAW264.7-Makrophagen (American Type Culture Collection, Manassas) bei 37 °C und normaler Luftfeuchte mit 5% CO<sub>2</sub> in DMEM (Fa. Sigma, St. Louis), das mit 10% Hitze-inaktiviertem FBS, 2 mmol L-Glutamin sowie je 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin (in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung) versetzt wurde, kultiviert.

Für die Tests wurden die Zellen für 18 h mit den Testsubstanzen in 0,1%igem FBS inkubiert und danach für 24 h mit rekombinantem murinen IL-17 (50 ng/ml, Fa. R&D Systems) stimuliert. Die Zellen wurden in PBS gesammelt und ihre mRNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die Reinheit der mRNA wurde mittels UV-Messung bei 260 und 280 nm sichergestellt. Um die Integrität der gewonnenen mRNA zu überprüfen, wurde diese mittels Agarose-Elektrophorese auf Bruchstücke untersucht.

Als Marker für die pro-inflammatorische Aktivität wurden die Induktionen von IL-6-, IL-1β-, CC12- und TNF-α-mRNA gemessen. Die Sequenzen der für die qPCR verwendeten Oligonucleotid-Primer sind in Tab. 35 angegeben. Die Primer (Fa. Eurofins Genomics) wurden in einer Konzentration von 5 µmol/l eingesetzt. Die reverse Transkription der mRNA in cDNA wurde mittels des iScript cDNA Synthesis Kit (Fa. Bio-Rad) durchgeführt. Für die Analyse der cDNA mittels qPCR wurde der iQ™ SYBR Green Supermix und ein CFX96 real-time PCR System (beide Fa. Bio-Rad) verwendet. Der Ablauf der Amplifizierung beinhaltete die Denaturierung für 5 min bei 95 °C gefolgt von 40 Zyklen von je 30 s bei 95 °C und 30 s bei 55 °C (Annealing). Es folgte die Elongation für 30 s bei 72 °C. Am Ende wurden ein Zyklus für 10 s bei 83 °C und ein finaler Zyklus für 1 min bei 72 °C durchlaufen.

Die Berechnungen wurden mit der Livak-Methode nach dem Prinzip einer relativen Quantifizierung mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz durchgeführt.<sup>136</sup> Die Resultate sind als Vielfaches der Expression des Referenzgens ( $2^{\Delta\Delta C_t}$ ) angegeben.

**Tab. 35:** Sequenzen der verwendeten Primer für die qPCR

Gen	Forward	Reverse
IL-6	5'-GAACAACGATGATGCACTTGC-3'	5'-TCCAGGTAGCTATGGTACTCC-3'
IL-1 $\beta$	5'-CTCCACCTCAATGGACAGAA-3'	5'-GCCGTCTTTCATTACACAGG-3'
CCl2	5'-GGGCCTGCTGTTTACAGTT-3'	5'-CCAGCCTACTCATTGGGAT-3'
TNF- $\alpha$	5'-CTACTCCCAGGTTCTCTTCAA-3'	5'-GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC-3'
GAPDH	5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3'	5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'

### 6.6.6 Primäre humane Monozyten

Die primären humanen Monozyten wurden für die Experimente durch Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Methode) gewonnen.<sup>137,138</sup> Die Zellen wurden bei VivaCell, Freiburg, aus Blutproben von gesunden Probanden isoliert und für die Experimente zur Verfügung gestellt. Nach Resuspension in 50 ml Medium RPMI 1640 mit geringem Endotoxingehalt (z.B. Fa. Invitrogen), das mit 10% humanem Serum (Fa. PAA) versetzt wurde, wurde ihre Anzahl mit einem Partikelzähler (Euro Diagnostics, Krefeld) bestimmt. Danach wurden sie in 24-Loch-Mikrotiterplatten gesät (ca. 500 000 Zellen/ml in 1 ml) und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium und die nicht adhärenen Zellen (Lymphozyten) wurden entfernt und frisches RPMI-1640-Medium mit 1% humanem Serum hinzugefügt. Danach waren die Zellen bereit zur Inkubation mit den Testsubstanzen. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des alamarBlue<sup>®</sup>-Reagenzes bestimmt.

Die Zellen wurden mit dem Stimulus (LPS, 10 ng/ml, *Escherichia coli*, Fa. Sigma-Aldrich) für 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Lösungen der CBD-Derivate in DMSO wurden in ansteigenden Dosen 30 min vor der Behandlung mit LPS zugegeben. Danach wurde der Überstand entfernt, zentrifugiert und nach den Arbeitsanweisungen des Herstellers der verwendeten Immunoassays (eBioscience, Fa. Thermo Fisher) untersucht.

### **6.6.7 Zytotoxizität in primären humanen Monozyten (alamarBlue®-Assay)**

Monozyten wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten gesät. Die Testsubstanzen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,1–50 µmol/l zugegeben und zusammen mit den Zellen über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. NaF wurde in einer Konzentration von 250 mg/ml als Positivkontrolle verwendet. Als Negativkontrolle diente das Medium ohne Testsubstanz. Am nächsten Tag wurden die Überstände abgesaugt. Es wurde einmal mit 100 µl PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl alamarBlue®-Reagenz-Medium-Gemisch (10% (v/v) alamarBlue®-Reagenz, Fa. Invitrogen, Thermo Fisher, 90% (v/v) PBS) wurde die Mikrotiterplatte für 3 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung (Extinktion bei 544 nm) im PolarStar Reader (Fa. BMG Labtech). Es wurde der Mittelwert aus vier Experimenten und dessen Standardfehler bestimmt.



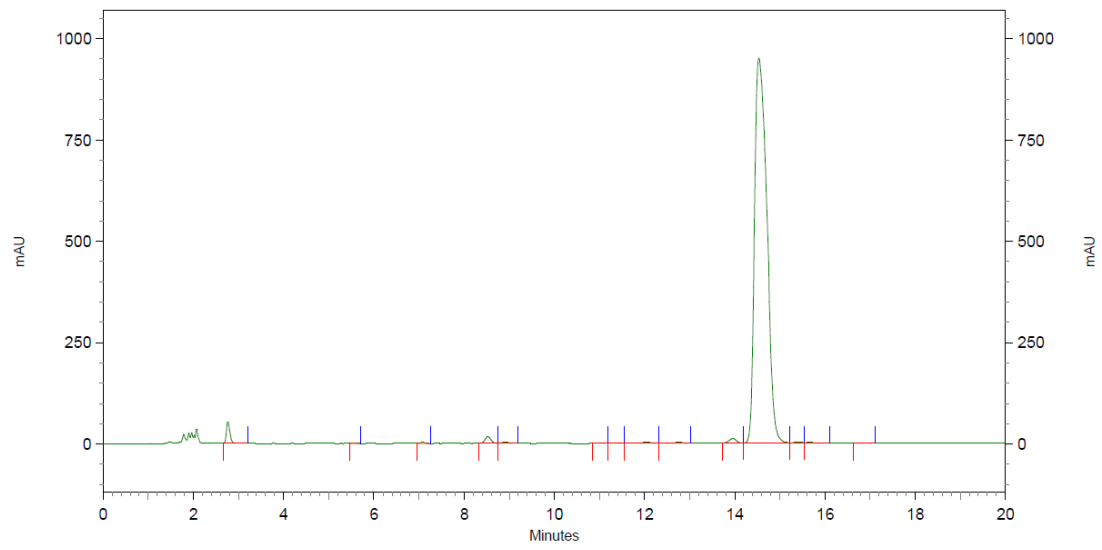
## **Anhang**

## Anhang 1

**Tab. 36:** Verseifung und Decarboxylierung von Cannabidiolcarbonsäuremethylester zu CBD. Gelb markiert, die in 6.2.3 beschriebene Versuchsdurchführung

Versuchs-Nr.	CBD-Ester	Ethylen-glykol	KOH	Temp.	Zeit	DV-Destillat	Gehalt GC [Fläche]	Produkt	Ausbeute
13/1/008/5	~ 1,2 mol	1000 g	87 g (1,55 mol)	130 °C 150 °C	2 h 2 h	352 g	84,7 %	298 g	75–80 %
13/1/011/5	~ 1,2 mol	1000 g	87 g (1,55 mol)	150 °C	4 h	361 g	82,7 %	299 g	75–80 %
13/1/023/5	~ 1,0 mol	1090 g	100 g (1,79 mol)	150 °C	4 h	311 g	84,9 %	264 g	~ 80 %
13/1/032/5	~ 1,0 mol	800 g	70 g (1,25 mol)	120 °C 150 °C	2 h 3 h	274 g	83,2 %	228 g	72 %
13/1/033/5	~ 1,2 mol	1400 g	87 g (1,55 mol)	120 °C 150 °C	2 h 3 h	343 g	83,1 %	285 g	75 %
13/1/043/5	1,16 mol	800 g	90 g (1,61 mol)	120 °C 150 °C	2 h 3 h	283 g	86,9 %	246 g	68 %
13/1/047/5	1,02 mol	1000 g	87 g (1,55 mol)	120 °C 150 °C	2 h 3 h	254 g	79,6 %	202 g	63 %
13/1/050/5	1,68 mol	1490 g	141 g (2,52 mol)	120 °C 150 °C	2 h 3 h	534 g	83,0 %	443 g	84 %
13/1/051/5	1,11 mol	1120 g	94 g (1,68 mol)	120 °C 150 °C	2 h 3 h	368 g	84,8 %	312 g	89 %
<b>13/1/053/5</b>	<b>1,07 mol</b>	<b>1050 g</b>	<b>84 g (1,50 mol)</b>	<b>120 °C 150 °C</b>	<b>2 h 3 h</b>	<b>330 g</b>	<b>84,2 %</b>	<b>278 g</b>	<b>83 %</b>
13/1/061/5	1,01 mol	1090 g	90 g (1,61 mol)	120 °C 150 °C	2 h 3 h	333 g	78,9 %	263 g	84 %
13/1/068/5	1,07 mol	1180 g	90 g (1,61 mol)	120 °C 150 °C	2 h 4 h	318 g	75,6 %	240 g	72 %
13/1/071/5	1,04 mol	1180 g	96 g (1,71 mol)	120 °C 150 °C	2 h 4 h	340 g	76,5 %	260 g	80 %

## Anhang 2



**Abb. 121:** HPLC-Chromatogramm des SMB-Produktes von Dronabinol aus Versuch Nr. 1

### Anhang 3

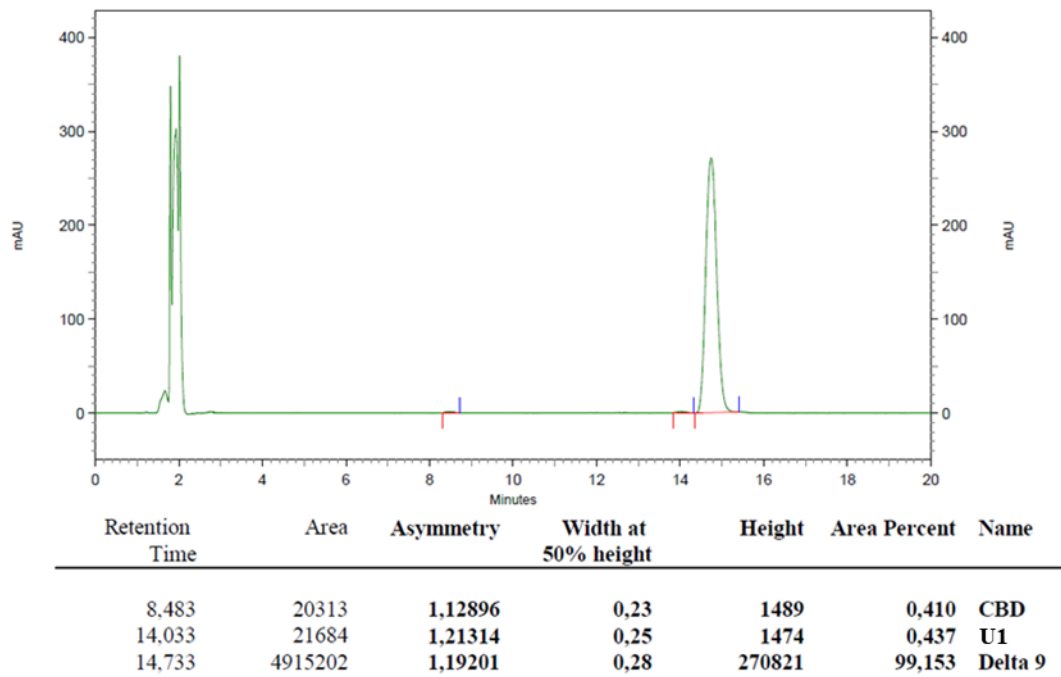


Abb. 122: HPLC-Chromatogramm von Dronabinol nach vollständiger Aufreinigung aus Versuch Nr. 3

---

## Abkürzungsverzeichnis

2-HEC	2-Hydroxyethylcannabidiolat
2-HECBDV	2-Hydroxyethylcannabidivarinolat
2-HPC	2-Hydroxypentylcannabidiolat
API	engl. active pharmaceutical ingredient, dt. Wirkstoff
ATR	engl. attenuated total reflection, dt. abgeschwächte Totalreflexion
BSA	engl. bovine serum albumin, dt. Rinderserumalbumin
BtM	Betäubungsmittel
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
CBC	Cannabichromen
CBCA	Cannabichromensäure
CBD	Cannabidiol
CBDA	Cannabidiolsäure
CBDV	Cannabidivarin
CBG	Cannabigerol
CBGA	Cannabigerolsäure
CBGVA	Cannabigerovarinsäure
CC12	CC-Chemokinligand 2'
cDNA	engl. complementary deoxyribonucleic acid, dt. komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	engl. collision energy, dt. Kollisionsenergie
CHCBDV	Cyclohexylcannabidivarinolat
CHO	engl. Chinese hamster ovary cells, dt. immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
DAD	Diodenarraydetektor
df	engl. diameter of film, dt. Filmdicke
DM	Divarincarbonsäuremethylester
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DV	Dünnschichtverdampfer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Fa.	Firma

FBS	engl. fetal bovine serum, dt. fetales Rinderserum
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flammenionisationsdetektor
Frag V	engl. fragmentor voltage, dt. Fragmentierungsspannung
FSK	Forskolin
GC	Gaschromatographie
GCBD	Glycerylcannabidiolat
h	Stunde
ha	Hektar
HC	Hexylcannabidiolat
HCBDV	Hexylcannabidivarinolat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hPa	Hektopascal
HPLC	engl. high performance liquid chromatography, dt. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
id	engl. inner diameter, dt. Innendurchmesser
IL	Interleukin
K	Kelvin
LN	Labornummer
logP	engl. logarithm of partition coefficient, dt. Logarithmus des Verteilungskoeffizienten
LOQ	engl. limit of quantification, dt. Bestimmungsgrenze
MHC	engl. major histocompatibility complex, dt. Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
$M_r$	relative Molekülmasse
MRM	engl. multiple reaction monitoring
mRNA	engl. messenger RNA, dt. Boten-RNA
MTBE	Methyl-tertiär-butylether
MW	Mittelwert
n. d.	nicht detektierbar
NFAT	engl. nuclear factor of activated T-cells, dt. nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NF- $\kappa$ B	engl. nuclear factor $\kappa$ B, dt. nukleärer Faktor $\kappa$ B
NMSC	N-Methylsulfonylcannabidiolat
OM	Olivetolcarbonsäuremethylester
Pa	Pascal

---

PBS	engl. phosphate buffered saline, dt. Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl. polymerase chain reaction, dt. Polymerase-Kettenreaktion
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
präp.-HPLC	präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ppm	engl. parts per million
PTFE	Polytetrafluorethylen
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	engl. Roswell Park Memorial Institute
RT	engl. retention time, dt. Retentionszeit
S	Selektivität
s	Sekunde
SD	engl. standard deviation, dt. Standardabweichung
Sd.	siedend
SEM	engl. standard error of the mean, dt. Standardfehler des Mittelwerts
SMB	engl. Simulated Moving Bed
t	engl. time, dt. Zeit
THC	Tetrahydrocannabinol
THCA	Tetrahydrocannabinolsäure
THCV	Tetrahydrocannabidivarin
t <sub>M(Toluol)</sub>	mittlere Reaktionszeit der kontinuierlichen Synthese mit Angabe des Lösungsmittels (hier: Toluol)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trometamol, auch Tris(hydroxymethyl)aminomethane
USP	engl. United States Pharmacopeia
v. l. n. r.	von links nach rechts

## Literatur

1. Grotenhermen, F.; Müller-Vahl, K., The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Deutsches Ärzteblatt international* **2012**, *109* (29-30), 495-501.
2. Likar, R.; Pipam, W., Dronabinol bei Fibromyalgie. *Der Mediziner* **2011**, *3*, 22-26.
3. Täschner, K. L., *Cannabis. Biologie, Konsum und Wirkung*. Deutscher Ärzte-Verlag: **2005**; Vol. 4.
4. Moir, D.; Rickert, W. S.; Levasseur, G.; Larose, Y.; Maertens, R.; White, P.; Desjardins, S., A Comparison of Mainstream and Sidestream Marijuana and Tobacco Cigarette Smoke Produced under Two Machine Smoking Conditions. *Chemical Research in Toxicology* **2008**, *21* (2), 494-502.
5. Booz, G. W., Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* **2011**, *51* (5), 1054-61.
6. Massi, P.; Vaccani, A.; Ceruti, S.; Colombo, A.; Abbracchio, M. P.; Parolaro, D., Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, *308* (3), 838-45.
7. Notcutt, W.; Langford, R.; Davies, P.; Ratcliffe, S.; Potts, R., A placebo-controlled, parallel-group, randomized withdrawal study of subjects with symptoms of spasticity due to multiple sclerosis who are receiving long-term Sativex<sup>®</sup> (nabiximols). *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* **2012**, *18* (2), 219-28.
8. Englund, A.; Morrison, P. D.; Nottage, J.; Hague, D.; Kane, F.; Bonaccorso, S.; Stone, J. M.; Reichenberg, A.; Brenneisen, R.; Holt, D.; Feilding, A.; Walker, L.; Murray, R. M.; Kapur, S., Cannabidiol inhibits THC-elicited paranoid symptoms and hippocampal-dependent memory impairment. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)* **2013**, *27* (1), 19-27.
9. Pertwee, R. G., *Handbook of Cannabis*. Oxford University Press: **2014**.
10. GW-Pharma. Product Pipeline <https://www.gwpharm.com/products-pipeline/pipeline> [online], abgerufen am 30.12.2016.
11. GW-Pharma. GW Pharmaceuticals Announces Preliminary Results of Phase 2a Study for its Pipeline Compound GWP42006 <http://ir.gwpharm.com/news-releases/news-release-details/gw-pharmaceuticals-announces-preliminary-results-phase-2a-study> [online], abgerufen am 26.02.2018.
12. Pertwee, R. G.; Howlett, A. C.; Abood, M. E.; Alexander, S. P.; Di Marzo, V.; Elphick, M. R.; Greasley, P. J.; Hansen, H. S.; Kunos, G.; Mackie, K.; Mechoulam, R.; Ross, R. A., International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacological Reviews* **2010**, *62* (4), 588-631.



13. Dhopeswarkar, A.; Mackie, K., CB(2) Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target—What Does the Future Hold? *Molecular Pharmacology* **2014**, *86* (4), 430-437.
14. Howlett, A. C.; Barth, F.; Bonner, T. I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W. A.; Felder, C. C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B. R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R. G., International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews* **2002**, *54* (2), 161-202.
15. Howlett, A. C., Cannabinoid receptor signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology* **2005**, (168), 53-79.
16. Glass, M.; Felder, C. C., Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *Journal of Neuroscience* **1997**, *17* (14), 5327-33.
17. Maneuf, Y. P.; Brotchie, J. M., Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices. *British Journal of Pharmacology* **1997**, *120* (8), 1397-1398.
18. Calandra, B.; Portier, M.; Kerneis, A.; Delpech, M.; Carillon, C.; Le Fur, G.; Ferrara, P.; Shire, D., Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *European Journal of Pharmacology* **1999**, *374* (3), 445-55.
19. Jarrahian, A.; Watts, V. J.; Barker, E. L., D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, *308* (3), 880-6.
20. Price, M. R.; Baillie, G. L.; Thomas, A.; Stevenson, L. A.; Easson, M.; Goodwin, R.; McLean, A.; McIntosh, L.; Goodwin, G.; Walker, G.; Westwood, P.; Marrs, J.; Thomson, F.; Cowley, P.; Christopoulos, A.; Pertwee, R. G.; Ross, R. A., Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor. *Molecular Pharmacology* **2005**, *68* (5), 1484-95.
21. Horswill, J. G.; Bali, U.; Shaaban, S.; Keily, J. F.; Jeevaratnam, P.; Babbs, A. J.; Reynet, C.; Wong Kai In, P., PSNCBAM-1, a novel allosteric antagonist at cannabinoid CB1 receptors with hypophagic effects in rats. *British Journal of Pharmacology* **2007**, *152* (5), 805-14.
22. Navarro, H. A.; Howard, J. L.; Pollard, G. T.; Carroll, F. I., Positive allosteric modulation of the human cannabinoid (CB(1)) receptor by RTI-371, a selective inhibitor of the dopamine transporter. *British Journal of Pharmacology* **2009**, *156* (7), 1178-1184.
23. Pertwee, R. G.; Ross, R. A., Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **2002**, *66* (2-3), 101-21.
24. Szabo, B.; Schlicker, E., Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handbook of Experimental Pharmacology* **2005**, (168), 327-65.
25. Skaper, S. D.; Buriani, A.; Dal Toso, R.; Petrelli, L.; Romanello, S.; Facci, L.; Leon, A., The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are

- protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93* (9), 3984-89.
26. Ross, R. A.; Coutts, A. A.; McFarlane, S. M.; Anavi-Goffer, S.; Irving, A. J.; Pertwee, R. G.; MacEwan, D. J.; Scott, R. H., Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology* **2001**, *40* (2), 221-32.
  27. Van Sickle, M. D.; Duncan, M.; Kingsley, P. J.; Mouihate, A.; Urbani, P.; Mackie, K.; Stella, N.; Makriyannis, A.; Piomelli, D.; Davison, J. S.; Marnett, L. J.; Di Marzo, V.; Pittman, Q. J.; Patel, K. D.; Sharkey, K. A., Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* **2005**, *310* (5746), 329-32.
  28. Wotherspoon, G.; Fox, A.; McIntyre, P.; Colley, S.; Bevan, S.; Winter, J., Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience* **2005**, *135* (1), 235-45.
  29. Beltramo, M.; Bernardini, N.; Bertorelli, R.; Campanella, M.; Nicolussi, E.; Fredduzzi, S.; Reggiani, A., CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *European Journal of Neuroscience* **2006**, *23* (6), 1530-38.
  30. Gong, J. P.; Onaivi, E. S.; Ishiguro, H.; Liu, Q. R.; Tagliaferro, P. A.; Brusco, A.; Uhl, G. R., Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research* **2006**, *1071* (1), 10-23.
  31. Baek, J. H.; Zheng, Y.; Darlington, C. L.; Smith, P. F., Cannabinoid CB2 receptor expression in the rat brainstem cochlear and vestibular nuclei. *Acta Oto-Laryngologica* **2008**, *128* (9), 961-67.
  32. Pertwee, R. G., Pharmacological actions of cannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology* **2005**, (168), 1-51.
  33. Idris, A. I.; Ralston, S. H., Role of cannabinoids in the regulation of bone remodeling. *Frontiers in Endocrinology* **2012**, *3*, 136.
  34. Earleywine, M. Opinion: Medical Marijuana Benefits <http://www.cbsnews.com/news/opinion-medical-marijuana-benefits/> [online], **2009**. abgerufen 07.02.2016. [Übersetzt durch den Verfasser.]
  35. Le Boisselier, R.; Alexandre, J.; Lelong-Boulouard, V.; Debruyne, D., Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2017**, *101* (2), 220-229.
  36. Likar, R.; Köstenberger, M.; Neuwersch, S., Clinical use of cannabinoids. *Pharmakon* **2017**, *5* (2), 137-141.
  37. Pertwee, R. G., Cannabinoids and Multiple Sclerosis. *Molecular Neurobiology* **2007**, *36* (1), 45-59.

38. Dittel, B. N., Direct suppression of autoreactive lymphocytes in the central nervous system via the CB(2) receptor. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153* (2), 271-276.
39. Kim, K.; Moore, D. H.; Makriyannis, A.; Abood, M. E., AM1241, a cannabinoid CB2 receptor selective compound, delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Pharmacology* **2006**, *542* (1-3), 100-05.
40. Shoemaker, J. L.; Seely, K. A.; Reed, R. L.; Crow, J. P.; Prather, P. L., The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. *Journal of Neurochemistry* **2007**, *101* (1), 87-98.
41. Sagredo, O.; Pazos, M. R.; Valdeolivas, S.; Fernandez-Ruiz, J., Cannabinoids: novel medicines for the treatment of Huntington's disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* **2012**, *7* (1), 41-48.
42. Zhang, M.; Martin, B. R.; Adler, M. W.; Razdan, R. K.; Jallo, J. I.; Tuma, R. F., Cannabinoid CB(2) receptor activation decreases cerebral infarction in a mouse focal ischemia/reperfusion model. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **2007**, *27* (7), 1387-96.
43. Pacher, P.; Hasko, G., Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153* (2), 252-62.
44. Mach, F.; Montecucco, F.; Steffens, S., Cannabinoid receptors in acute and chronic complications of atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153* (2), 290-98.
45. Izzo, A. A.; Camilleri, M., Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut* **2008**, *57* (8), 1140-55.
46. Wright, K. L.; Duncan, M.; Sharkey, K. A., Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153* (2), 263-70.
47. Batkai, S.; Osei-Hyiaman, D.; Pan, H.; El-Assal, O.; Rajesh, M.; Mukhopadhyay, P.; Hong, F.; Harvey-White, J.; Jafri, A.; Hasko, G.; Huffman, J. W.; Gao, B.; Kunos, G.; Pacher, P., Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *The FASEB Journal* **2007**, *21* (8), 1788-1800.
48. Barutta, F.; Piscitelli, F.; Pinach, S.; Bruno, G.; Gambino, R.; Rastaldi, M. P.; Salvidio, G.; Di Marzo, V.; Cavallo Perin, P.; Gruden, G., Protective role of cannabinoid receptor type 2 in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes* **2011**, *60* (9), 2386-96.
49. Mallat, A.; Teixeira-Clerc, F.; Deveaux, V.; Lotersztajn, S., Cannabinoid receptors as new targets of antifibrosing strategies during chronic liver diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2007**, *11* (3), 403-409.

50. Lotersztajn, S.; Teixeira-Clerc, F.; Julien, B.; Deveaux, V.; Ichigotani, Y.; Manin, S.; Tran-Van-Nhieu, J.; Karsak, M.; Zimmer, A.; Mallat, A., CB2 receptors as new therapeutic targets for liver diseases. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153* (2), 286-89.
51. Ofek, O.; Karsak, M.; Leclerc, N.; Fogel, M.; Frenkel, B.; Wright, K.; Tam, J.; Attar-Namdar, M.; Kram, V.; Shohami, E.; Mechoulam, R.; Zimmer, A.; Bab, I., Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (3), 696-701.
52. Guzman, M., Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature Reviews. Cancer* **2003**, *3* (10), 745-55.
53. Schultes, R. E.; Klein, W. M.; Ploman, T.; Lockwood, T. E., Cannabis: An Example for Taxonomic Neglect. *Harvard University Botanical Museum* **1974**, (23), 337-367.
54. DAC, Monographie Dronabinol. **2008**, D-100.
55. Holzgrabe, U., Dronabinol. In *HagerROM*, Springer-Verlag: **2014**.
56. Drugbank.ca. Dronabinol <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00470> [online], **2015**. Abgerufen am 21.11.2015.
57. Sangster, J. LogKOW Database. A databank of evaluated octanol-water partition coefficients (LogP) **2011**. Abgerufen am 21.11.2015.
58. AbbVie, Marinol. Full Prescribing Information. August **2017**.
59. NRF, Ölige Dronabinol-Tropfen 25 mg/ml. **2017**, 22.8.
60. Borsch, J., Der Preis der Schmerzfreiheit. *Deutsche Apotheker Zeitung* **2014**, 70.
61. Almirall, Fachinformation Sativex® Spray zur Anwendung in der Mundhöhle. Mai **2011**.
62. DEA. The DEA position on Marijuana [http://www.dea.gov/docs/marijuana\\_position\\_2011.pdf](http://www.dea.gov/docs/marijuana_position_2011.pdf) [online], **2009**. Abgerufen am 07.02.2016.
63. FDA. FDA and Marijuana: Questions and Answers <http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm421163.htm> [online], **2015**. Abgerufen am 07.02.2016. [Übersetzt durch den Verfasser.]
64. Gaoni, Y.; Mechoulam, R., Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86* (8), 1646-47.
65. Mechoulam, R.; Gaoni, Y., A Total Synthesis of dl-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87*, 3273-75.

- 
66. Petrzilka, T.; Haefliger, W.; Sikemeier, C.; Ohloff, G.; Eschenmoser, A., Synthese und Chiralität des (-)-Cannabidiols Vorläufige Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta* **1967**, *50* (2), 719-23.
67. Razdan, R. K.; Dalzell, H. C.; Handrick, G. R., Hashish. X. A Simple one-step synthesis of (-)- $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol (THC) from p-mentha-2,8-dien-1-ol and olivetol. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96* (18), 5860-65.
68. Petrzilka, T.; Haefliger, W.; Sikemeier, C., Synthese von Haschisch-Inhaltsstoffen. 4. Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta* **1969**, *52* (4), 1102-34.
69. Korte, F.; Sieper, H., Zur chemischen Klassifizierung von Pflanzen, XX. Isolierung von Haschisch-inhaltsstoffen aus Cannabis Sativa non Indica. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1960**, *630* (1), 71-83.
70. Crombie, L.; Crombie, W. M. L.; Forbes, R.; Withaker, A., Synthesis of Cannabinoid Methyl Esters and Acids. *Chemical Research* **1977**, (144), 1301-45.
71. Chan, T. H.; Chaly, T., A biomimetic synthesis of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol. *Tetrahedron Letters* **1982**, *23* (29), 2935-38.
72. Koch, O.; Götz, M. R.; Looft, J.; Vössing, T. Mixtures of cannabinoid compounds, their preparation and use: (-)-trans-Cannabidiol, Tetrahydrocannabidiol and their derivatives. EP2842933B1, **2015**.
73. Cabaj, J. E.; Lukesh, J. M.; Pariza, R. J.; Zizelman, P. M., Large-Scale Preparation of (+)-p-Mentha-2-ene-1,8-diol, a Key Intermediate in the Synthesis of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol. *Organic Process Research & Development* **2009**, *13* (2), 358-61.
74. Stoss, P.; Merrath, P., A Useful Approach Towards  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol. *Synlett* **1991**, (08), 553-54.
75. Mechoulam, R.; Braun, P.; Gaoni, Y., Stereospecific synthesis of (-)-DELTA-1- and (-)-DELTA-1(6)-tetrahydrocannabinols. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89* (17), 4552-54.
76. Mechoulam, R.; Braun, P.; Gaoni, Y., Syntheses of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol and related cannabinoids. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94* (17), 6159-65.
77. Cardillo, B.; Merlini, L.; Servi, S., Alkylation of resorcinols with monoterpenoid allylic alcohols in aqueous acid: synthesis of new cannabinoid derivatives. *Tetrahedron Letters* **1972**, *13* (10), 945-48.
78. Jen, T. Y.; Hughes, G. A.; Smith, H., Total synthesis of delta 8-(delta 1(6))-tetrahydrocannabinol, a biologically active constituent of hashish (marijuana). *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89* (17), 4551-52.
79. Lesch, B.; Toräng, J.; Nieger, M.; Bräse, S., The Diels-Alder Approach towards Cannabinoids. *Synthesis* **2005**, (11), 1888-1900.

- 
80. Xia, L.; Lee, Y. R., A Short Total Synthesis for Biologically Interesting (+)- and (-)-Machaeriol A. *Synlett* **2008**, (11), 1643-46.
  81. Ballerini, E.; Minuti, L.; Piermatti, O., High-pressure Diels-Alder cycloadditions between benzylideneacetones and 1,3-butadienes: application to the synthesis of (R,R)-(-)- and (S,S)-(+)-Delta8-tetrahydrocannabinol. *The Journal of organic chemistry* **2010**, 75 (12), 4251-60.
  82. Bräse, S.; Volz, N.; Gläser, F.; Nieger, M., Highly enantioselective access to cannabinoid-type tricycles by organocatalytic Diels-Alder reactions. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2012**, 8, 1385-92.
  83. Gläser, F.; Bröhmer, M. C.; Hurre, T.; Nieger, M.; Bräse, S., The Diels–Alder Approach to  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol Derivatives. *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, (7), 1516-24.
  84. Schafroth, M. A.; Zuccarello, G.; Krautwald, S.; Sarlah, D.; Carreira, E. M., Stereodivergent total synthesis of delta(9)-tetrahydrocannabinols. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2014**, 53 (50), 13898-901.
  85. DAC, Monographie Cannabidiol. **2015**, C-052.
  86. Pacifico, D.; Miselli, F.; Carboni, A.; Moschella, A.; Mandolino, G., Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. *Euphytica* **2008**, 160 (2), 231-40.
  87. Hanus, L.; Subova, D., The amount of main cannabinoid substances in hemp, cultivated for industrial fibre production and their changes in the course of one vegetation period. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae* **1989**, 122, 11-23.
  88. Small, E.; Beckstead, H. D., Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of *Cannabis*. *Lloydia* **1973**, 36 (2), 144-65.
  89. Riegler-Nurscher, S., Hanfanbau und Vermarktung. *Fachtagung Biologischer Ackerbau* **2009**.
  90. Loewe, S., Active principals of the cannabis and the pharmacology of the cannabinoids. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **1950**, 211 (2), 175-93. [Übersetzt durch den Verfasser.]
  91. Herlt, T. J.; MacDonald, P. L.; Rickards, R. W. Process for the preparation of dibenzo[b,d]pyrans. US5342971, **1994**.
  92. Steup, C.; Herkenroth, T. Verfahren zur Herstellung von synthetischen Cannabinoiden. EP2314580, **2015**.
  93. Vollner, L.; Bieniek, D.; Korte, F., Haschisch XX. Cannabidivarin, ein neuer Haschisch-Inhaltsstoff. *Tetrahedron Letters* **1969**, 10 (3), 145-147.
  94. Crombie, L.; L. Crombie, W. M., Cannabinoid bis-homologues: Miniaturised synthesis and GLC study. *Phytochemistry* **1975**, 14 (1), 213-20.

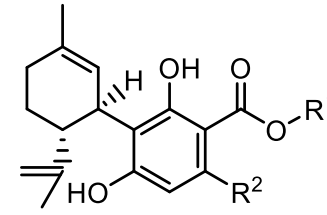
- 
95. Sides, H., Science Seeks to Unlock Marijuana's Secrets. *National Geographic* **2015**.
  96. Symrise-interner Bericht 2009/08.
  97. Symrise-interner Bericht 2004/04.
  98. Schwetlick, K., *Organikum*. Wiley: **2009**; Vol. 23. Auflage.
  99. Choi, Y. H.; Hazekamp, A.; Peltenburg-Looman, A. M. G.; Frédérick, M.; Erkelens, C.; Lefeber, A. W. M.; Verpoorte, R., NMR assignments of the major cannabinoids and cannabiflavonoids isolated from flowers of *Cannabis sativa*. *Phytochemical Analysis* **2004**, *15* (6), 345-54.
  100. Müller-Erlwein, E., *Chemische Reaktionstechnik*. 2. überarbeitete Auflage ed.; B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden: **2007**.
  101. Gaoni, Y.; Mechoulam, R., The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93* (1), 217-24.
  102. International Chemical Safety Cards (ICSC). Tetrahydrofuran [http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_card\\_id=0578](http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=0578) [online], 1997. Abgerufen am 21.02.2017.
  103. International Chemical Safety Cards (ICSC). Diethylether [http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_card\\_id=0355](http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=0355) [online], 2002. Abgerufen am 21.02.2017.
  104. Sander, F.; Lübbert, M., Simulated Moving Bed Chromatographie ein kontinuierliches Chromatographieverfahren. *Analytik News* **2011**.
  105. Steup, C. Method for the production of dronabinol. WO02062782, **2002**.
  106. Bhatarah, P.; Mchattie, D.; K., G. A. Production of delta 9 tetrahydrocannabinol. WO2009133376, **2008**.
  107. Gutman, A.; Etinger, M.; Fedotev, I.; Khanolkar, R.; Nisnevich, G. A.; Pertsikov, B.; Rukhman, I.; Tishin, B. Methods for purifying trans-(-)-Delta9-Tetrahydrocannabinol and trans-(+)-Delta9-Tetrahydrocannabinol. US20150126596, **2015**.
  108. Geiser, F. O.; Keenan, J. J.; Rossi, R.; Sanchez, A.; Whelan, J. M. Process for purifying (-)- $\Delta^9$ -trans-Tetrahydrocannabinol. WO2005061480, **2004**.
  109. Erfurt, H.; Weber, M.; Niemeyer, H. J.; Götz, M. R.; Winkler, M. Method for purifying cannabinoid compounds. PCT/EP2016/060905, **2016**.
  110. Pretsch, E., In *Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden*, Springer Verlag: **1981**.
  111. Symrise-interner Bericht 2015/01.

112. Ghose, A. K.; Crippen, G. M., Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1987**, *27* (1), 21-35.
113. Broto, P.; Moreau, G.; Vandycke, C., Molecular structures: perception, autocorrelation descriptor and sar studies: system of atomic contributions for the calculation of the n-octanol/water partition coefficients. *European journal of Medicinal Chemistry* **1984**, *19* (1), 71-78.
114. Di Marzo, V.; Berrendero, F.; Bisogno, T.; González, S.; Cavaliere, P.; Romero, J.; Cebeira, M.; Ramos, J. A.; Fernández-Ruiz, J. J., Enhancement of Anandamide Formation in the Limbic Forebrain and Reduction of Endocannabinoid Contents in the Striatum of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol-Tolerant Rats. *Journal of Neurochemistry* **2000**, *74* (4), 1627-35.
115. Granja, A. G.; Carrillo-Salinas, F.; Pagani, A.; Gomez-Canas, M.; Negri, R.; Navarrete, C.; Mecha, M.; Mestre, L.; Fiebich, B. L.; Cantarero, I.; Calzado, M. A.; Bellido, M. L.; Fernandez-Ruiz, J.; Appendino, G.; Guaza, C.; Munoz, E., A cannabigerol quinone alleviates neuroinflammation in a chronic model of multiple sclerosis. *Journal of NeuroImmune Pharmacology* **2012**, *7* (4), 1002-16.
116. Kim, S. D.; Lee, W. M.; Endale, M.; Cho, Y. C.; Park, H. J.; Oh, J. W.; Rhee, M. H., RGS3 Suppresses cAMP Response Element (CRE) Activity Mediated by CB2 Cannabinoid Receptor in HEK293 Cells. *Journal of Life Science* **2009**, *19* (11), 1506-1513.
117. Abadji, V.; Lucas-Lenard, J. M.; Chin, C.; Kendall, D. A., Involvement of the Carboxyl Terminus of the Third Intracellular Loop of the Cannabinoid CB1 Receptor in Constitutive Activation of Gs. *Journal of Neurochemistry* **1999**, *72* (5), 2032-38.
118. Bouaboula, M.; Perrachon, S.; Milligan, L.; Canat, X.; Rinaldi-Carmona, M.; Portier, M.; Barth, F.; Calandra, B.; Pecceu, F.; Lupker, J.; Maffrand, J.-P.; Le Fur, G.; Casellas, P., A Selective Inverse Agonist for Central Cannabinoid Receptor Inhibits Mitogen-activated Protein Kinase Activation Stimulated by Insulin or Insulin-like Growth Factor 1: EVIDENCE FOR A NEW MODEL OF RECEPTOR/LIGAND INTERACTIONS. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272* (35), 22330-39.
119. Ross, R. A.; Brockie, H. C.; Stevenson, L. A.; Murphy, V. L.; Templeton, F.; Makriyannis, A.; Pertwee, R. G., Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *British Journal of Pharmacology* **1999**, *126* (3), 665-72.
120. Zheng, C.; Chen, L.; Chen, X.; He, X.; Yang, J.; Shi, Y.; Zhou, N., The Second Intracellular Loop of the Human Cannabinoid CB2 Receptor Governs G Protein Coupling in Coordination with the Carboxyl Terminal Domain. *PLOS ONE* **2013**, *8* (5), e63262.
121. Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L., Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual [Internet]*, Sittampalam, G. S.; Coussens, N. P.; Brimacombe, K. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences **2016**.



- 
122. Cencioni, M. T.; Chiurchiu, V.; Catanzaro, G.; Borsellino, G.; Bernardi, G.; Battistini, L.; Maccarrone, M., Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors. *PLOS ONE* **2010**, *5* (1), e8688.
  123. Yuan, M.; Kiertscher, S. M.; Cheng, Q.; Zoumalan, R.; Tashkin, D. P.; Roth, M. D., Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. *Journal of Neuroimmunology* **2002**, *133* (1-2), 124-31.
  124. Klein, T. W.; Lane, B.; Newton, C. A.; Friedman, H., The cannabinoid system and cytokine network. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **2000**, *225* (1), 1-8.
  125. Do, Y.; McKallip, R. J.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. S., Activation through cannabinoid receptors 1 and 2 on dendritic cells triggers NF-kappaB-dependent apoptosis: novel role for endogenous and exogenous cannabinoids in immunoregulation. *Journal of Immunology* **2004**, *173* (4), 2373-82.
  126. Borner, C.; Smida, M.; Holtt, V.; Schraven, B.; Kraus, J., Cannabinoid receptor type 1- and 2-mediated increase in cyclic AMP inhibits T cell receptor-triggered signaling. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (51), 35450-60.
  127. Guillot, A.; Hamdaoui, N.; Bizy, A.; Zoltani, K.; Souktani, R.; Zafrani, E. S.; Mallat, A.; Lotersztajn, S.; Lafdil, F., Cannabinoid receptor 2 counteracts interleukin-17-induced immune and fibrogenic responses in mouse liver. *Hepatology* **2014**, *59* (1), 296-306.
  128. Klein, T. W., Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature Reviews. Immunology* **2005**, (5), 400-11.
  129. Widomski, D.; Fretland, D. J.; Gasielki, A. F.; Collins, P. W., The prostaglandin analogs, misoprostol and SC-46275, potently inhibit cytokine release from activated human monocytes. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **1997**, *19* (2), 165-74.
  130. Fiebich, B. L.; Munoz, E.; Rose, T.; Weiss, G.; McGregor, G. P., Molecular targets of the antiinflammatory *Harpagophytum procumbens* (devil's claw): inhibition of TNFalpha and COX-2 gene expression by preventing activation of AP-1. *Phytotherapy Research* **2012**, *26* (6), 806-11.
  131. Shahangian, S.; Ash, K. O.; Rollins, D. E., An Enzymatic Method for the Analysis of Formate in Human Plasma. *Journal of Analytical Toxicology* **1984**, *8* (6), 273-276.
  132. Bolarinwa, A. Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung ausgewählter Polyphenole und ihr Einsatz in Humanstudien. Technische Universität München, **2006**.
  133. Kim, I.-H.; Tsai, H.-J.; Nishi, K.; Kasagami, T.; Morisseau, C.; Hammock, B. D., 1,3-Disubstituted Ureas Functionalized with Ether Groups are Potent Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase with Improved Pharmacokinetic Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50* (21), 5217-26.

134. Durand, D. B.; Shaw, J. P.; Bush, M. R.; Replogle, R. E.; Belagaje, R.; Crabtree, G. R., Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Molecular and Cellular Biology* **1988**, *8* (4), 1715-24.
135. Yano, O.; Kanellopoulos, J.; Kieran, M.; Le Bail, O.; Israel, A.; Kourilsky, P., Purification of KBF1, a common factor binding to both H-2 and beta 2-microglobulin enhancers. *The EMBO Journal* **1987**, *6* (11), 3317-24.
136. Schmittgen, T. D.; Livak, K. J., Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **2008**, *3* (6), 1101-08.
137. Noble, P. B.; Cutts, J. H.; Carroll, K. K., Ficoll flotation for the separation of blood leukocyte types. *Blood* **1968**, *31* (1), 66-73.
138. English, D.; Andersen, B. R., Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *Journal of Immunological Methods* **1974**, *5* (3), 249-52.



Nr.	Abkürzung	R <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>	logP	CB1-Bindung [%]	CB2-Bindung [%]	K <sub>i</sub> CB1 [nmol/l]	K <sub>i</sub> CB2 [nmol/l]
31	2-HEC	- pentyl (CBD-Derivate)	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH 2-Hydroxyethyl-	5,21	77,3 ± 6,5	90,3 ± 2,4	3923 ± 1547	374,5 ± 47,7
32	2-HPC		-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> 2-Hydroxypentyl-	6,43	82,0 ± 8,0	83,9 ± 5,6	538,2 ± 53,9	66,7 ± 13,1
33	GCBD		-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> -OH 2,3-Dihydroxypropyl-	4,68	90,2 ± 3,8	101,6 ± 0,5	2174 ± 1149	277,1 ± 78,7
34	CHC		-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> Cyclohexyl-	7,81	92,2 ± 1,7	97,2 ± 3,4	870 ± 100	510 ± 290
35	HC		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> n-Hexyl-	7,28	81,5 ± 6,8	99,2 ± 2,3	2500 ± 900	67 ± 4
36	NMSC		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-SO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> 2-(Methylsulfonamido)ethyl-	3,84	98,9 ± 7,8	104,9 ± 4,8	270 ± 40	12 ± 1
37	2-HECBDV	- propyl (CBDV-Derivate)	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH 2-Hydroxyethyl-	4,38	42,2 ± 9,6	95,0 ± 2,8	5649 ± 3896	168,2 ± 39,4
38	CHCBDV		-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> Cyclohexyl-	6,44	84,9 ± 4,8	99,9 ± 0,1	13,2 ± 0,9	4,62 ± 0,5
39	HCBDV		-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> n-Hexyl-	6,97	93,9 ± 3,7	98,5 ± 2,3	8,3 ± 0,69	9,9 ± 2,5

Nr.	Abkürzung	Wirkung auf CB1	Wirkung auf CB2	Jurkat-T-Zellen		RAW264.7-Makrophagen				Primäre humane Monozyten				
				NF-κB	NFAT	TNF-α	IL-1β	IL-6	CCL2	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α	PGE <sub>2</sub>
31	2-HEC	Antagonist	Agonist	k. E.	↓	Zytotoxische Effekte				↓	↓	k. E.	↓	k. E.
32	2-HPC	Antagonist	Agonist	k. E.	↓	Zytotoxische Effekte				(↓)	↓	(↓)	↓	(↓)
33	GCBD	Antagonist	Agonist	k. E.	↓	Zytotoxische Effekte				↓	↓	↑	↓	k. E.
34	CHC	Agonist	Agonist	k. E.	k. E.	(↓)	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓	k. E.
35	HC	Antagonist	Keine Aktivität	(↓)	k. E.	(↓)	↓	(↓)	↓	↓	↓	↓	↓	k. E.
36	NMSC	Antagonist	Agonist	↓	↓	(↓)	↓↑	↑	↓	↑	k. E.	↓	↓	↓
37	2-HECBDV	Antagonist	Agonist	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	CHCBDV	Agonist	Agonist	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	HCBDV	Agonist	Keine Aktivität	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

k. E.: kein Effekt