



Synthesen von Liganden zur
Entwicklung eines in vitro Assays zur
Untersuchung der Bindung an Humanem Serum-
Albumin

Dissertation

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

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

Lea Wenskowsky
geboren in Mainz

Mainz, 2018

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02. 2019

Die vorliegende Arbeit wurde
in der Zeit von Juli 2014 bis Dezember 2018
am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
unter Betreuung von [REDACTED] in Kooperation mit der Sanofi-Aventis
Deutschland GmbH (Industriepark Höchst, Frankfurt) unter Betreuung von [REDACTED]
[REDACTED] angefertigt.

Ein Teil der Arbeit wurde im Arbeitskreis von [REDACTED] an der University
of Texas at Austin, USA von Juli 2017 bis Januar 2018 durchgeführt.

„ES IST SCHWIERIGER EINE VORGEFASSTE MEINUNG
ZU ZERTRÜMMERN ALS EIN ATOM.“

ALBERT EINSTEIN (*14. MÄRZ 1879, †18. APRIL 1955)

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	III
Bemerkungen.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Humanes Serum-Albumin – Allgemeines	1
1.2 Bindung endo- und exogener Substanzen.....	5
1.3 Methoden zur Untersuchung von Bindung an HSA	17
1.4 Diagnostische, therapeutische und sensorische Anwendungen von HSA.....	17
1.5 Vorarbeiten	19
2. Zielsetzung	21
3. Allgemeiner Teil	23
3.1 Evaluierung der Literaturdaten zur NBD-markierten Fettsäure und Methodenvalidierung	23
3.2 Synthese und Bindestudien von Sulfasalazin-Derivaten zur Erstellung einer Struktur-Affinitäts-Beziehung	48
3.3 Entwicklung eines trichromatischen Fluoreszenzassays	70
3.4 Anwendung spezifischer, fluoreszierender Binder zur Untersuchung der Albuminbindung in Sudlow-Site I und II	118
3.5 Versuche zur Entwicklung eines Site-spezifischen Sensors für glykierte HSA	137
4. Zusammenfassung und Ausblick	153
5. Experimenteller Teil.....	167
5.1 Allgemeines, Messgeräte und Methoden—synthetischer Teil	167
5.2 Allgemeines, Messgeräte und Methoden—biochemischer Teil	173
5.3 Radiochemische Synthesen	177
5.4 Synthese der Sulfasalazin-Derivate	179
5.5 Synthese der BODIPY-Farbstoffe und Cumarin-Derivate	221

5.6	Versuche zur Synthese Boronsäure-funktionalisierter Sulfasalazin-Derivate	241
5.7	Biochemische Experimente	264
6.	Literaturverzeichnis	279
7.	Spektrenanhang.....	295
8.	Kristallstrukturanalysen	363
9.	Danksagung	403

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Es wurden nur die Quellen und Hilfsmittel verwendet, die in der Arbeit angegeben sind. Ich versichere, dass alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht wurden.

(Lea Wenskowsky)

Bemerkungen

Mitwirkende Personen:

Die radiochemischen Synthesen der Tritium-markierten Fettsäuren wurden von [REDACTED] (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Industriepark Höchst, Frankfurt) durchgeführt. In Zusammenarbeit mit [REDACTED] (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Industriepark Höchst, Frankfurt) wurden die radioaktiven Gleichgewichtsdialysen durchgeführt. [REDACTED] unterstützte mich im Rahmen ihres Master-Forschungsmoduls in der Organischen Chemie in der Synthese der Azofarbstoff-Grundkörper. Die Reinigungen der Sulfasalazin- und Warfarin-Derivate mittels HPLC wurden von [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] (alle Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Industriepark Höchst, Frankfurt) durchgeführt. Die Auswertung der NMR-Spektren der Warfarin-Derivate wurde von [REDACTED] (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Industriepark Höchst, Frankfurt) durchgeführt. Die Bilder von den Kristallstrukturen von HSA und molekulares Modelling wurden von [REDACTED] (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Industriepark Höchst, Frankfurt) erstellt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

L. Wenskowsky, H. Schreuder, V. Derdau, H. Matter, J. Volkmar, M. Nazaré, T. Opatz, S. Petry: "Identification and Characterization of a Single High-Affinity Fatty Acid Binding Site in Human Serum Albumin", *Angew. Chem.* **2018**, 57, 4, 1044–1048.

Abkürzungsverzeichnis

$\lambda_{\text{em}}/\lambda_{\text{exc}}$	Emissionswellenlänge/Anregungswellenlänge
μ	mikro (10^{-6})
χ_{HSA}	Stoffmengenanteil von humanem Serum-Albumin
AcOH	Essigsäure
äq.	Äquivalent(e)
Arg	Arginin
AU	Arbitrary Unit
AZT	3'-Azido-2', 3'-didesoxythymidin
ber.	berechnet
Bq	Bequerel
BSA	Bovine Serum-Albumin
<i>c</i>	Konzentration
^cHex	Cyclohexan
Ci	Curie
COSY	Correlation Spectroscopy
Cys	Cystein
δ	chemische Verschiebung
d	Tage (in Reaktionsgleichungen)
d, dd, ddd	Dublett, Dublett vom Dublett, Dublett vom Dublett von Dubletts (NMR)
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DPBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	et alii
FA	Ameisensäure
FABS	Bindestelle für Fettsäuren
FDA	Federal Drug Administration
FI	Fluoreszenzintensität
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
G	Giga

Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde(n)
HDPE	hochdichtes Polyethylen
HFABS	Hochaffine Bindestelle für Fettsäuren
His	Histidin
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPAC	High Performance Affinity Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSA	Humanes Serum-Albumin
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IR	Infrarot
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
K_I	Inhibitionskonstante
konz.	Konzentriert
LCFA	Langkettige Fettsäuren (long chain fatty acids)
Lit.	Literatur(wert)
Lys	Lysin
m	Multiplett (NMR)/milli (bei Konzentrationen)
M	Molarität
MCFA	Mittelkettige Fettsäuren (medium chain fatty acids)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
NBS	N-Bromsuccinimid
neg.	negativ

NEt₃	Triethylamin
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PE	Petrolether
Phe	Phenylalanin
pos.	positiv
ppm	parts per million
PTFE	Polytetrafluorethylen
q	Quartett (NMR)
quint	Quintett (NMR)
RED	Rapid Equilibrium Dialysis
ROESY	Rotating-frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
rt	Raumtemperatur
RCY	zerfallskorrigierte radiochemische Ausbeute
R_f	ratio of fronts
rpm	rounds per minute
s	Singulett (NMR)
s_{br}	breites Singulett
SEC	Size Exclusion Chromatography
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
subst.	substituiert
t	Zeit
T	Tritium
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TOCSY-HSQC	Total correlated Spectroscopy
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Vol%	Volumenprozent
wt%	Gewichtsprozent

1. Einleitung

1.1 Humanes Serum-Albumin – Allgemeines

Der Begriff Albumin leitet sich aus dem Lateinischen (*albus*: weiß) ab und umfasst eine Gruppe heterogener Proteine^[1] (Eiweiße). Ein bedeutender Vertreter dieser Gruppe ist humanes Serum-Albumin (HSA), ein extrazelluläres Protein mit vielfältigen Funktionen.^[1-20] Beschrieben wurde es erstmals von *Ancell*^[21] im Jahr 1839, als dieser über „[...] the function and disease of the liver“ berichtete. Das Protein trägt beim gesunden Menschen zu ca. 50% des gesamten Plasmaproteinhaushalts^[1, 3] bei und wird in den Hepatozyten (0.2 g/Tag/kg Körpergewicht)^[22] gebildet.^[1-3, 9] Da lediglich 20–30% der Hepatozyten HSA bilden, kann im Notfall die Produktion bedeutend gesteigert (200–300%)^[1, 23] werden. Die Syntheserate variiert mit dem Hormon-, Ernährungs- und metabolischen Status.^[2-3] Bei Krankheiten wie bpsw. Leberzirrhose, Krebs, Diabetes mellitus, schwerer Sepsis, nephrotischem Syndrom und bei Unterernährung wird eine Hypoalbuminämie beobachtet.^[1-3, 24-25] Gleichzeitig halbiert sich die Halbwertszeit auf neun Tage.^[3] In der Diagnostik werden Veränderungen der Serumkonzentration als Indikator für Krankheiten verwendet.^[1, 26]

In humanem Blutserum ist Serum-Albumin mit 35–50 g/L (0.6 mM)^[23] einer der Hauptbestandteile.^[27] Insgesamt betrachtet entspricht dies 30–42% des Gesamtalbumins im menschlichen Körper.^[2-3] Den Hauptspeicherort stellen die Muskulatur und die Haut dar.^[1, 3, 24] Nach der Sekretion aus den Hepatozyten binden ca. 50% des Proteins an den auf der Plasmamembran des kontinuierlichen Endothels exprimierten Rezeptor Albondin.^[2, 17, 28-31] Nach der Aufnahme in die Zelle wird das Protein in einem Vesikel durch die Zelle transportiert und in den extrazellulären Raum geleitet.^[2] Dieser Prozess wird durch Glykosylierung oder durch Bindung langkettiger Fettsäuren beschleunigt.^[2] Der Abbau des Proteins (0.2 g/Tag/kg Körpergewicht)^[1-2, 32] erfolgt primär (40–60%) in der Leber, den Nieren sowie in der Muskulatur^[3] und wird durch die Bindung langkettiger Fettsäuren verzögert.^[2] Die unterschiedlich berichteten Halbwertszeiten von HSA variieren zwischen 15 und 20 Tagen.^[3, 23-24, 33] Diese lange Halbwertszeit lässt sich nach *Anderson* durch die Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor erklären.^[4, 34-36] Dieser Rezeptor, der auch IgGs (Immunoglobulin G) bindet und auf den Endothelzellen sowie Zellen der Nieren und Leber exprimiert ist,^[34] bindet HSA pH-abhängig^[34] und schützt vor dem lysosomalen Abbau in Hepatozyten.^[4, 34-36]

Das im Vergleich zu anderen Plasmaglobulinen relativ kleine Protein besteht aus 585 Aminosäuren und hat ein Molgewicht von 66.5 kDa.^[23, 37] Die Entschlüsselung der Aminosäuresequenz stellte einen zentralen Baustein in der Untersuchung der Bindungs- und Transporteigenschaften von HSA dar.^[37] Mehrere Gruppen beschäftigten sich mit der Sequenzierung von HSA.^[38-40] Schließlich gelang es der Forschungsgruppe um *Kostka*^[37] erstmals die komplette Aminosäuresequenz von HSA zu entschlüsseln. Von *Brown*,^[41] *Pederson*,^[42] *Weber*^[43] und *Bloomfield*^[44] wurden verschiedene Modelle zum Aufbau von HSA postuliert. *Carter*^[45] publizierte 1992 die erste hochaufgelöste Kristallstruktur von entfettetem HSA (Wildtyp: 3.1 Å; Rekombinant: 2.8 Å). Abbildung 1 zeigt die Kristallstruktur von fettfreier HSA.

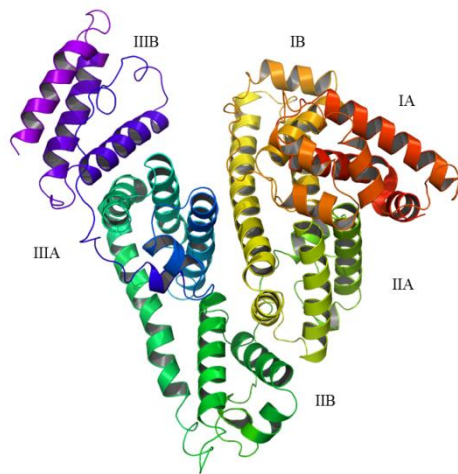


Abbildung 1: Kristallstruktur von fettfreier HSA (PDB^[46] Code: 1uor^[45], Auflösung: 2.8 Å).

Topologisch zeigen sich drei homologe Domänen (I, II, III), die aus je zwei Subdomänen (A, B) wiederum bestehend aus insgesamt zehn α -Helices gebildet werden.^[4, 47-48] Die Tertiärstruktur ist herzförmig und besteht zu 67% aus α -Helices. β -Faltblattstrukturen werden nicht beschrieben.^[4, 17, 23, 34, 45] Die Subdomänen werden durch Polypeptidketten verbunden. Dabei besitzt Subdomäne IA (Lys-106–Glu-199) im Vergleich zu IIA (Glu-292–Val-315) und IIIA (Glu-492–Ala-511) eine deutlich ausgedehntere Polypeptidkette, wodurch aufgrund der verringerten Wechselwirkungen keine Bindetasche geformt werden kann. Das einzige Tryptophan (Trp-214) von HSA ist maßgeblich an der Bildung der Bindestelle in Subdomäne IIA beteiligt. Es limitiert nicht nur den Eintritt von Lösungsmittel in die Bindetasche, sondern trägt zu der hydrophoben Wechselwirkung an der Verbindungsstelle zwischen Subdomäne IIA und IIIA bei. Eine besondere Rolle für die Tertiärstruktur nehmen die 17 Disulfidbrücken ein, die überwiegend α -Helices verbinden und so zu deren Verzerrung führen.^[45] Aufgrund der Stärke von Disulfidbrücken kann nach dem Bruch einer solchen Bindung die ursprüngliche

Konformation wieder hergestellt und die Bindung erneut geknüpft werden.^[2] Cystein-34 ist das einzige freie, reaktive Thiol in HSA, das im Blut zu 70% reduziert vorliegt.^[8, 37, 49-51] Untersuchungen zeigen, dass das Thiol *in vivo* nitrosiert^[52-55] oder alkyliert werden kann.^[3, 8] So liegt im menschlichen Blut ca. 82% Stickstoffmonoxid (7 μM) in Form des S-Nitrosothiols gebunden vor,^[1, 23] wodurch HSA ein Depot für den vasodilatatorisch wirkenden Neuromodulator darstellt.^[17, 56-57] Die Oxidation und Bildung unnatürlicher Disulfide durch Reaktion mit z.B. Homocystein oder Glutathion^[1, 58] wird v.a. bei Krankheiten mit oxidativem Stress und im Alter beobachtet.^[3, 8, 59-60] Eine Dimerbildung ist in der Natur untypisch und tritt bevorzugt bei der Reinigung und Lagerung von HSA *ex vivo* auf.^[3]

HSA wird als einziges Plasmaprotein unter physiologischen Bedingungen nicht glykosyliert, bedingt durch das Fehlen des Tripeptids Asn-X-Ser/Thr (X: beliebige Aminosäure, außer Prolin), das für die Erkennung durch eine Oligosaccharyltransferase notwendig ist, und trägt keine prosthetischen Gruppen.^[1, 3, 23, 61-62] Bei Patienten mit Diabetes mellitus wird eine deutlich erhöhte Nüchtern-Plasmaglukose (≤ 7 mM) beschrieben, wodurch eine vermehrte Glykierung von HSA beobachtet wird. Dies führt zu einer Exposition hydrophober Regionen des Proteins.^[1, 8, 63] Unter oxidativem Stress, induziert mit Chloramin-T oder durch metallkatalysierte Oxidation (FeCl_2 , Sauerstoff und Natriumascorbat), werden hydrophobe Regionen durch Konformationsänderungen, primär in Subdomäne IIIA, exponiert.^[64]

Ob HSA in Lösung in einer ellipsoiden oder herzförmigen Konformation vorliegt, wird in der Literatur diskutiert.^[3-4, 23, 65-75] Die thermische Stabilität wurde in einem Phosphatpuffer überprüft, wobei bis zu einer Temperatur von 59.7–64.6 °C keine Denaturierung beobachtet wurde.^[76-79] Eine Denaturierung des Proteins wurde nur unter harschen, nicht-physiologischen Bedingungen, die den Zusatz chemischer Reagenzien, Veränderungen des pH-Wertes oder der Temperatur betreffen, beschrieben.^[2, 80]

Unter physiologischen Bedingungen weist das Protein 19 negative Ladungen auf und trägt entscheidend zur Regulierung des pH-Wertes im Blut bei. Nimmt die Plasmakonzentration ab, kann dies zu metabolischer Alkalose führen.^[2] Durch seinen hohen Anteil am Plasmaproteinhaushalt trägt HSA zu ca. 75% zum kolloidosmotischen Druck (25 mmHg) bei.^[1-4, 8, 23] Wenn dieser Druck fällt, wird das Protein sofort in der Leber nachsynthetisiert.^[2, 23] Bei bspw. großen Blutverlusten nach Operationen oder hämorrhagischem Schock werden HSA-Infusionen verabreicht, um das Volumen bzw. die Konzentration an HSA zu steigern und somit den kolloidosmotischen Druck wieder

zu erhöhen.^[1, 81-84] Durch die Bindung im Interstitium beeinflusst HSA auch die Permeabilität von Gefäßen.^[3, 26]

Cys-34 in HSA stellt den größten Anteil an freiem Thiol im menschlichen Blut dar und leistet als Radikalfänger einen wichtigen Beitrag zur antioxidativen Wirkung.^[1-2, 11, 85-86]

Weiterhin fungieren einige Methionine (Met-89, Met-298, Met-329, Met-548) als Chelatoren für Metallionen.^[86-87] Indirekt antioxidativ wirkt HSA durch die Bindung von Metaboliten wie Oxysterol und Bilirubin, die dadurch langsamer an die Zellen abgegeben werden.^[1, 88] Eine Forschergruppe um Antonoglou^[89] berichtet bei HSA bezogen auf Dihydrotestosteron von einer Enolase-Aktivität.

Durch das fehlende Kohlenhydratgerüst kann HSA leicht acetyliert werden.^[1, 90-91] Bei therapeutischen Konzentrationen von Acetylsalicylsäure (Aspirin[®]) wird die Acetylierung von Lys-199, Lys-402, Lys-519 und Lys-545 beschrieben.^[1, 12, 90-92] Die dadurch erhöhte Bindungsaffinität von Phenylbutazon (**1**) kann sich auf die Pharmakokinetik und letztlich auf die Pharmakodynamik des Wirkstoffes auswirken.^[1] Überempfindlichkeiten gegenüber Penicillinen werden auch aufgrund der irreversiblen Modifizierung von Lysinen vermutet.^[2, 12, 93]

Die von HSA beschriebene Esterase-Aktivität kann z.B. zur Freisetzung von Wirkstoffen aus Prodrugs genutzt werden. Als Beispiel kann Olmesartan, das durch die Hydrolyse von Olmesartanmedoxomil gebildet wird, genannt werden.^[9, 94] Bei oxidativem Stress ist diese Esterase-Aktivität erniedrigt.^[64]

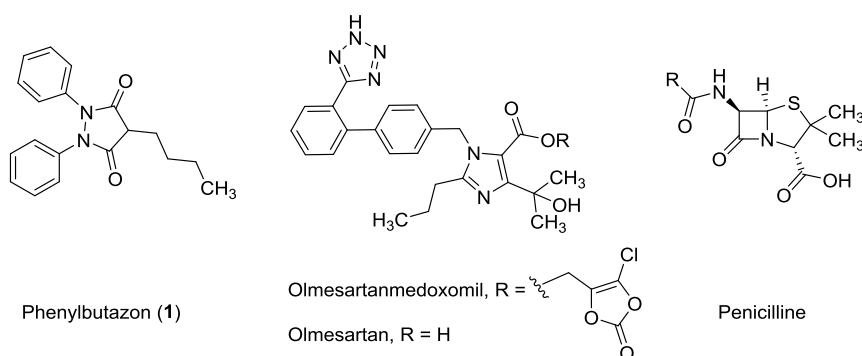


Abbildung 2: Strukturen von Phenylbutazon (**1**), Olmesartan, Olmesartanmedoxomil und Penicillinen.

Ob die Acetylierung von HSA *in vivo* Auswirkungen auf die biologische Funktion des Proteins hat, ist bisher nicht vollständig geklärt.^[1] Daher ist die Aktivierung von Prodrugs durch HSA vorerst kritisch zu beurteilen.

Eine wichtige Aufgabe von HSA ist die Bindung und der Transport von Substanzen endogener und exogener Herkunft.^[1, 3-4, 7-9, 34, 95-97] Hierauf wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.2 Bindung endo- und exogener Substanzen

HSA ist ein flexibles Plasmaprotein mit der besonderen Fähigkeit, die Konformation abhängig vom Liganden zu adaptieren.^[2-4, 6, 11, 17, 34, 71, 96, 98] Innerhalb der Bindestellen können Seitenketten einzelner Aminosäuren aufgrund der schwachen intrahelikalen Kräfte verschiedene Konformationen mit nahezu gleichem Energieinhalt annehmen.^[96] Durch die Bindung eines Liganden wird die Konformation mit der größtmöglichen Interaktion zwischen Ligand und Protein stabilisiert.^[96] Dies spiegelt sich auch in der Diversität gebundener Liganden wieder,^[1, 7, 23, 27, 34, 97, 99] die mit hoher Affinität reversibel, teils auch kovalent, gebunden werden können.^[7] HSA bindet besonders neutrale und negativ geladene, hydrophobe Substanzen von mittlerer Größe, aber auch die hochaffine Bindung schwach basischer Verbindungen wie Diazepam wird beschrieben.^[1-2, 27, 45, 100] Beispiele für unter physiologischen Bedingungen gebundene Substanzen sind Wirk- und Arzneistoffe,^[100-102] Metabolite (Bilirubin, Indoxylsulfat),^[4, 72, 103-106] Hormone (Thyroxin, Cortisol, Estron, Estradiol, Testosteron, Progesteron),^[2, 23, 70, 97] Peptide^[107] und Proteine (Apolipoproteine, Hämoglobin, Transferrin),^[1, 11, 108] Fettsäuren^[100] und Metallkationen^[1-2, 4, 23, 97, 109-113] (z.B. Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+}). Für Thyroxin, Vitamin D und Steroide^[2] ist HSA lediglich als sekundärer bzw. tertiärer Transporter physiologisch relevant.^[23] Die Substanzen werden mit hoher Kapazität weniger affin gebunden, können dadurch aber leichter am Zielort abgeladen werden.^[2] Um die strukturelle Vielfalt gebundener Liganden zu veranschaulichen, sind einige dieser Substanzen exemplarisch in Abbildung 3 gezeigt.

Durch die Bindung und den Transport trägt HSA nicht nur zur verbesserten Löslichkeit lipophiler Substanzen bei,^[1, 9, 97] sondern schützt gebundene Liganden auch vor Oxidation^[9] und beeinflusst deren Pharmakokinetik.^[1-2, 17, 107, 114] Durch das unterschiedliche Ausmaß der Proteinbindung werden die Verteilung, Wirksamkeit, Metabolismus und Ausscheidung endogener und exogener Stoffe reguliert.^[3, 12, 23] Da die Bindung von Toxinen und Metaboliten die Entgiftung fördert,^[9, 12, 17, 115] wird HSA in der Dialyse (MARS: Molecular Adsorbent Recirculating System) eingesetzt.^[9] MARS ist eine zellfreie Methode, die zur Unterstützung der Leber eingesetzt wird. Diese Methode ermöglicht die Entfernung albuminbindender Substanzen (z.B. Lipopolysaccharide, Xenobiotika, Chemokine, Toxine)^[3] und überschüssigen Wassers aus dem menschlichen Körper, wodurch eine Verbesserung der Leber- und Nierenfunktion erzielt werden kann.^[9, 116-117]

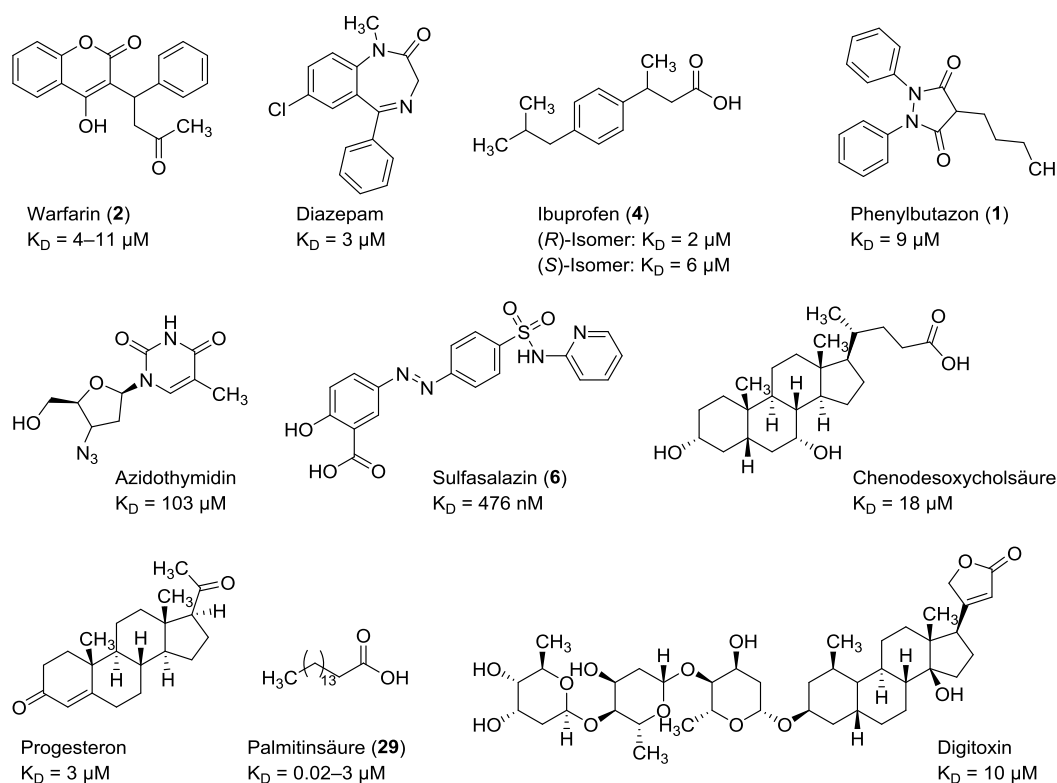


Abbildung 3: Beispiele für von HSA gebundene Liganden mit Dissoziationskonstanten.^[23, 118-128]

HSA findet auch in der Behandlung des nephrotischen Syndroms Anwendung.^[34] Hierbei wird HSA aufgrund der erhöhten Proteinurie substituiert. Die Bindeeigenschaften und somit auch die freie Plasmakonzentration einer Substanz werden durch physiologische und pathologische Gegebenheiten wie Krankheit (Diabetes mellitus, Leberkrankheiten, Nephropathie, Krebs, Urämie),^[8, 105, 129-130] Geschlecht, Alter und genetische Aspekte beeinflusst.^[5, 12, 19, 64, 114, 131] Dabei wird je nach Verbindung und Modifikation des Proteins (Glykierung,^[132-133] Bildung von Disulfiden, Gehalt an Carbonylgruppen) eine erhöhte, verminderte oder unveränderte Proteinbindung beschrieben.^[1, 8, 129-130] Dieser Aspekt ist für stark gebundene Substanzen (Proteinbindung >90%)^[1] von großer Bedeutung, da nur die ungebundene Substanz *in vivo* pharmakologisch aktiv ist und erwünschte oder auch toxische Effekte hervorrufen kann.^[1, 18, 27] Das Wissen über das Ausmaß der Proteinbindung ist somit von zentraler Bedeutung. Je nach Wirkstoff und Zielstruktur kann eine starke Plasmaproteinbindung, die zu einer niedrigen freien Serumkonzentration führt, im Bezug auf die Wirksamkeit sinnvoll oder von Nachteil sein.^[1-2, 18] Das Ausmaß der Proteinbindung ist abhängig von der Bindungsaffinität des Liganden, von der Anzahl der Bindestellen, die besetzt werden können, und von der Konzentration des Liganden bzw. des Proteins.^[1, 5, 19, 27, 131]

Nach einigen Studien ist die Bindung an HSA auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen.^[96, 134-135] In Elektrophorese- und Bindestudien, teilweise mit an kationischen Seitenketten modifizierter HSA (mit Formaldehyd, Acetanhydrid, oder *O*-Methylisoharnstoff), wurden elektrostatische Wechselwirkungen^[96, 135-136] (π - π -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen) beobachtet.

Die Funktionen von HSA sowie HSA/Ligand-Wechselwirkungen werden bereits lange in der Literatur diskutiert. Dies ist auch anhand der Vielzahl an bisher erschienen Übersichtsartikeln zu erkennen.^[1, 3-20, 96-97, 135]

Ein Verständnis über den Aufbau, die Größe und die Lokalisation der Bindestellen von HSA ist enorm wichtig, um Bindung an diesem Protein allgemein zu verstehen.^[95] Daten aus Binde- und Kompetitionsstudien können zur Vorhersage von Wechselwirkungen zwischen Liganden genutzt werden, die sich auf den Metabolismus, die Bindung im Gewebe und/oder die renale Ausscheidung auswirken können.^[1, 95] Das Wissen über die Proteinbindestellen und mögliche Interaktionen ist für das Design und die Entwicklung neuer Arzneistoffe von Bedeutung, um deren Pharmakokinetik zu untersuchen und geeignete Patientengruppen und Dosisempfehlungen auszusprechen.^[1] Um Ergebnisse verschiedener Studien miteinander vergleichen zu können, müssen die experimentellen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, Albuminspezies, Pufferzusammensetzung) bekannt sein.^[2] Für Studien an HSA wurden bereits diverse Methoden angewandt.

Die HPAC (High Performance Affinity Chromatography) ist eine biochromatographische Methode, die erstmals 1973 von *Stewart et al.*^[137] zur enantioselektiven Trennung von racemischem Tryptophan an BSA beschrieben wurde, und für Enantiomerentrennungen^[138] oder Bindestudien an Proteinen wie HSA eingesetzt wird.^[126, 139-147] HSA wird hierbei als stationäre Phase über eine oder mehrere Amino-, Carboxyl- oder Sulfhydrylgruppen an eine Matrix gebunden.^[9] Die Bindestellen bleiben von der Immobilisierung unberührt.^[148] Die Retentionszeit des Analyten korreliert direkt mit der Bindeaffinität und durch den automatisierten Prozess wird die Variation zwischen den einzelnen Läufen minimiert. Die Methode wird als schnell, reproduzierbar, präzise sowie sensitiv beschrieben^[12] und zeigt eine sehr gute Übereinstimmung zu mittels Ultrafiltration^[12, 140, 142, 149] erhobenen Daten.

Auch spektroskopische Methoden wie UV/VIS-Differenzspektroskopie,^[102, 105, 150-159] Fluoreszenzspektroskopie,^[11, 95, 99-100, 102, 127, 134, 136, 150, 153, 157-187] Circular Dichroismus,^[12, 95, 99, 134, 150, 162, 164-166, 170, 185, 188-198] Infrarotspektroskopie^[170, 175-176, 184, 196, 199] und Elektronenspinresonanzspektroskopie^[163] wurden für Binde- und Kompetitionsstudien an

HSA eingesetzt. Tryptophan-214 macht HSA für FRET-Experimente (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) interessant.^[95-96, 162-163, 175, 178, 184] Als Fluoreszenzlabel dienen z.B. Dansyl (5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl),^[134, 173-174, 179-181, 200-203] NBD (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)^[120, 182, 199, 204] oder Fluorescein,^[182, 205-208] die zur Fluoreszenzmarkierung des Proteins oder HSA-bindender Substanzen, die als Kompetitor in Bindestudien geeignet sind, verwendet werden können.

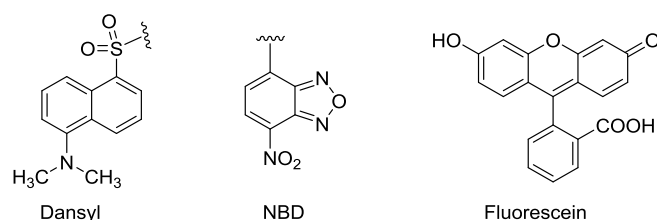


Abbildung 4: Strukturen von den Fluoreszenzlabeln Dansyl, NBD und Fluorescein.

Die CD-Spektroskopie wurde erstmals 1970 von *Rosen* für Bindestudien von Phenylbutazon (**1**) und Oxyphenbutazon an HSA angewandt.^[190] Allgemein wird ihre Anwendbarkeit für Binde- und Kompetitionsstudien an (modifizierten) Proteinen, Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen zwei Liganden sowie Konformationsstudien von Testsubstanzen oder Proteinen beschrieben.^[12] Experimente sind mit chiralen und achiralen Substanzen möglich, da bei achiralen Liganden das CD-Signal durch die Interaktion zwischen Protein und Chromophor induziert wird.^[12] Die Methode liefert Erkenntnisse über die Konformation des Liganden sowie über eventuelle Konformationsänderungen des Proteins. Da bei sekundären Bindestellen bei Benzodiazepinen kein Signal beobachtet wurde, wird die Methode zur Untersuchung hochaffiner Bindestellen und der Enantioselektivität chiraler Substanzen bevorzugt.^[12]

Charakteristische Amid-Banden^[209-212] von Proteinen werden beschrieben, die zur Untersuchung von Ligand/Protein-Wechselwirkungen und Veränderungen der Sekundärstruktur mittels IR-Spektroskopie verwendet werden können.^[175-176, 184, 196, 213]

^[170]Fragmente von (Sub)domänen wurden durch proteolytische Spaltung von aus Bakterien oder Hefe exprimierter HSA erhalten und zur strukturellen Untersuchung mittels Kernspinresonanzspektroskopie^[214-216] (engl.: Nuclear Magnetic Resonance, kurz: NMR), Identifizierung spezifischer Bindestellen und Bindestudien an HSA verwendet.^[95, 150, 195, 217-223] Auch durch Mutagenese^[4, 13, 103, 194, 216, 224-225] modifiziertes HSA wurde in Bindestudien eingesetzt. Strukturelle Modifikationen und Fragmentierungen durch Proteolyse müssen mit Vorsicht durchgeführt werden, da sie sich auf die Struktur, Stabilität und Bindeeigenschaften von HSA auswirken können.^[4, 72] So wurde eine

verminderte Bindungsaffinität von Warfarin (2) an HSA-Mutanten beobachtet.^[224] NMR-Spektroskopische Untersuchungen (^{13}C , ^{15}N , 2D-Experimente) wurden für Binde- und Kompetitionsstudien mit isotoopenmarkierten Substanzen durchgeführt.^[13, 198, 216, 226-229]

Die Gleichgewichtsdialyse ist eine klassische Methode für Bindestudien an Proteinen.^[100, 105, 122, 134, 160, 164, 166-167, 189, 195, 197, 230-236] Bei diesem analytischen Verfahren wird eine

Dialysezelle verwendet, die in zwei Kompartimente unterteilt ist. Eine permeable Membran trennt die beiden Kompartimente voneinander.^[237] Die Permeabilität der Membran wird durch den MWCO (Molecular Weight Cut-Off) bestimmt. Dieser Wert gibt an, bis zu welchem Molekulargewicht Substanzen die Membran passieren können.^[238] Vor Beginn des Experiments wird ein Kompartiment mit der Proteinelösung befüllt, das andere Kompartiment mit der Lösung der Substanz (Abbildung 5).^[237] Nach der Gleichgewichtseinstellung wird zur quantitativen Analyse z.B. die Messung der Radioaktivität, Atomabsorption oder Fluoreszenz durchgeführt.^[237, 239]

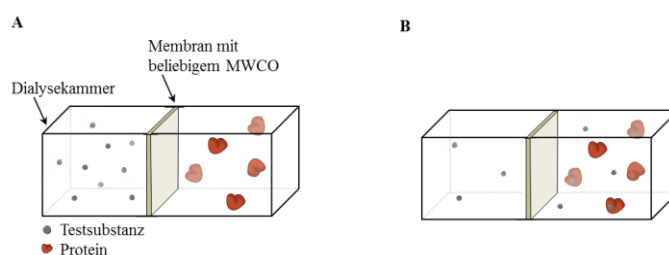


Abbildung 5: Aufbau einer Gleichgewichtsdialyse am Beispiel für Proteine: A) System zum Zeitpunkt $t = 0$. B) System im Gleichgewicht.

Neben den bisher beschriebenen Methoden wurden Gelfiltration,^[151, 188, 240-241] enzymatische Oxidation,^[104] Kapillarelektrophorese,^[196] Ultrafiltration,^[97, 118, 134, 146, 151, 194, 223, 230, 240, 242-246] isotherme Titrationskalorimetrie^[152, 199, 247] (ITC), Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie,^[107, 248] Modelling,^[99, 169, 184] Verteilungsanalysen^[27, 97, 124, 249-251] und Massenspektrometrie^[252-253] für Studien an HSA verwendet.

Proteinkristallisation ist eine vielfach angewandte Methode für Bindestudien endogener und exogener Substanzen an HSA.^[10, 70-72, 98, 168, 201-202, 216, 254-259] Neben nativem wurde auch rekombinantes HSA verwendet. Nach Curry besteht in der Verwendung von aus Hefe exprimierter HSA der Vorteil, dass das eingesetzte Protein homogen ist (kein Polymorphismus oder Glykierung).^[4] Der erhöhte Anteil an dimerem HSA (5–20%) wird mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) abgetrennt, um qualitativ hochwertige Kristalle zu erhalten.^[255, 259] In der Proteinkristallographie wird zwischen zwei verschiedenen Methoden unterschieden, die unter dem Namen Soaking und

Cokristallisation bekannt sind. Beim Soaking werden HSA-Kristalle mit der Lösung eines Liganden versetzt, damit dieser Ligand im HSA-Kristall, ermöglicht durch die Lösungsmittelkanäle im Proteinkristall, binden kann. Voraussetzung hierfür ist die Zugänglichkeit der Bindetasche. Die Methode ist auf kleinere bis mittlere Moleküle limitiert, da größere Liganden aufgrund sterischer Hinderung oder reduzierter Flexibilität im Kristall nicht gebunden werden können. Eine Ausnahme stellt Iodipamid dar,^[10] das Curry zufolge vermutlich aufgrund seiner Flexibilität an HSA bindet.^[4]

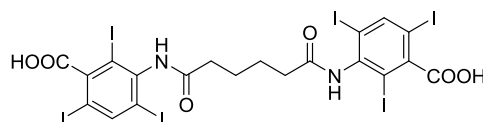


Abbildung 6: Struktur von Iodipamid.

Das Sitting-Drop- und das Hanging-Drop-Verfahren sind zwei bekannte Techniken, die auf dem Prinzip der Dampfdiffusion basieren (Abbildung 7) und zur Cokristallisation Anwendung finden. Beim Hanging-Drop-Verfahren wird ein Tropfen einer hochkonzentrierten Proteinlösung auf ein Glasplättchen gegeben und mit dem gleichen Volumen einer Fällungslösung (Präzipitans), bestehend aus z.B. PEG-3350, Glycerol und Phosphat-Puffer,^[239] überschichtet. Ein kreisförmig mit Silikon beschichtetes Well, das das Präzipitans in höher konzentrierter Form enthält, wird mit dem zuvor vorbereiteten Glasplättchen verschlossen, damit sich aufgrund des bestehenden Konzentrationsgradienten langsam ein Gleichgewicht zwischen dem Tropfen und dem Präzipitans einstellen kann. Durch die Diffusion des Wassers aus dem Tropfen in die Gasphase steigt die Konzentration der Proteinlösung an. Dies kann unter optimalen Bedingungen zur Einkristallbildung führen.^[260-262] Die Sitting-Drop-Methode erfolgt nach dem gleichen Verfahren, während der Tropfen nicht an einem Glasplättchen hängt, sondern auf einem Träger sitzt.^[263]

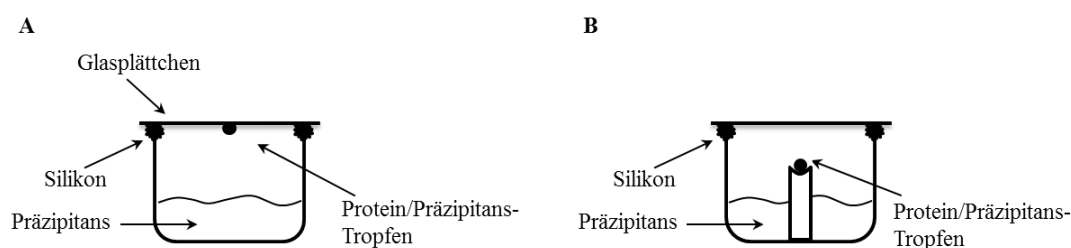


Abbildung 7: Hanging-Drop- und Sitting-Drop-Verfahren zur Proteinkristallisation.

Strukturinformationen kombiniert mit Daten aus Bindestudien könnten zur Entwicklung quantitativer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (Structure Activity Relationship, kurz: SAR) genutzt werden und bedeutende Informationen für Vorhersagen liefern, ob bzw. wie neue Wirkstoffe von HSA gebunden werden.^[4, 264]

Erste Versuche zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten (nano-, miko-, millimolar) wurden von der Arbeitsgruppe *Kratochwil* berichtet. Auf Basis experimentell ermittelter Verteilungskoeffizienten zwischen Wasser und Octanol kombiniert mit publizierten Assoziationskonstanten aus Gleichgewichtsdialysen, HPAC, u.a. sollte ein Vorhersage-Tool für Bindungsaffinitäten entwickelt werden.^[27] Mit ihrer Methode gelang den Autoren jedoch lediglich die Differenzierung zwischen submikromolaren und nanomolaren Bindern.

HSA wird als wichtiger Transporter von Fettsäuren beschrieben,^[4, 45, 265] die z.B. aus Adipozyten^[96, 266-267] oder von der Lipoproteinlipase^[96, 268-269] freigesetzt wurden. Physiologisch werden 0.1–2 mol Fettsäuren pro mol HSA gebunden,^[11, 23, 71, 96, 126, 135, 226] die zu 70–90%^[96, 234, 270] aus Palmitin- und Oleinsäure bestehen. Die Konzentration an sogenannten freien Fettsäuren im Blut wird bspw. durch den Ernährungsstatus und die physische Aktivität beeinflusst.^[135] Bei Krankheiten wie Diabetes mellitus wird von bis zu 6 mol Fettsäuren pro mol HSA berichtet.^[126, 226, 271-273] Die Bindung von Fettsäuren an HSA induziert nach einigen Studien^[71, 174, 252, 259] Konformationsänderungen, deren Ausmaß durch die Kettenlänge und die Anzahl an Doppelbindungen^[172] bestimmt wird. Dabei wird von einer Rotation der Domänen I und III relativ zu Domäne II berichtet.^[4, 11, 17, 71, 95, 174, 252, 257, 259] Nach *Curry*^[71, 98, 259] wird diese Konformationsänderung primär durch die Bindung von Fettsäuren im Bereich zwischen den Subdomänen IA und IIA induziert. Auch wenn die physiologische Bedeutung der Konformationsänderung unbekannt ist, wird diskutiert, ob die Konformationsänderung Rezeptoren ermöglicht, zwischen beladenem und unbeladenem HSA zu unterscheiden, um den Transport zu den Zellen zu regulieren.^[17]

Bereits seit den 50er Jahren wurde die Anzahl an Bindestellen für Fettsäuren (FABS) untersucht und diskutiert. Im Jahr 1958 berichtete *Goodman*^[125] von der Existenz von mindestens 3 Bindestellen, die Fettsäuren mit ähnlich großer Affinität binden. *Spector*^[96, 124, 234] beobachtete in Studien mehrere Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität. Er vermutete 2 hochaffine Bindestellen spezifisch für langkettige Fettsäuren (LCFA, >C₁₂) und 4–5 Bindestellen für Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge sowie andere

Substanzen organischen Ursprungs.^[96, 135] Mittelkettige Fettsäuren (MCFA, C₈–C₁₂) werden weniger stark gebunden.^[234] Auch *Fang et al.*^[152] beschrieb 5 Bindestellen für LCFA. In den Jahren 1998, 2000 und 2001 publizierten *Curry*^[71, 98, 259] und Mitarbeiter mehrere Kristallstrukturen von HSA mit verschiedenen Fettsäuren. Auf der Grundlage dieser kristallographischen Daten postulierte *Curry* 7 Bindestellen für ungesättigte sowie mono- und polyungesättigte Fettsäuren (C₁₀–C₁₈, C_{18:1}, C_{20:4}), die asymmetrisch über das ganze Protein verteilt sind.^[4, 71, 98, 259]

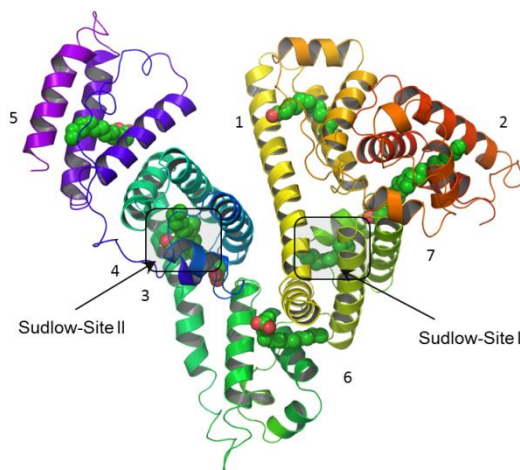


Abbildung 8: Cokristallstruktur von HSA mit Myristinsäure (3) (PDB^[46] Code: 1e7g^[71], Auflösung: 2.5 Å).

Für MCFA werden bis zu 11 Bindestellen beschrieben.^[71] Die 7 gemeinsamen Bindestellen liegen in den Subdomänen IB (FABS 1), IIA (FABS 7), IIIA (FABS 3–4), IIIB (FABS 5) und in den Übergängen zwischen Domänen (IA und IIA, FABS 2) und Subdomänen (IIA und IIB, FABS 6).^[17, 71] Nach NMR-Studien mit MCFA werden die 3 beobachteten FABS sequenziell besetzt.^[198, 227] Die Arbeitsgruppe um *Hamilton*^[227] entwickelte auch eine Methode zur Untersuchung von 9 FABS auf Basis der 2D-NMR-Spektroskopie. [¹³C]-Oleinsäure wurde bei verschiedenen Molverhältnissen zu HSA titriert (1:1–4:1), um die Besetzung der Bindestellen zu beobachten. Dansyl-markierte Aminosäuren (FABS 3–4: L-Norvalin, L-Phenylalanin, L-Sarkosin; FABS 7: L-Asparagin, L-Arginin, L-Glutaminsäure) können auch zur Untersuchung der FABS verwendet werden.^[1, 202]

In den FABS 1–5 wird die Carboxylatgruppe am Eingang der Bindestelle durch Wasserstoffbrücken-Bindungen und Salzbrücken mit Aminosäuren wie Arginin, Serin, Tyrosin und Lysin fixiert.^[4, 11, 198] Für die FABS 6–7 wurden keine Wechselwirkungen, teils aufgrund fehlender Elektronendichte, beobachtet,^[71] weswegen diese beiden Bindestellen vermutlich eine geringe Affinität für Fettsäuren aufweisen.^[11] Die

Methyleinheiten werden, wie bereits von *Brown*^[41] in den 80er Jahren vermutet, von hydrophoben Seitenketten umgeben.^[265]

Die Lage der hochaffinen FABS wurde viel diskutiert.^[95] In den kristallographischen Studien von *Curry* wurde ein Überschuss des Liganden eingesetzt (FA:HSA, 10:1–40:1), um sicherzustellen, dass die Bindestellen gestättigt und homogene Kristalle erhalten werden.^[4] Dadurch können jedoch keine Selektivitäten bzgl. nieder- und hochaffine bzw. physiologisch relevante Bindestellen erreicht werden. Zur Identifizierung der hochaffinen FABS wurde eine strukturbasierte Mutagenese an basischen Aminosäuren durchgeführt,^[4] die laut Kristallstruktur an der Bindung der Fettsäure beteiligt und im Lösungsmittel exponiert sind, um strukturelle Veränderungen zu verhindern.^[13] Diese Studie untersuchte die Bindung von [¹³C]-Palmitinsäure und postulierte, dass die FABS 2, 4 und 5 hochaffine Fettsäurebindestellen^[4, 13, 71, 216, 225] (HFABS) sind. Diese 3 Bindestellen sind tunnelartig aufgebaut und begünstigen dadurch die lineare Konformation der gebundenen Fettsäure,^[1, 71] die gleichzeitig durch eine Salzbrücke an der Carboxylatgruppe fixiert wird. Die FABS 7 wird als niederaffin beschrieben, da die Alkylkette einer Fettsäure laut *Curry* in dieser Bindestelle gebogen vorliegt.^[1, 71] NMR-gestützte Titrationsexperimente mit HSA-bindenden Substanzen, deren Bindestellen aus kristallographischen Daten bekannt sind, unterstützen diese Einteilung.^[227] Darüberhinaus stuften *Krenzel et al.* die FABS 3, 6 und 7 aufgrund der Verdrängung von [¹³C]-Oleinsäure aus den Bindestellen der Wirkstoffe als niederaffin ein.^[227]

In der Literatur wird eine Vielzahl weiterer endogener und exogener Substanzen beschrieben, die von HSA gebunden werden.^[6, 12, 118-119, 134, 139, 144, 146-147, 151, 158, 162, 165-166, 169-171, 176, 180, 183, 185-188, 190, 197, 224, 229, 232, 240, 242, 245-248, 253, 274-275]

In den 70er Jahren führten *Sudlow et al.* Bindestudien mit Dansyl-markierten Aminosäuren an HSA durch. Dabei beobachteten die Autoren in Konkurrenzexperimenten mit diversen Wirkstoffen gegen Dansylsarkosin und Dansylamid, dass diese beiden Aminosäuren in 2 unterschiedlichen Bindetaschen von HSA binden.^[173-174] Die Existenz zweier Wirkstoff-Bindestellen wurde durch weitere Arbeiten unterstützt.^[95, 146, 242, 251] In der Literatur werden die beiden Bindestellen auch als Warfarin-Bindestelle^[95, 235] (Sudlow-Site I,^[173-174] Abbildung 9A) und Benzodiazepin-Bindestelle^[3, 12, 95, 251] (Ibuprofen-Bindestelle, Sudlow-Site II,^[95, 173-174] Abbildung 9B) bezeichnet und befinden sich nach kristallographischen Daten von *Carter*^[45] in Subdomäne IIA (Sudlow-Site I) bzw. IIIA (Sudlow-Site II). Somit überlappen die beiden

Wirkstoff-Bindestellen mit der FABS 7 (Sudlow-Site I) bzw. mit den FABS 3–4 (Sudlow-Site II)^[1, 11, 71] und die von Krenzel et al.^[227] entwickelte Methode auf Basis der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie zur Identifizierung von FABS kann zur Untersuchung neuer Wirkstoffe eingesetzt werden. Die erhaltene Cokristallstruktur von Warfarin (2) mit HSA bestätigte die bisherigen Daten, dass die Aminosäuren Trp-214 und Lys-199 Teil der Warfarin-Bindestelle sind und diese in Subdomäne IIA liegt.^[2, 37, 90-91, 95, 189, 276] Auch die Daten aus Fragmentierungsstudien, nach denen sich Sudlow-Site II in der Domäne II befindet,^[95, 221, 277-279] werden von Carter's Kristalldaten unterstützt. Sudlow-Site I und Sudlow-Site II unterscheiden sich in Struktur, Größe und Polarität voneinander.^[10] Zwar überlappen die beiden Bindestellen nicht miteinander,^[17] sie scheinen aber teilweise miteinander zu interagieren.^[167]

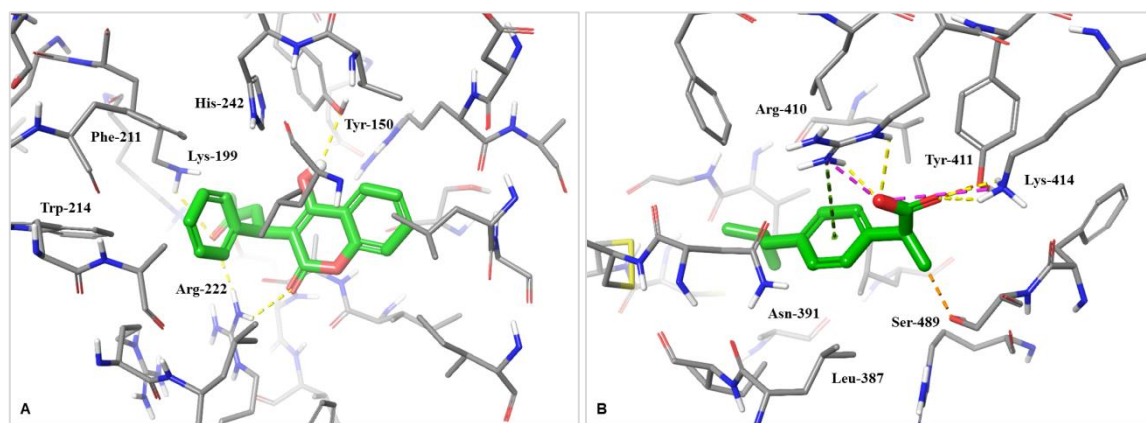


Abbildung 9: Ausschnitt aus A) Sudlow-Site I mit Warfarin (2) (PDB^[46] Code: 2bxd^[10], Auflösung 3.1Å) und B) Sudlow-Site II mit Ibuprofen (4) (PDB Code: 2bxg^[10], Auflösung 2.7 Å).

In Sudlow-Site I werden bevorzugt große, heterozyklische Substanzen mit zentral gelegener, negativer Ladung gebunden.^[4, 9, 23] Da die Bindung einer großen Vielfalt an chemischen Strukturen beschrieben wurde, gilt die Bindestelle als flexibel und adaptierbar.^[9] Die Bindung von Substanzen in Sudlow-Site I erfolgt vorwiegend durch die Aminosäuren Tyr-150, Lys-199, Arg-222 und Arg-257.^[10] In mehreren Studien wurden zwei simultan gebundene Wirkstoffe in Sudlow-Site I beobachtet.^[9-10, 243, 254] Gleichzeitig wurde von Substanzen wie z.B. Glibenclamid berichtet, die selektiv Azapropazon verdrängen, sich aber nicht auf die Bindung von Warfarin (2) auswirken.^[95] Interessant ist, dass beide Wirkstoffe in Sudlow-Site I binden.^[10] Daher wurden erste Versuche unternommen, diese Bindetasche in 3 Sub-Sites zu untergliedern (a, b, c), die sich gegenseitig beeinflussen oder aber unabhängig voneinander Liganden binden können.^[9, 12, 167, 251, 280] Dansyl-L-Asparagin wird als spezifischer Ligand für die Sub-Site 1b beschrieben.^[167] Durch die Bindung von Fettsäuren erfolgt eine Umlagerung einiger

Aminosäuren (Tyr-150, Glu-153, Gln-196, His-242, Arg-257, His-288) in Sudlow-Site I, wodurch sich das Volumen vergrößert und gleichzeitig der hydrophobe Charakter der Bindetasche zunimmt.^[10] Wirkstoffe wie Warfarin (2),^[173, 235] Iophenoxinsäure (5),^[172, 242, 281] Sulfasalazin (6)^[136] und Phenylbutazon (1)^[174] binden in Sudlow-Site I.

Die kleinere^[3-4] Sudlow-Site II bindet vorwiegend aromatische^[11, 250] Moleküle mit peripher gelegener Carboxylgruppe^[4, 9, 23] und wird als weniger flexibel^[9] beschrieben. Elektrostatische Interaktionen zwischen Liganden und HSA treten primär mit den Aminosäuren Arg-410, Tyr-411 und Ser-489 auf.^[10] Die Bindung verschiedener Benzodiazepine und Indole in Sudlow-Site II wird als stereospezifisch^[3, 95] beschrieben. Bekannte Wirkstoffe, die in der Sudlow-Site II binden, sind Ibuprofen (4)^[23, 45, 174], Ketoprofen (7) und Diazepam.^[10, 191, 194]

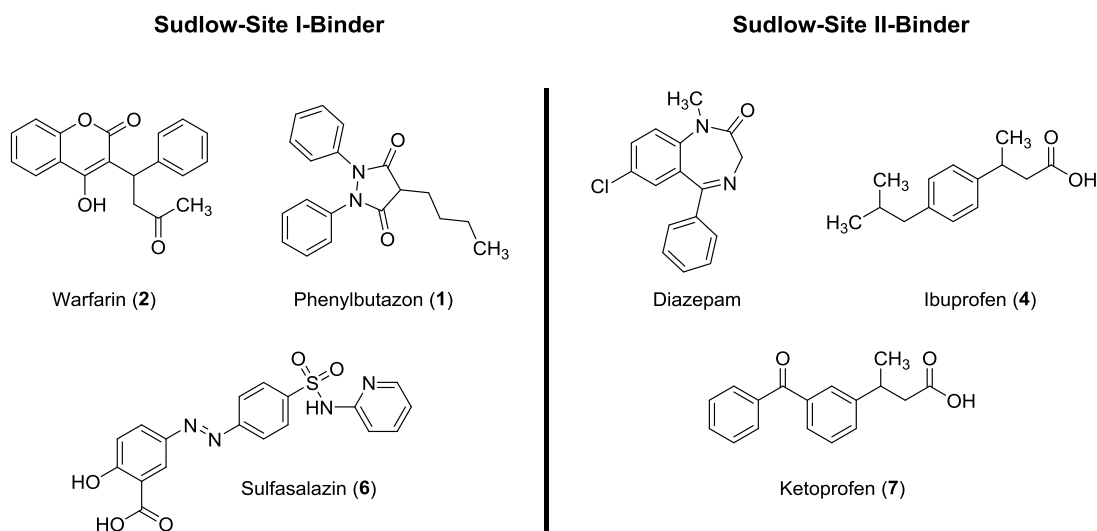


Abbildung 10: Prominente Binder für Sudlow-Site I und Sudlow-Site II.

Neben der Warfarin-Bindestelle und der Benzodiazepin-Bindestelle wird noch eine dritte Bindestelle für Wirkstoffe in Subdomäne IB diskutiert.^[4, 168, 193] In Bindestudien mit Antibiotika wie Fusidinsäure,^[72] Antikoagulantien (z.B. Dicumarol), Gallensäuren und Naturstoffen wie bspw. Aristolochiosäure wurden Substanzen in dieser Subdomäne gefunden.^[193]

Wie sich oxidativer Stress auf die Bindung von Substanzen in den Bindestellen auswirkt, wurde von Otagiri untersucht.^[64] In Sudlow-Site I wurden keine Veränderungen bzgl. Konformation von Subdomäne IIA und Bindeaffinität von Warfarin (2) beobachtet. Dagegen wird von einer Konformationsänderung in Subdomäne IIIA berichtet, die zu einer reduzierten Bindung von Ketoprofen (7) in Sudlow-Site II führt.

Fettsäuren binden teilweise in den gleichen Bindestellen wie Wirkstoffe (Sudlow-Site I und II). Eine der postulierten HFABS, FABS 4, überlappt mit Sudlow-Site II.^[71] Auch wenn es dadurch zu Kompetitionen zwischen diesen Substanzen kommen kann, werden diese unter physiologischen Bedingungen als nicht relevant angesehen,^[4, 71, 124, 135, 231] da Kompetitionen mit Fettsäuren oder anderen unpolaren Substanzen erst ab Fettsäure/HSA Verhältnissen von >3:1 beobachtet wurden und jene auch von der Bindeaffinität des Wirkstoffes abhängig sind.^[135, 231] Die Zunahme der Wirkstoffkonzentration durch Verdrängung im Vergleich zur Gesamtkonzentration an freiem Wirkstoff im Blut wird als klein beschrieben.^[1, 18, 282]

Dennoch wird bei der Bindung von LCFA (LCFA/HSA, 3:1) eine erhöhte Bindungsaffinität von bspw. Warfarin (2) und Dansylamid berichtet, die auf eine Konformationsänderung zurückgeführt wird.^[4, 9, 172, 232, 257] Die Orientierung und Lokalisierung des gebundenen Liganden werden als unverändert beschrieben.^[4] 3'-Azido-2', 3'-dideoxythymidin (AZT) wird nur in Anwesenheit von Fettsäuren in Sudlow-Site I oder Subdomäne IB gebunden.^[254] Weitere Untersuchungen stützen die Schlussfolgerung, dass die Bindung an HSA sowohl durch kompetitive Verdrängung als auch durch allosterische Effekte beeinflusst wird,^[9, 45, 95, 135, 172, 202, 223, 283-285] die sich z.B. auf eine gemeinsame Grenzfläche zwischen Subdomäne IB und Sudlow-Site I zurückführen lassen.^[193] Auch die Bindung von Fettsäuren wird allosterisch reguliert.^[96]

Aus den bisher beschriebenen Erkenntnissen können somit Wechselwirkungen zwischen Wirkstoffen oder Wirkstoffen und Fettsäuren auftreten, die Auswirkungen auf die Verteilung, Pharmakokinetik, Metabolismus und Ausscheidung haben. Dieser Zusammenhang wird bereits lange in der Literatur diskutiert.^[2, 12, 27, 95, 282, 286-289] Auch wenn die Interpretation teilweise auf Basis von *in vitro* Daten erfolgt und zum Teil von Überbewertung die Rede ist,^[1, 27, 289] sollten bei stark gebundenen Substanzen (>90%) wie Warfarin (2), Phenylbutazon (1) und Ibuprofen (4)^[23, 45, 174] Wechselwirkungen jedoch nicht außer Acht gelassen werden.^[1, 282] Ein Beispiel, wie problematisch Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen bei stark gebundenen Wirkstoffen sein können, ist die gleichzeitige Applikation von Warfarin (2) und nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAIDs) wie Aspirin, Phenylbutazon (1) oder Bucolome.^[12, 290-293] Infolge kompetitiver Effekte wird die antikoagulante Wirkung von Warfarin (2) bei Gabe dieser NSAIDs verstärkt.^[12, 290] Bei gleichzeitiger Applikation von Phenylbutazon (1) ist das Risiko für Hämorrhagien erhöht.^[12, 294]

Wechselwirkungen zwischen Wirkstoffen können aber auch positive Effekte haben.^[9] Zur Behandlung des nephrotischen Syndroms wird bspw. Furosemid eingesetzt. Um die Wirksamkeit, die aufgrund seiner starken Plasmaproteinbindung gering ist, zu steigern, kann es als Kombipräparat mit Bucolom gegeben werden. Das NSAID verdrängt Furosemid aus Sudlow-Site I,^[295-297] wodurch der diuretische Effekt verstärkt wird.^[9, 298]

1.3 Methoden zur Untersuchung von Bindung an HSA

Viele Studien zur Bindung von Liganden und thermischen sowie chemischen Stabilitäten^[76, 97] wurden an verschiedenen Serum-Albuminen u.a. von Ratte, Kaninchen, Hund, Rind, Schwein, Pferd und Mensch durchgeführt.^[127, 134, 200, 203, 299-310] Strukturell zeigt bovines Serum-Albumin (BSA) mit 74–80% die größte Übereinstimmung zu humanem Serum-Albumin.^[17, 23, 311-312] Die Arbeitsgruppe um *Otagiri*^[311] untersuchte die Bindestellen von Kaninchen, Hund, Ratte, Rind und Mensch auf mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies. Für die Studie wurden bekannte HSA-Binder für Gleichgewichtsdialysen verwendet. Die Forscher beobachteten ähnliche Affinitäten für die Warfarin-Bindestelle bei Serum-Albumin von Ratte, Kaninchen und Rind. Bei der Ibuprofen-Bindestelle stellten sie jedoch deutliche Unterschiede im Vergleich zu HSA fest, die vermutlich auf die unterschiedliche Form und Hydrophilie der Bindestelle zurückzuführen sind.^[311] Weitere Bindestudien an HSA und BSA berichten für den gleichen Liganden ebenfalls von unterschiedlichen Bindungsaffinitäten.^[1, 97, 127] Daten aus Studien mit BSA müssen daher mit Vorsicht verwendet werden, wenn aus den gewonnenen Erkenntnissen Rückschlüsse auf die (Binde)Eigenschaften von HSA gezogen werden sollen.^[17, 124] Aufgrund dieser Diskrepanz zwischen HSA und BSA^[182] wird im Folgenden nur auf Literaturdaten zu HSA eingegangen.

1.4 Diagnostische, therapeutische und sensorische Anwendungen von HSA

HSA findet zur Behandlung von Hämorrhagie, Hypovolämie und Hypoalbuminämie klinische Anwendung.^[228] Bei schweren Verbrennungen erfolgt die Gabe von HSA-Infusionen, um nicht nur den Flüssigkeitsverlust, sondern auch den Verlust an HSA zu kompensieren.^[24, 34] Der tatsächliche Nutzen im Hinblick auf Morbidität und Mortalität wird kontrovers diskutiert.^[1, 81-84]

Die Funktion von HSA als Transporter ist unter therapeutischen Gesichtspunkten von großem Interesse.^[34] Viele Peptide und Proteine besitzen eine kurze Halbwertszeit, da sie schnell metabolisiert und ausgeschieden werden. Durch die Bindung an HSA oder andere Proteine kann die Pharmakokinetik beeinflusst werden.^[9, 107, 313] Proteine, Peptide oder auch Wirkstoffe können so modifiziert werden, dass sie als Liganden reversibel oder kovalent an HSA binden.^[34] Als Beispiele sind die Insuline Detemir (Levemir®) und Liraglutid (Victoza®) zu nennen. Peptide, deren Halbwertszeit von 4–6 Minuten auf 5–7 Stunden (Detemir) bzw. 1.5–2 Minuten auf 11–15 Stunden (Liraglutid) durch die Derivatisierung mit einer Fettsäure optimiert wurde. Mit Paclitaxel beladene HSA-Nanopartikel (Abraxan®) werden bei metastasierendem Brustkrebs eingesetzt. Der Nutzen bei Bauchspeicheldrüsenkrebs und beim kleinzelligen Lungenkarzinom wird geprüft. Therapieansätze mit Wirkstoff/HSA-Konjugaten oder HSA-bindenden Prodrugs befinden sich in klinischen Studien.^[34]

Einer Forschergruppe um *Frei* ist es gelungen, Tumorgewebe mit 5-Aminofluorescein-markiertem HSA sichtbar zu machen, um fluoreszenzgestützte Operationen am Gehirn durchzuführen. Hierbei wird das Prinzip genutzt, dass Tumore Proteine wie HSA als Energiequelle und zur Gewinnung von Aminosäuren akkumulieren.^[314]

In der Nuklearmedizin wird die Bindung von Kontrastmitteln an HSA genutzt, um bspw. vaskuläre Strukturen mit Hilfe einer Angiographie sichtbar zu machen.^[11] ^{99m}Tc-Mertiatide^[315] (Technetium-99m-markiertes Mercaptoacetylglycylglycylglycin), ein Radiopharmakon für Nierenzintigraphien, bindet hochaffin an HSA. Durch die Gabe von Bucolom kann die freie Wirkstoffkonzentration erhöht werden. Dies ist für den Patienten von Vorteil, da die Wartezeit verkürzt und die Strahlenbelastung durch die beschleunigte Ausscheidung reduziert wird.^[9, 316] ^{99m}Tc-Nanocoll®, ^{99m}Tc-Albures u.a. sind ^{99m}Technetium-markierte HSA-Partikel unterschiedlicher Größe, die für nuklearmedizinische Untersuchungen wie die Lymphszintigraphie, Lungenperfusionsszintigraphie oder Venographie, u.a. verwendet werden.^[34] Weiterhin wird HSA als diagnostischer Marker für Diabetes mellitus und Ischämie eingesetzt.^[1] Die amerikanische Federal Drug and Food Administration (FDA) erteilte die Zulassung für Ischämie-modifiziertes Albumin (IMA), das als Biomarker zum Nachweis von myokardialer Ischämie bestimmt werden kann.^[228, 317-318]

HSA findet nicht nur diagnostische und therapeutische Anwendung. Als Sensor wurde es bereits erfolgreich für die regio- und stereoselektive Identifizierung und

Charakterisierung von Glyceriden eingesetzt. Dabei werden HSA und BSA in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen zur chemometrischen Analyse von Mono-, Di- und Triacylglyceriden verwendet, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten sehr schwer zu unterscheiden sind.^[182] Von der Arbeitsgruppe *Anslyn*^[312] wurde auch von der Differenzierung (un)gesättigter Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge berichtet. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass mit ihrem System die Zusammensetzung von Ölen fluoreszenzspektroskopisch bestimmt werden kann.

1.5 Vorarbeiten

In Vorarbeiten von *Petry*^[319] und *Volkmar*^[320] wurde ein spezifischer Binder für eine hochaffine Fettsäurebindestelle an HSA entwickelt. Das Prinzip des aufgebauten Assays basiert auf der Grundlage, dass die Fluoreszenz des solvatochromen Fluorophors NBD (7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) mit steigender Hydrophobie zunimmt.^[321-322] Ein Prinzip, das bereits vielfach Anwendung^[162, 174, 181, 235] gefunden hat und auf eine Veränderung des Lösungsmittels oder der lokalen Umgebung^[162, 202, 323] innerhalb des Makromoleküls zurückzuführen ist. In dem entwickelten Testsystem^[319-320] wird ein Signal (die Fluoreszenzintensität) erhalten, wenn eine fluoreszenzmarkierte Fettsäure in einer hydrophoben Bindestelle von HSA bindet. Wird der Fluorophor aus der hydrophoben Bindestelle verdrängt, nimmt die Fluoreszenz sichtbar ab (Abbildung 11).



Abbildung 11: Allgemeines Prinzip des Wettbewerbsassays.

Durch Titrationsexperimente (25 μM) und *Job*-Plots^[324-325] (100 μM) mit NBD-markierten Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge wurde 12-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecansäure (**8**) (NBD- C_{12} , Abbildung 12) als geeigneter, fluoreszenzmarkierter Binder mit einer Bindungsstöchiometrie von 1:1 im HSA/NBD- C_{12} -**8**-Komplex identifiziert.^[320] Demnach besitzt das NBD-Label keine intrinsische Affinität zu HSA. Dieses Ergebnis wurde in der Diplomarbeit von *Wenskowsky*^[326] bestätigt. Die Dissoziationskonstante (K_D) der NBD-markierten C_{12} -Fettsäure **8** wurde mit 11.6 μM ^[326] bzw. 12.9 μM ^[320] ermittelt. In Wettbewerbsexperimenten war Myristinsäure (**3**) kompetitiv zu NBD- C_{12} **8**. Eine Wettbewerbskonkurrenz durch

Myristinsäuremethylester (**9**) wurde nicht beobachtet.^[320, 326] Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass eine freie Carboxylgruppe zur Bindung in der hochaffinen Fettsäurebindestelle notwendig ist. Zur Erhöhung der Bindungsaffinität von Myristinsäure (**3**) wurden Fettsäurederivate mit einem Arylring an verschiedenen Positionen der homologen Kette synthetisiert, um die Konformation von Myristinsäure (**3**) bereits vor der Erkennung in der Bindestelle von HSA zu fixieren (Abbildung 12).^[326]

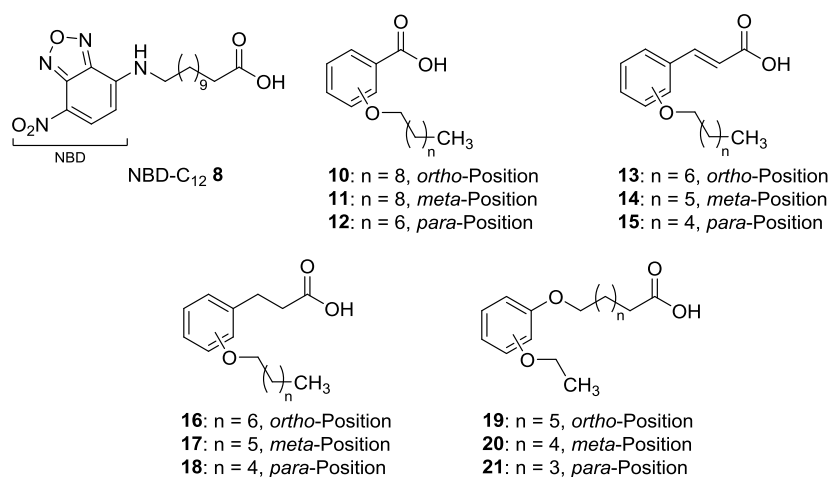


Abbildung 12: Struktur von NBD-C₁₂ **8** und den Fettsäurederivaten **10–21**.

Keines der synthetisierten Fettsäurederivate **10–21** war kompetitiv zu NBD-C₁₂ **8**. Darüber hinaus waren die erhaltenen Daten aufgrund von Schwankungen schwierig zu interpretieren. Die Messwerte führten zu der Annahme, dass die Substanzen vorwiegend in der Sudlow-Site II und zum Teil (bei hohen Konzentrationen) auch in der Sudlow-Site I binden.^[326] Bei Konkurrenzexperimenten mit Warfarin (**2**) (Sudlow-Site I-Binder) und Ibuprofen (**4**) (Sudlow-Site II-Binder)^[23, 45, 174] wurde keine Verdrängung der NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** beobachtet. Daher bindet NBD-C₁₂ **8** weder in Sudlow-Site I noch II. In einem Screening mit bekannten HSA-Bindern wurden Sulfasalazin (**6**) und Balsalazid (**22**) als bisher einzige Binder neben Myristinsäure (**3**) für die Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** identifiziert.^[326]

2. Zielsetzung

Im Rahmen von Vorarbeiten^[319-320, 326] wurde NBD-C₁₂ **8** als spezifischer, fluoreszenzmarkierter Binder für eine hochaffine Fettsäurebindestelle an HSA beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es, Titrations- und Konkurrenzexperimente sowie *Job*-Plots bei verschiedenen Konzentrationen zur Evaluierung der Ergebnisse bzgl. Dissoziationskonstante, Bindungsstöchiometrie und der Notwendigkeit der Carboxylgruppe durchzuführen. Zusätzlich sollten die etablierten Methoden um fluoreszenzbasierte Gleichgewichtsdialysen ergänzt werden. Über den Einfluss des NBD-Fluorophors auf die Bindung von Myristinsäure (**3**) an HSA sollten Gleichgewichtsdialysen mit radioaktiv markierter Myristinsäure (^T**3**) Aufschluss geben. Eventuell könnten FRET-Experimente Hinweise auf die exakte Lage der Bindetasche von NBD-C₁₂ **8** geben.

Sulfasalazin (**6**) und Balsalazid (**22**) wurden als bisher einzige Binder für die Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** identifiziert.^[326] Daher sollte untersucht werden, welche Struktureinheiten der beiden strukturverwandten Arzneistoffe **6** und **22** für die Bindung essentiell sind sowie welcher räumliche Anspruch und welche funktionellen Gruppen toleriert werden. Zur Untersuchung dieser Fragestellungen und zur Erstellung einer Struktur-Affinitäts-Beziehung sollten verschiedene Sulfasalazin-Derivate synthetisiert werden. Nach dem folgenden Retrosyntheschema sollten die Sulfasalazin-Derivate durch Azokupplung, Chlorierung und Umsetzung mit Aminen zugänglich sein.

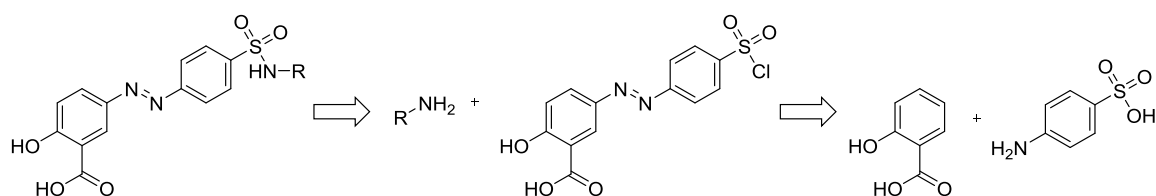


Abbildung 13: Retrosynthese von Sulfasalazin-Derivaten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines trichromatischen Konkurrenzassays. Die erfolgreiche Entwicklung eines solchen Assays könnte die simultane Untersuchung einer Testverbindung in Sudlow-Site I und Sudlow-Site II sowie der Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** ermöglichen. Als Vorbild diente der bichromatische Assay von Chang^[181], der auf der Verwendung von spezifischen, fluoreszierenden Bindern für Sudlow-Site I (Dansylamid) und Sudlow-Site II (4-Propyloxy-BODIPY **23**) beruht.

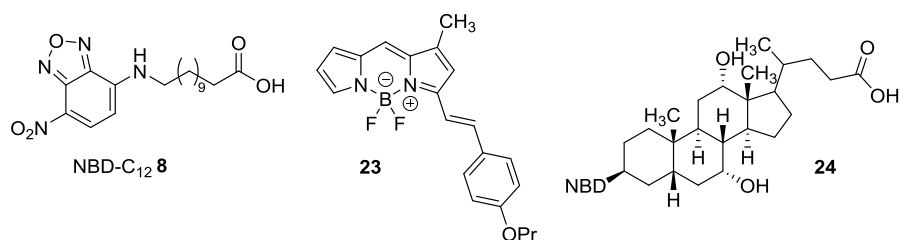


Abbildung 14: Strukturen von NBD-C₁₂ **8**, 4-Propyloxy-BODIPY **23** und NBD-markierter Gallensäure **24**.

Zur Entwicklung des trichromatischen Kompetitionsassays sollte zuerst evaluiert werden, ob die beiden Fluoreszenzfarbstoffe NBD-C₁₂ **8** und 4-Propyloxy-BODIPY **23** interferieren. In diesem Fall könnten Derivate des von *Chang* entwickelten 4-Propyloxy-BODIPYs **23** synthetisiert werden, um die Anregungswellenlänge bathochrom zu verschieben. Nach *Curry*^[202] und *Volkmar*^[320] weist Dansylamid eine Eigenaffinität zu HSA auf, weshalb ein neuer, spezifischer Fluoreszenzmarker für Sudlow-Site I benötigt wird. Nach *Miranda*^[204] und eigenen Arbeiten^[326] bindet z.B. die NBD-markierte Gallensäure **24** in dieser Bindestelle. Die mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markierte Gallensäure könnte daher als spezifischer Marker für Sudlow-Site I verwendet werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe Marina BlueTM, Pacific BlueTM,^[327] Badan,^[328] Acrylodan,^[329] Dapoxyl[®] succinimidylester und (7-Hydroxy-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (Abbildung 15) sollten daher auf ihre Eignung im Kompetitionsassay untersucht werden.

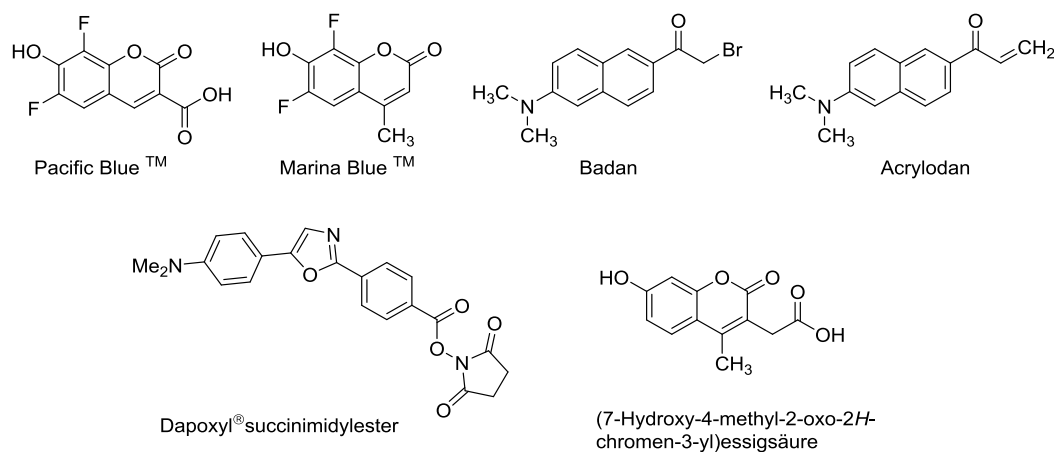


Abbildung 15: Zusammenstellung potentiell geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung von Gallensäure.

Mit Hilfe der neu entwickelten Assays für Sudlow-Site I und Sudlow-Site II sollten dann die in eigenen Vorarbeiten synthetisierten Fettsäurederivate **10–21** bezüglich Ihrer Bindung an HSA untersucht werden.

3. Allgemeiner Teil

3.1 Evaluierung der Literaturdaten zur NBD-markierten Fettsäure und Methodenvalidierung

Zur Evaluierung der Ergebnisse aus vorherigen Arbeiten^[320, 326] wurden zunächst Sättigungsexperimente mit NBD-C₁₂ **8** auf Basis der Fluoreszenztitration bei verschiedenen Konzentrationen von HSA (12.5 µM, 25 µM) durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen an NBD-markierter Fettsäure **8** zu HSA titriert. Bei beiden HSA-Konzentrationen (Abbildung 16A–B) ist der erwartete Anstieg der Fluoreszenzintensität (FI) zu beobachten, der mit zunehmender Konzentration an NBD-C₁₂ **8** bei einem Ligand-**8**/HSA-Verhältnis von ungefähr 4–6:1 in die Sättigung übergeht.

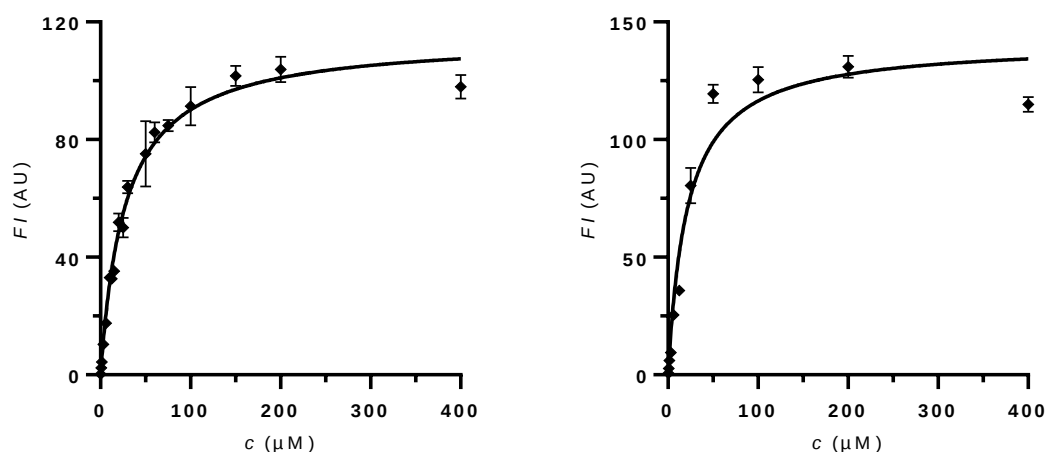


Abbildung 16: Titrationskurven von NBD-C₁₂ **8** (0–400 µM): A) 12.5 µM HSA. B) 25 µM HSA.

Die Interaktion zwischen einem Rezeptor (hier Protein) und einem Liganden, die sich in einem reversiblen Gleichgewicht befinden, kann wie folgt beschrieben werden:^[330]



Voraussetzungen hierfür sind u.a., dass alle Proteinmoleküle gleich und unabhängig voneinander sind, der Ligand chemisch stabil ist und nur gebunden (L_B) oder ungebunden (L_F) vorliegen kann. Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich daraus folgende Beziehung zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D):^[330]

$$\frac{[\text{Protein}_{\text{frei}}] [\text{Ligand}_{\text{frei}}]}{[\text{Protein/Ligand-Komplex}]} = \frac{[\text{P}_F][\text{L}_F]}{[\text{L}_B]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_D \quad \text{Glg. 2}$$

Der K_D-Wert gibt an, bei welcher Konzentration die Bindestellen eines Proteins zu 50% besetzt sind. Somit ermöglicht diese Konstante eine Aussage über die Qualität der

Wirkstoffbindung. Die Berechnung der K_D -Werte erfolgte unter Zuhilfenahme der Software *GraphPad Prism*^[331] (Version 7) der Firma *GraphPad Software* basierend auf folgender Gleichung:

$$K_D = \left(\frac{B_{\max} * X}{Y} \right) - X \quad \text{Glg. 3}$$

X: Konzentration des Liganden

Y: Fluoreszenzintensität

$B_{\max}$: Maximum der spezifischen Bindung (extrapoliert)

Die Konstante wurde – wenn nicht explizit darauf hingewiesen wurde – unter der Annahme kalkuliert, dass eine Bindetasche spezifisch von dem Ligand besetzt wird. Der Fehler wurde als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Aus den Titrationsexperimenten mit 12.5 μM HSA und 25 μM HSA wurden die K_D -Werte für die NBD-markierte Fettsäure **8** mit $27 \pm 2 \mu\text{M}$ bzw. $22 \pm 3 \mu\text{M}$ bestimmt. Unter Beachtung des Fehlerbereichs können die berechneten K_D -Werte als gleich betrachtet werden. Um die K_D -Werte mit einer weiteren Methode abzusichern, wurden Gleichgewichtsdialysen durchgeführt. Das Messsignal wurde auch hier durch die Fluoreszenz des NBD-Labels erhalten. Zunächst wurde überprüft, ob die verwendete Membran, die aus Cellulose kombiniert mit Glycerol bestand, durchlässig für die NBD-markierte C_{12} -Fettsäure **8** ist und nach wie vielen Stunden der Gleichgewichtszustand erreicht wird. Dazu wurde NBD- C_{12} **8** gegen phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, kurz: DPBS) dialysiert. Dabei wurde beobachtet, dass sich das System nach 5 Stunden im Gleichgewicht befindet (Abbildung 17) und somit die Durchlässigkeit der Membran für die NBD-markierte Fettsäure **8** gegeben ist.

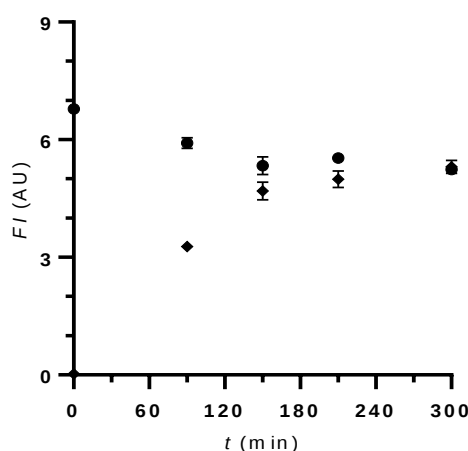


Abbildung 17: Kinetische Beobachtung der Gleichgewichtsdialyse zwischen NBD- C_{12} **8** (●, 12.5 μM) und DPBS (◆).

Anschließend wurden Gleichgewichtsdialysen mit der NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** bei zwei verschiedenen Konzentrationen (12.5 µM, 25 µM) nach der zuvor entwickelten Methode durchgeführt. Dazu wurde NBD-C₁₂ **8** gegen HSA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (0–100 µM) dialysiert. Die nach fünf Stunden aus der jeweiligen Dialyse erhaltene Fluoreszenzintensität (je 3–4 Replikate) wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten HSA-Konzentration aufgetragen. Abbildung 18 zeigt den erwarteten Fluoreszenzanstieg im Kompartiment von HSA, der auf der steigenden Konzentration an HSA und somit auf der sinkenden Polarität der Umgebung von NBD-C₁₂ **8** infolge der Proteinbindung beruht. Auch hier wird wie zuvor bei den Titrationsexperimenten eine Sättigung erreicht (Vgl. Abbildung 16).

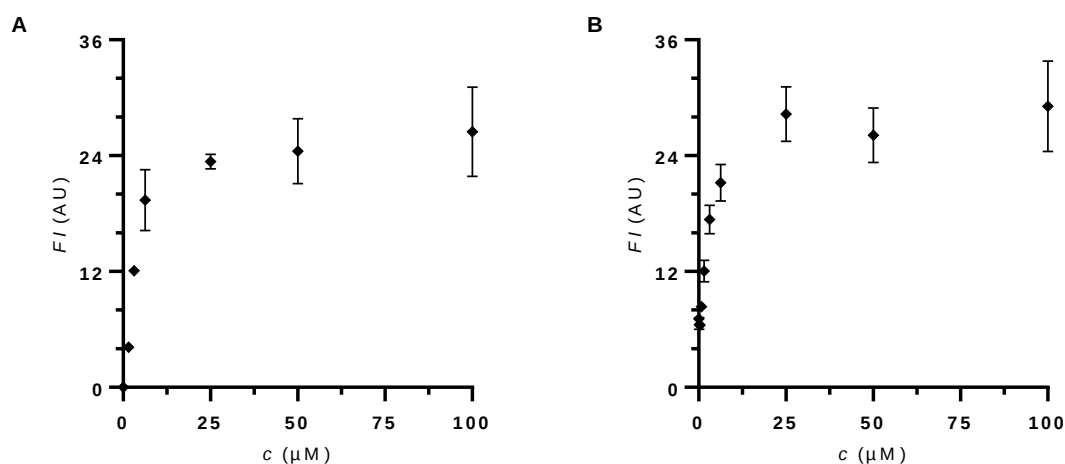


Abbildung 18: Fluoreszenzintensität von NBD-C₁₂ **8** mit steigender HSA-Konzentration (0–100 µM): A) 12.5 µM NBD-C₁₂ **8**. B) 25 µM NBD-C₁₂ **8**.

Um den Anteil an gebundener NBD-C₁₂ **8** berechnen zu können, musste der ungebundene Anteil an NBD-markierter Fettsäure **8** ermittelt werden. Dazu wurde je ein Aliquot aus der Dialysekammer mit NBD-C₁₂ **8** entnommen und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Zusätzlich wurden zur Erstellung einer Eichgerade verschiedene Konzentrationen an NBD-C₁₂ **8** in DPBS hineintitriert (Abbildung 19). Bis zu einer Konzentration von ca. 100 µM steigt die Fluoreszenzintensität von NBD-C₁₂ **8** erwartungsgemäß linear an. Die bei höheren Konzentrationen vergleichsweise geringe Zunahme der FI wird vermutlich durch eine verminderte Löslichkeit hervorgerufen, die an etwas Niederschlag in DPBS zu erkennen war.

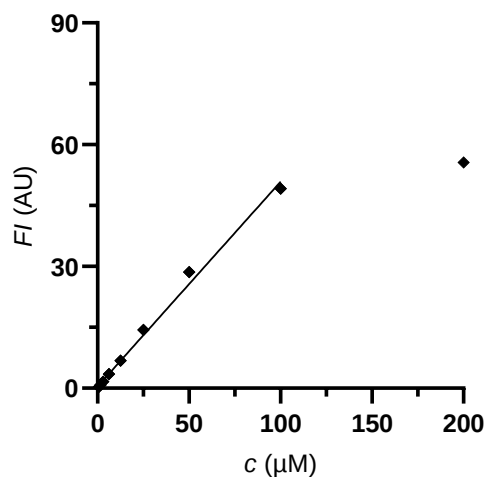


Abbildung 19: Fluoreszenzintensität von NBD-C₁₂ **8** (0–400 µM) in DPBS.

Nach einer linearen Regression im Konzentrationsbereich bis einschließlich 100 µM ergibt sich eine Geradengleichung (Glg. 4), die zur Berechnung des ungebundenen Anteils von NBD-C₁₂ **8** verwendet wurde. Zur Bestimmung des gebundenen Anteils an NBD-C₁₂ **8** wurde dann die Differenz aus der Gesamtkonzentration an NBD-C₁₂ **8** und dem ungebundenen Anteil gebildet (Glg. 5). Der berechnete, gebundene Anteil an NBD-markierter C₁₂-Fettsäure **8** wurde jeweils gegen die Konzentration an HSA auftragen (Abbildung 20A–B).

$$y = 0.4985x + 0.495 \quad \text{Glg. 4}$$

$$[\text{NBD-C}_{12} \text{ **8**}]_{\text{geb}} = [\text{NBD-C}_{12} \text{ **8**}]_{\text{ges}} - 2[\text{NBD-C}_{12} \text{ **8**}]_{\text{ungeb}} \quad \text{Glg. 5}$$

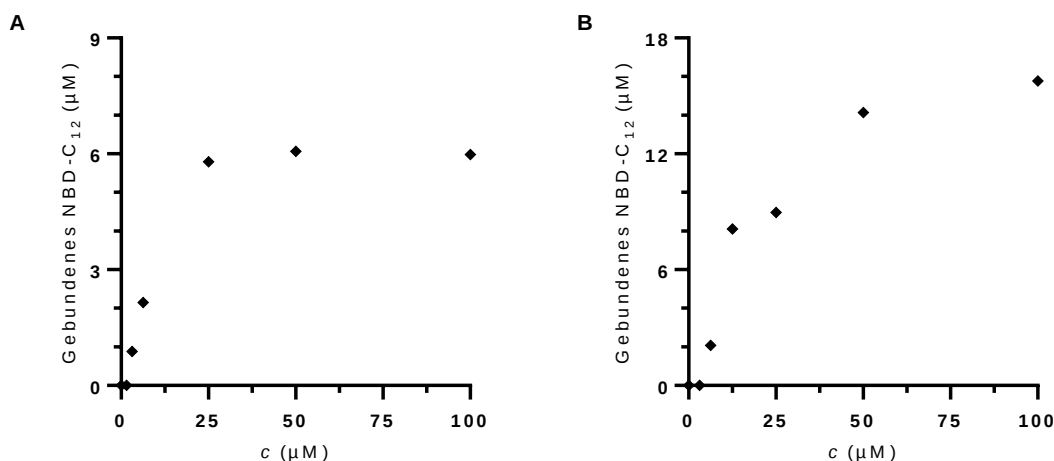


Abbildung 20: Anteil gebundener NBD-C₁₂ **8** an HSA (0–100 µM): A) 12.5 µM NBD-C₁₂ **8**. B) 25 µM NBD-C₁₂ **8**.

Beide Kurven nähern sich einer Konzentration an, die ca. 48–60% gebundener C₁₂-Fettsäure **8** entspricht. Dieser nichtlineare Kurvenverlauf weist darauf hin, dass im

beobachteten Konzentrationsbereich die Besetzung einer spezifischen Bindestelle von HSA beobachtet wird. Die aus den beiden Gleichgewichtsdialysen berechneten Dissoziationskonstanten von NBD-C₁₂ **8** wurden zum Vergleich den aus Titrationsexperimenten erhaltenen K_D-Werten in Tabelle 1 gegenübergestellt.

Tabelle 1: Berechnete K_D-Werte für NBD-C₁₂ **8**.

c (HSA)	K _D (Fluoreszenztitration)	K _D (Gleichgewichtsdialyse)
25 μM ^[326]	11.6 μM ^a	-
25 μM ^[320]	12.9 μM ^a	-
12.5 μM	27.4 ± 2.2 μM	13.8 ± 6 μM
25 μM	21.6 ± 2.9 μM	32.2 ± 10.9 μM

^a Die K_D-Werte wurden aus (eigenen) Vorarbeiten entnommen.

Der Vergleich der Konstanten sowohl untereinander als auch mit den Literaturdaten (K_D (25 μM) = 11.6–12.9 μM)^[320, 326] führt unter Beachtung des Fehlers zu vergleichbaren K_D-Werten für NBD-C₁₂ **8**.

Zur Evaluierung der Ergebnisse zur Bindungsstöchiometrie im NBD-C₁₂-**8**/HSA-Komplex wurden Job-Plots^[324-325] bei verschiedenen Konzentrationen (12.5 μM, 25 μM) durchgeführt (Abbildung 21). Dabei wird der Stoffmengenanteil an HSA (χ_{HSA}) bei gleichbleibender Gesamtkonzentration variiert und die Fluoreszenzintensität von NBD-C₁₂ **8** bestimmt.

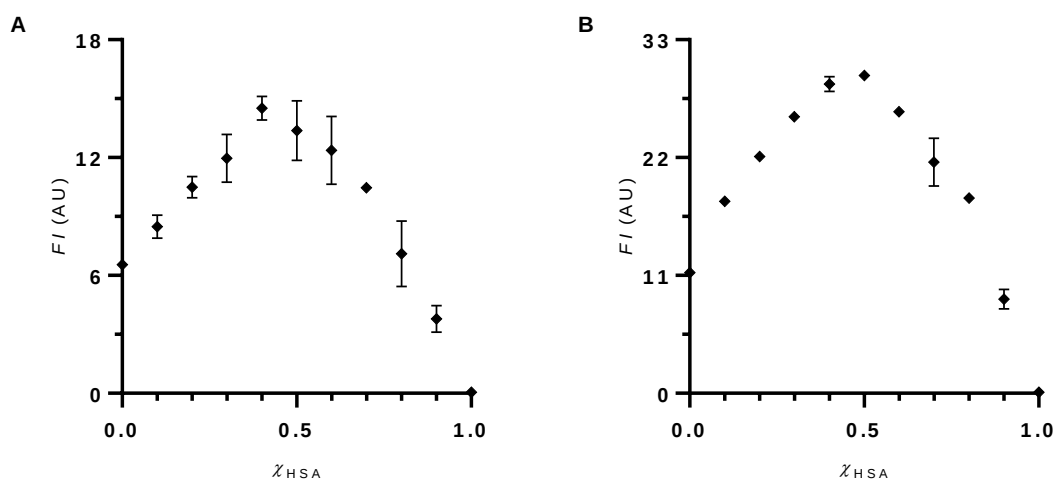


Abbildung 21: Job-Plots von NBD-C₁₂ **8** im Komplex mit HSA: A) 12.5 μM. B) 25 μM.

Das Maximum der Fluoreszenz liegt bei den zwei verschiedenen Konzentrationen bei einem Stoffmengenanteil χ von HSA 0.5, d.h. die NBD-markierte Fettsäure **8** bildet einen

1:1-Komplex mit HSA. Im Anschluss wurden Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -**8**/HSA mit Myristinsäure (**3**) und Myristinsäuremethylester (**9**) durchgeführt. In der Konkurrenzkurve mit Myristinsäure (**3**) ist mit steigender Konzentration an C_{14} -Fettsäure **3** eine Fluoreszenzabnahme zu beobachten (Abbildung 22A). Da eine Fluoreszenzabnahme auf die Verdrängung von NBD- C_{12} **8** aus der Bindetasche zurückgeführt werden kann (Vgl. Abbildung 11), ist Myristinsäure (**3**) somit ab einer Konzentration von ca. 25 μM kompetitiv zur NBD-markierten C_{12} -Fettsäure **8** ($K_I = 7.7 \pm 1.6 \mu\text{M}$). Im Konkurrenzexperiment mit Myristinsäuremethylester (**9**) ist bis zu einer Konzentration von ca. 100 μM eine relativ konstante FI zu sehen (Abbildung 22B). Die Daten aus beiden Konkurrenzexperimenten stimmen somit mit den Beobachtungen aus eigenen Arbeiten^[326] überein, erklären aber noch nicht die Ursache für die konstanten FI-Werte.

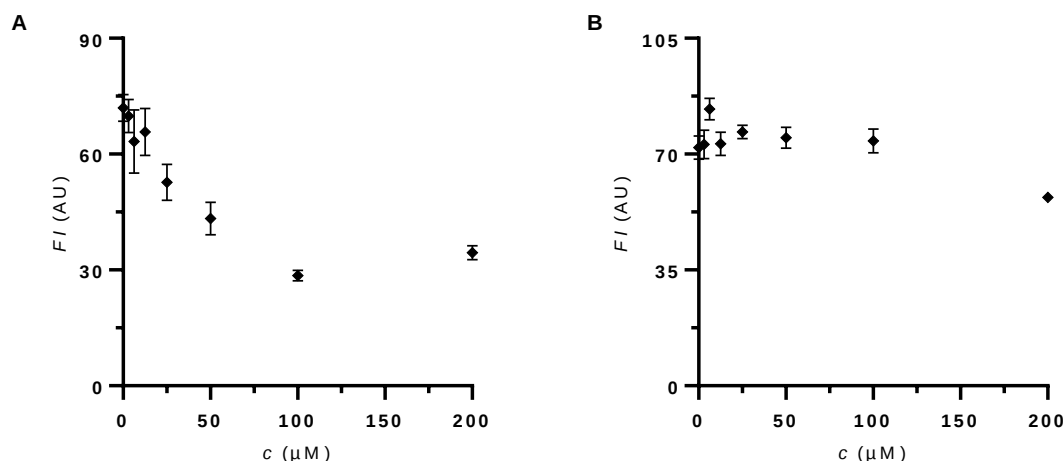


Abbildung 22: Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -**8**/HSA (je 25 μM) mit: A) Myristinsäure (**3**). B) Myristinsäuremethylester (**9**).

Nach dem Prinzip des Assays führt nur eine Polaritätsveränderung in der Umgebung von NBD- C_{12} **8** zu einer Fluoreszenzänderung (Anstieg oder Abnahme). Demnach ist die konstante Fluoreszenzintensität auf die Bindung von Myristinsäuremethylester (**9**) in einer anderen Bindetasche von HSA zurückzuführen. Die Beobachtung einer konstanten Fluoreszenzintensität wurde in eigenen Arbeiten^[326] auch bei der Verwendung von Ibuprofen (**4**) gemacht. Die Tatsache, dass Ibuprofen (**4**) in Sudlow-Site II bindet, stützt die Hypothese der Bindung in einer anderen Bindetasche von HSA.

Somit konnte bestätigt werden, dass die fluoreszenzmarkierte C_{12} -Fettsäure **8** durch Myristinsäure (**3**) ($K_I = 7.7 \pm 1.6 \mu\text{M}$, siehe Abbildung 22) verdrängt wird und eine

Carboxylgruppe in der Bindestelle von NBD- C_{12} **8** scheinbar erkannt wird (siehe Abbildung 22B). Dies legt die Vermutung nahe, dass diese funktionelle Gruppe allgemein für die Bindung in dieser Bindestasche notwendig ist. Die Carboxylgruppe einer Fettsäure wurde von *Hamilton et al.*^[332] als quasi fixiert innerhalb der Bindestasche beschrieben, was seiner Ansicht nach die starken ionischen Kräfte widerspiegelt, die bei der Bindung einer Fettsäure eine Rolle spielen. Der hydrophobe Schwanz ist vergleichsweise flexibel. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse aus (eigenen) Vorarbeiten^[320, 326] (Bindungsstöchiometrie 1:1, $K_D = 11.6\text{--}12.9 \mu\text{M}$, Carboxylgruppe notwendig, Myristinsäure (**3**) kompetitiv) für die Bindung von NBD- C_{12} **8** an HSA reproduziert und zusätzlich mittels Gleichgewichtsdialyse bestätigt werden konnten. Daher ist die NBD-markierte Fettsäure **8** als hochaffiner, spezifischer Marker zur Untersuchung einer Fettsäurebindestelle an HSA geeignet. Auch die verwendeten Methoden (Titrations- und Konkurrenzexperimente, *Job*-Plots) und Techniken (Gleichgewichtsdialyse) eignen sich zur Untersuchung dieser Bindestelle.

Um weitere, natürlich vorkommende Fettsäuren zu identifizieren, die in dieser Fettsäurebindestelle binden, wurden Capronsäure (C_6 , **25**), Caprylsäure (C_8 , **26**), Caprinsäure (C_{10} , **27**), Laurinsäure (C_{12} , **28**), Palmitinsäure (C_{16} , **29**) und Stearinsäure (C_{18} , **30**) in Konkurrenzexperimenten mit NBD- C_{12} -**8**/HSA getestet.

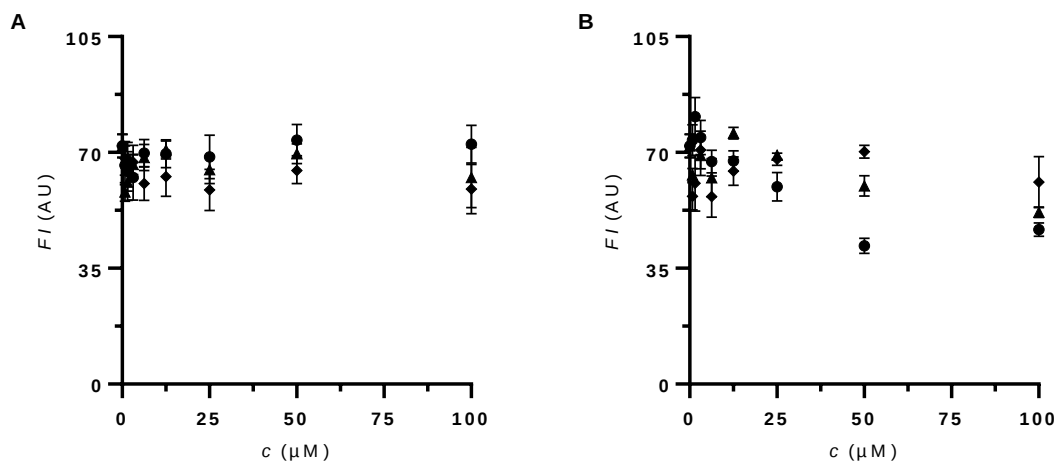


Abbildung 23: Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -**8**/HSA (je $25 \mu\text{M}$) mit: A) Capronsäure ($\bullet$), Caprylsäure ($\blacktriangle$) und Caprinsäure ($\blacklozenge$). B) Laurinsäure ($\bullet$), Palmitinsäure ($\blacktriangle$) und Stearinsäure ($\blacklozenge$).

Sowohl bei den mittelkettigen Fettsäuren^[333] $C_8\text{--}C_{10}$ **26–27**, wie auch bei Capronsäure (**25**) und den langkettigen Fettsäuren $C_{16}\text{--}C_{18}$ (**29–30**) ist eine konstante FI zu beobachten. Basierend auf den Beobachtungen bei Myristinsäuremethylester (**9**) binden die Fettsäuren **25–27** und **29–30** somit in einer anderen Bindestelle, die zu keiner

konformationellen Änderung von HSA führt (Vgl. Abbildung 22B). Diese Vermutung wird durch Arbeiten von Wade^[174] unterstützt, da Stearinsäure (**30**) seinen Studien nach in Sudlow-Site II bindet. Lediglich bei Laurinsäure (**28**) kann ab einer Konzentration von ca. größer 25 μM (K_{I} (**28**) = $9.9 \pm 1.8 \mu\text{M}$) eine Verdrängung von NBD- C_{12} **8** beobachtet werden.

Die NBD-markierte Fettsäure **8** wurde von Petry^[319] als spezifischer Binder für die Fettsäurebindestelle vollständig charakterisiert. Der Einfluss des Fluoreszenzlabels auf die Bindung an HSA wurde jedoch nicht untersucht. Daher wurde [2,3- $^3\text{H}_2$]-Myristinsäure (**^T3**) ausgehend von (2*E*)-Tetradecen-2-säure durch Hydrierung mit Tritiumgas synthetisiert (Abbildung 24) und in radioaktiven Gleichgewichtsdialysen mit HSA eingesetzt, um die K_{D} -Werte von NBD- C_{12} **8** und [2,3- $^3\text{H}_2$]-Myristinsäure (**^T3**) direkt miteinander vergleichen und den Einfluss des NBD-Labels quantifizieren zu können (Abbildung 25A–B). Zusätzlich wurden [2,3- $^3\text{H}_2$]-Laurinsäure (**^T28**) und [2,3- $^3\text{H}_2$]-Palmitinsäure (**^T29**) synthetisiert und ebenfalls gegen HSA dialysiert (Abbildung 25C–D).

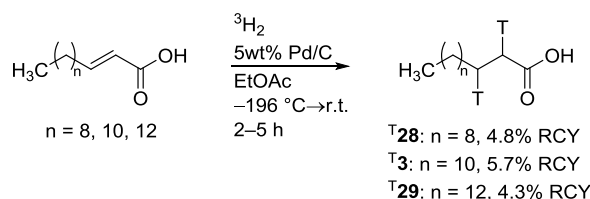


Abbildung 24: Synthese von [2,3- $^3\text{H}_2$]-Myristinsäure (**^T3**), [2,3- $^3\text{H}_2$]-Laurinsäure (**^T28**) und [2,3- $^3\text{H}_2$]-Palmitinsäure (**^T29**).

Der Anteil gebundener [^3H]-markierter Fettsäure **^T3**, **^T28** und **^T29** steigt wie zu erwarten für alle drei Fettsäuren an. Unter den getesteten Konzentrationsbedingungen für HSA ist jedoch nicht bei allen Fettsäuren eine Sättigung zu erkennen (Abbildung 25C). Aufgrunddessen war es nicht möglich, die K_{D} von [2,3- $^3\text{H}_2$]-Laurinsäure (**^T28**) zu berechnen. Bei [2,3- $^3\text{H}_2$]-Palmitinsäure (**^T29**) ist zwar eine Sättigung zu beobachten (Abbildung 25D), der berechnete K_{D} -Wert ($K_{\text{D}} = 1.09 \pm 0.34 \mu\text{M}$) liegt jedoch in der gleichen Größenordnung wie der K_{D} -Wert von [2,3- $^3\text{H}_2$]-Myristinsäure (**^T3**). Für die lipophilere C_{16} -Fettsäure **^T29** wurde ein deutlich niedrigerer K_{D} -Wert erwartet, weshalb vermutlich die experimentellen Bedingungen ($\text{pH} = 7.08$) für Palmitinsäure (**29**) nicht geeignet sind. Löslichkeitsprobleme oder Mizellenbildung stellen hierfür mögliche Ursachen dar.

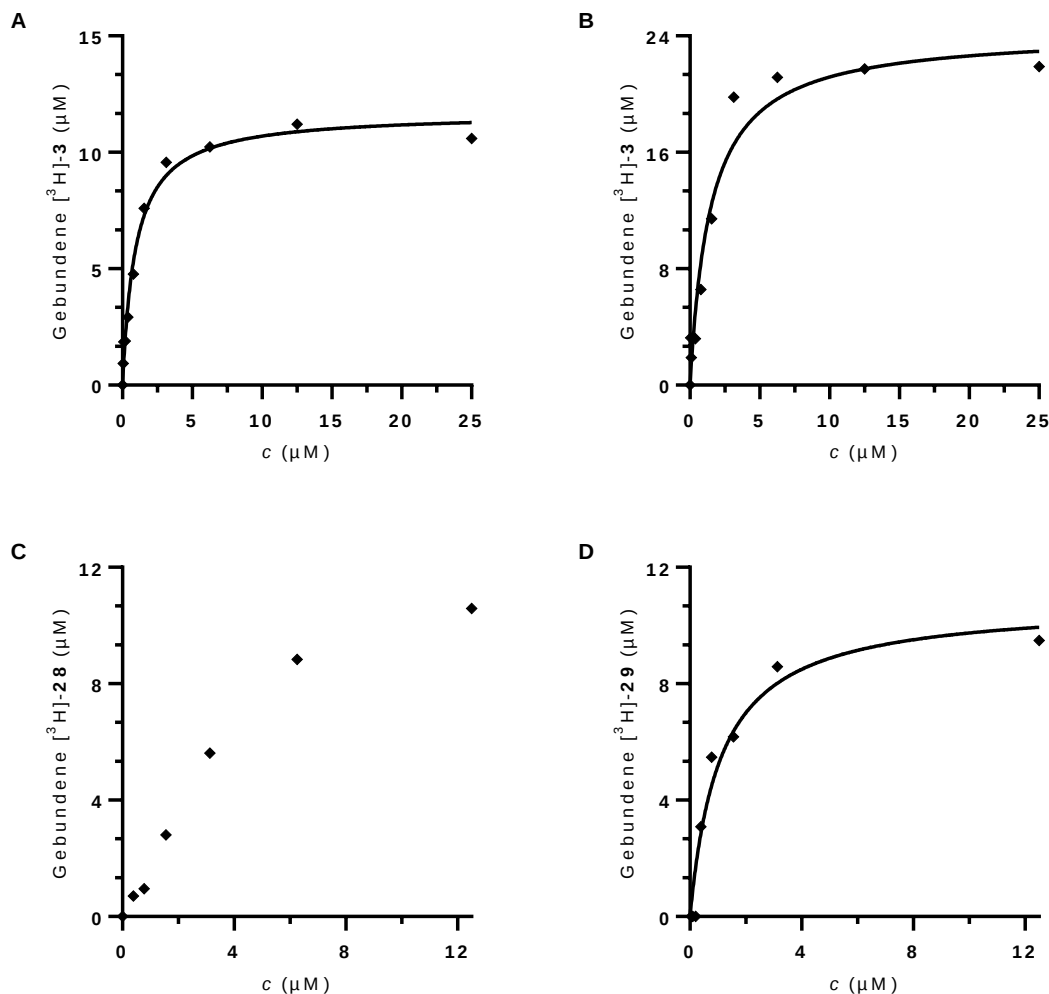


Abbildung 25: Anteil gebundener Fettsäure bei steigender HSA-Konzentration: A) $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Myristinsäure ($^T\mathbf{3}$) ($12.5\text{ }\mu\text{M}$). B) $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Myristinsäure ($^T\mathbf{3}$) ($25\text{ }\mu\text{M}$). C) $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Laurinsäure ($^T\mathbf{28}$) ($12.5\text{ }\mu\text{M}$). D) $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Palmitinsäure ($^T\mathbf{29}$) ($12.5\text{ }\mu\text{M}$).

In Tabelle 2 sind die experimentell ermittelten und publizierten Dissoziationskonstanten von Myristinsäure (**3**) und Palmitinsäure (**29**) aufgeführt.

Die experimentell ermittelten K_D -Werte von $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Myristinsäure ($^T\mathbf{3}$) sind unter Beachtung des Fehlers miteinander vergleichbar. Die Einführung des NBD-Fluorophors führt somit zu einer Reduktion der Affinität um ungefähr einen Faktor 20 (Vgl. Tabelle 1), verhindert aber nicht die spezifische Bindung der Fettsäure.

Tabelle 2: Experimentell ermittelte und publizierte K_D -Werte von Myristinsäure (3) und Palmitinsäure (29).

Quelle	Technik	K_D Myristinsäure (3)	K_D Palmitinsäure (29)
Eigene Daten ^a	radioakt. Gleichgewichtsdialyse	$0.94 \pm 0.12^b \mu\text{M}$ $1.47 \pm 0.29^c \mu\text{M}$	$1.09 \pm 0.31 \mu\text{M}$
Ashbrook et al. ^[124]	Verteilungsanalyse	47 nM	16 nM
Fang et al. ^[152]	ITC	100 nM	-
Pedersen et al. ^[233]	radioakt. Gleichgewichtsdialyse	31 nM	-
Goodman ^[125]	Verteilungsanalyse	250 nM	17 nM
Anguizola et al. ^[126]	HPAC	286 nM	3.33 μM
Richieri et al. ^[127]	ADIFAB ^d	-	7 nM

^a Daten von $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Fettsäuren. ^b $12.5 \mu\text{M}$ $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Myristinsäure (¹3). ^c $25 \mu\text{M}$ $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Palmitinsäure (¹29).

^d ADIFAB: acrylodated intestinal fatty acid binding protein.

Allerdings sind die eigenen, experimentellen Daten von Myristinsäure (3) im Vergleich zu den Literaturwerten um den Faktor 4–20 höher. Unter physiologischen Bedingungen wäre bei einer langkettigen Fettsäure wie Myristinsäure (3) eine Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich nicht sinnvoll, da alle Fettsäurebindestellen von HSA, die beiden Wirkstoffbindestellen miteingeschlossen, besetzt werden würden. Dem Protein wäre es dann allerdings nicht mehr möglich eine wichtige Aufgabe, die Bindung und den Transport vielfältiger Substanzen,^[1, 3-4, 7-9, 34, 95-97] wahrzunehmen. Die Diskrepanzen zwischen den K_D -Werten aus den eigenen Experimenten und der Literatur können nicht abschließend erklärt werden, u.a. weil unterschiedliche Techniken (Verteilungsanalyse, HPAC, ITC, Gleichgewichtsdialyse)^[124-125, 152] angewendet wurden. Vermutlich variierte auch der Fettsäuregehalt der eingesetzten HSA. Zu der Studie von Means^[152] kann erwähnt werden, dass die Verdünnungswärme des Proteins bei den Untersuchungen mittels ITC nicht beachtet wurde. Für die Verteilungsanalysen wurde in Phosphatpuffer gelöste HSA mit *n*-Heptan, in dem die zu untersuchende Fettsäure gelöst war, gemischt.^[124-125] *n*-Heptan ist in Wasser zwar sehr schlecht löslich (0.3 mg *n*-Heptan pro Liter Wasser)^[334], ein geringer Teil des organischen Lösungsmittels könnte dennoch an HSA binden. Karush^[306] beobachtete in Bindestudien an BSA eine reduzierte Bindeaffinität von anionischen Liganden in Anwesenheit von Toluol und führte dies auf die Bindung des Lösungsmittels an BSA zurück. Ob sich *n*-Heptan auf die Tertiärstruktur

von HSA auswirkt und z.B. partiell eine Denaturierung des Proteins hervorruft,^[125] ist nicht bekannt.

Die Bindung der NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** an HSA ist vollständig charakterisiert, die genaue Bindestelle aber noch unbekannt. Ein erster Anhaltspunkt über die genaue Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** wurde in eigenen Arbeiten^[326] erhalten. Sulfasalazin (**6**), das nach Równicka-Zubik et al.^[136] in Sudlow-Site I bindet, zeigte sich kompetitiv zur NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** und zur NBD-markierten Gallensäure **24**. Mit Balsalazid (**22**) wurde ebenfalls eine Konkurrenz mit NBD-C₁₂ **8** als auch mit der NBD-markierten Gallensäure **24** beobachtet,^[326] allerdings liegen zu diesem Wirkstoff bisher keine Erkenntnisse über die Bindestelle an HSA in der Literatur vor. Erstaunlicherweise wird NBD-C₁₂ **8** nicht von Warfarin (**2**), einem sehr stark bindenden (Wirkstoffbindung >90%),^[1] bekannten Sudlow-Site I-Binder, verdrängt (Abbildung 26).

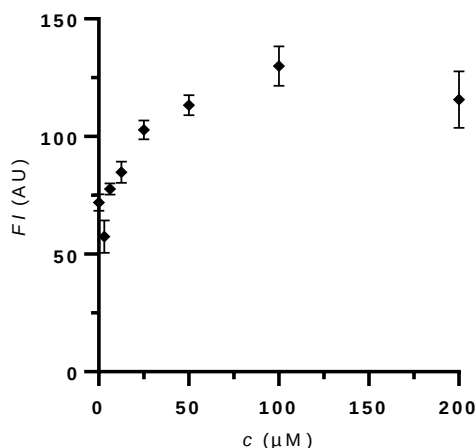


Abbildung 26: A) Konkurrenzexperiment von NBD-C₁₂-**8**/HSA (je 25 μM) mit Warfarin (**2**) (0–200 μM).

Im Konkurrenzexperiment von NBD-C₁₂-**8**/HSA mit Warfarin (**2**) nimmt die Fluoreszenzintensität ab einer Konzentration von ca. 6 μM mit steigender Konzentration an Ligand zu. Eine Beobachtung, die nicht auf eine intrinsische Fluoreszenz von Warfarin (**2**) zurückzuführen ist, da der Arzneistoff nicht bei der Anregungswellenlänge von NBD-C₁₂ **8** ($\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$) absorbiert (Spektrum nicht gezeigt). Curry^[202] erklärte den Anstieg der Fluoreszenzintensität von Dansyl-Aminosäuren nach der Bindung von Fettsäuren mit einer lokalen Änderung der Umgebung des Fluorophors. Er beobachtete eine Verschiebung von Arg-257 um ca. 4 Å. Auch bei der Zugabe von Warfarin (**2**) zum NBD-C₁₂-**8**/HSA-Komplex könnte die Zunahme der Fluoreszenzintensität durch eine Änderung der unmittelbaren Umgebung von NBD-C₁₂ **8** an HSA hervorgerufen werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass beide Substanzen in zwei verschiedenen

Bindetaschen binden und Warfarin (**2**) eine Konformationsänderung von HSA induziert, die auch lokale Änderungen in der Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** auslöst. Alternativ könnte eine simultane Bindung (Coexistenz) in Sudlow-Site I in Betracht kommen, wie sie bereits bspw. bei den Wirkstoffpaaren AZT/Salicylsäure,^[254] Phenylbutazon/Azapropazon und Indometacin/Azapropazon^[10] von mehreren Gruppen^[9-10, 243, 254] berichtet wurde.

Um weitere Hinweise auf eine simultane Bindung von Warfarin (**2**) und der NBD-markierten Fettsäure **8** zu erhalten, wurde wiederum eine Titrationskurve (Vgl. Abbildung 16A–C) aufgenommen. Dazu wurde HSA mit Warfarin (**2**) inkubiert und verschiedene Konzentrationen an NBD-C₁₂ **8** zu dem Warfarin (**2**)/HSA-Komplex hinzutitriert (Abbildung 27). Die Titrationskurven von HSA mit und ohne Warfarin (**2**) wurden übereinander gelegt, um Veränderungen direkt erkennen zu können (Abbildung 27).

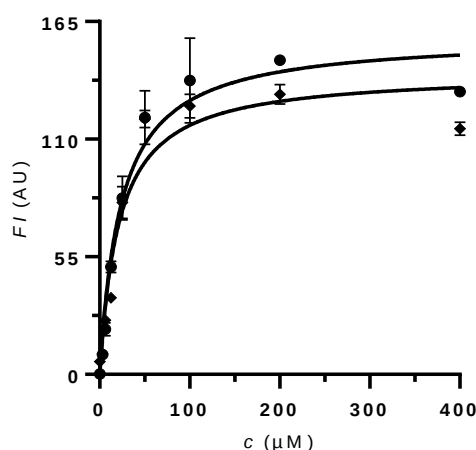


Abbildung 27: Titrationskurve von NBD-C₁₂ **8** (0–400 µM) zum Warfarin (**2**)/HSA-Komplex (•, je 25 µM) und zu HSA (♦, 25 µM).

Die beiden Titrationskurven von NBD-C₁₂ **8** zeigen initial die gleiche Steigung und sind bis zu einer Konzentration von ca. 50 µM als identisch einzustufen. Ab höheren Konzentrationen ist die Fluoreszenzintensität bei dem Experiment mit Warfarin-inkubierter HSA im Mittel um einen FI-Wert von 15 höher, was auf eine vergleichsweise unpolare Umgebung vom NBD-C₁₂ **8** zurückgeführt werden könnte und sich mit den bisherigen Beobachtungen deckt (siehe Ausführungen zu Abbildung 26). Die K_D-Werte von NBD-C₁₂ **8** sind sowohl mit als auch ohne Warfarin (**2**) vergleichbar (K_D (HSA) = 21.6 ± 2.9 µM, K_D (Warfarin-(**2**)/HSA) = 23.5 ± 4.3 µM). Demzufolge wird die Bindung von NBD-C₁₂ **8** an HSA nicht durch bereits gebundenes Warfarin (**2**) beeinflusst. In Verbindung mit der 1:1 Bindungsstöchiometrie, die in den Job-Plots (siehe Abbildung 21) zu erkennen war und eine alternative Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** an HSA bei den

untersuchten Konzentrationen ausschließt, ist die simultane Bindung von Warfarin (2) und der NBD-markierten Fettsäure **8** in Sudlow-Site I sehr wahrscheinlich. Eine simultane Bindung könnte auch die Zunahme der Hydrophobie infolge der Verdrängung von Wassermolekülen aus der Bindetasche heraus erklären.

Weitere Anhaltspunkte zur Identifizierung der Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** an HSA könnte ein Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) liefern. Im Vergleich zu anderen Albuminen besitzt humanes Serum-Albumin nur ein Tryptophan (Trp-214), das sich in Sudlow-Site I befindet.^[45] Bei einem positiven FRET wäre die Bindung von NBD-C₁₂ **8** in der Nähe von Trp-214 bzw. in Sudlow-Site I sehr wahrscheinlich. Bei einem FRET wird die Energie eines elektronisch angeregten Donor-Moleküls (Grundzustand: D; angeregter Zustand: D*) auf ein Akzeptor-Molekül (Grundzustand: A; angeregter Zustand: A*) übertragen (Gleichung 6).



Die Voraussetzungen für einen effizienten^[335] FRET von D* auf A sind nach der Theorie von Förster u.a. eine geringe Entfernung zwischen Donor und Akzeptor (1–9 nm) sowie ein spektraler Überlapp zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Im Bereich des spektralen Überlapps kann A sofort die emittierten Photonen von D* absorbieren, da diese eine geeignete Energie besitzen. Die Effizienz des FRET's sinkt mit dem Abstand (R) zwischen Donor und Akzeptor mit dem Faktor R⁶ (Gleichung 7).^[335]

$$E_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad \text{Glg. 7}$$

R₀: charakteristischer Parameter eines bestimmten Donor-Akzeptor-Paares

FRET-Experimente wurden u.a. von Chignell^[162] erfolgreich für Bindestudien mit Warfarin (2) an HSA durchgeführt. Zur Evaluierung der Methode wurde das FRET-Experiment mit Warfarin (2) und HSA nachgestellt. Abbildung 28A zeigt den für einen Energieübertrag notwendigen spektralen Überlapp. Im Anschluss wurden neun HSA-Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Warfarin (2) (0–800 µM) versetzt und inkubiert. Das Fluoreszenzspektrum von HSA ist in Abhängigkeit von der zugegebenen Konzentration an Warfarin (2) gezeigt (Abbildung 28B). Die Fluoreszenz von HSA sinkt wie zu erwarten mit zunehmender Konzentration an Warfarin (2) (Abbildung 28B).

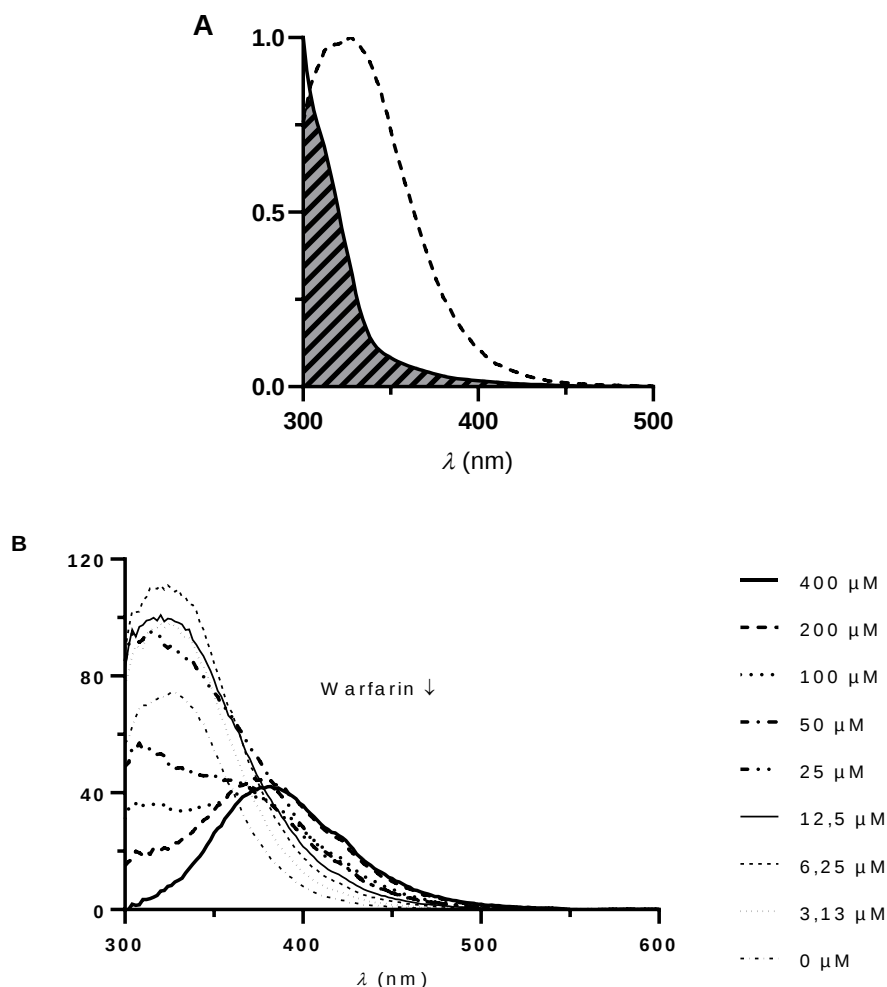


Abbildung 28: A) Fluoreszenzspektrum von HSA (gestrichelt) und Absorptionsspektrum von Warfarin (2) (normiert, 40 µM, spektraler Überlapp: liniert). B) Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{exc} = 280$ nm) von HSA (25 µM) mit zunehmender Konzentration an Warfarin (2) (0–400 µM).

Bei einer Konzentration von ungefähr 400 µM ist nur noch die Fluoreszenz von Warfarin (2) (Fluoreszenzmaximum ca. 382 nm) zu erkennen. Da ein FRET nur bei einem Abstand von wenigen Nanometern zwischen Donor und Akzeptor stattfinden kann, bindet Warfarin (2) somit in Sudlow-Site I. Dieses Ergebnis stimmt mit den kristallographischen^[45] Daten überein und ermöglicht den Einsatz der Methode für Bindestudien mit der NBD-markierten Fettsäure **8**. Dafür wurde zunächst ein Absorptionsspektrum von NBD-C₁₂ **8** aufgenommen und nach der Normierung mit dem Emissionsspektrum von HSA übereinander gelegt. Auch hier ist der spektrale Überlapp gegeben (Abbildung 29A), sodass die Voraussetzung für ein FRET-Experiment gegeben ist. Im Anschluss wurden wiederum neun HSA-Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an NBD-C₁₂ **8** versetzt und die Fluoreszenzspektren von HSA aufgenommen (Abbildung 29B).

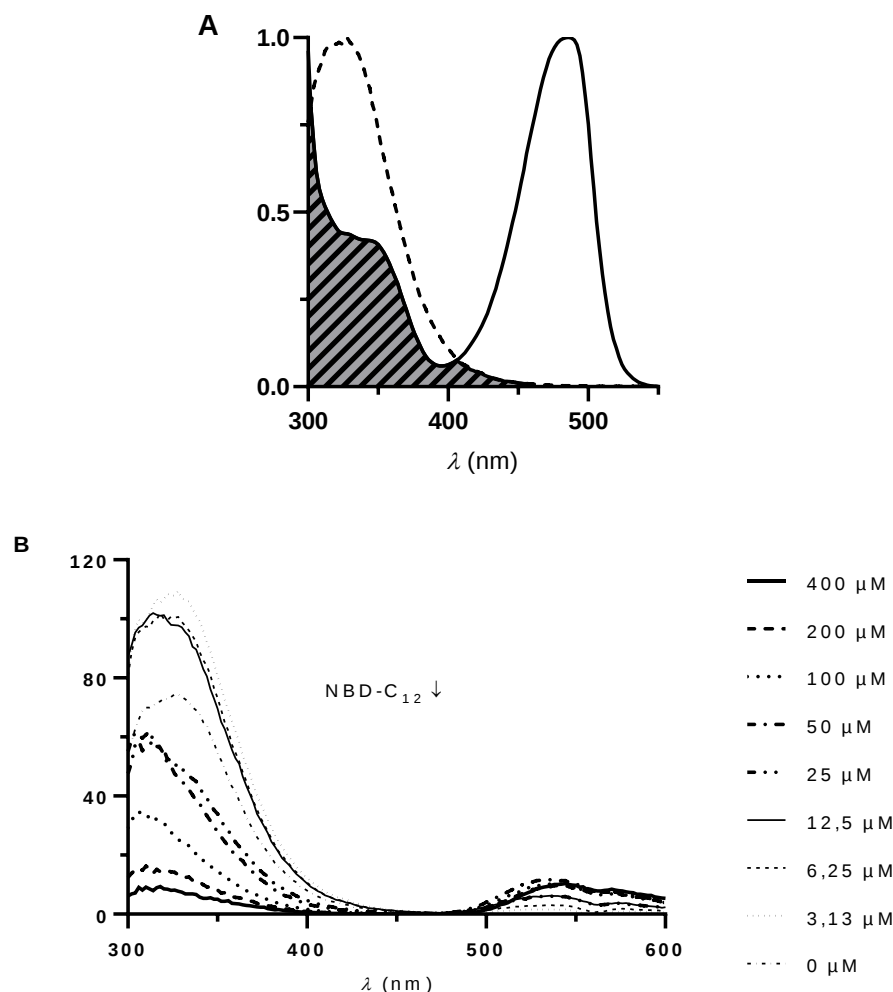


Abbildung 29: A) Fluoreszenzspektrum von HSA (gestrichelt) und Absorptionsspektrum von NBD-C₁₂ **8** (normiert, je 40 µM, spektraler Überlapp: liniert). B) Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{exc} = 280$ nm) von HSA (25 µM) mit zunehmender Konzentration an NBD-C₁₂ **8** (0–400 µM).

Interessanterweise zeigt Abbildung 29B ab einer Konzentration von ca. 12,5 µM eine Abnahme der Fluoreszenz, die mit steigender Konzentration an NBD-C₁₂ **8** stetig zunimmt. Ein solcher Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer ist wie bereits beschrieben nur möglich, wenn sich Donor und Akzeptor in direkter Nachbarschaft zueinander befinden. Im Vergleich mit Abbildung 28B scheint die FRET-Effizienz bei der NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** nicht so groß wie mit Warfarin (**2**) zu sein, da hier bei einer Konzentration von 400 µM immer noch eine wenn auch geringe Fluoreszenz des Donors zu beobachten ist. Dennoch weist das positive FRET-Experiment auf die Bindung der NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** in Sudlow-Site I hin. Dies deckt sich mit dem Ergebnis des Konkurrenzexperiments mit Sulfasalazin (**6**), der beobachtete Fluoreszenzanstieg bei der Zugabe von Warfarin (**2**) zum NBD-C₁₂-**8**/HSA-Komplex bleibt aber ungeklärt.

Iophenoxinsäure (5) bindet fluoreszenzspektroskopischen^[172, 235, 242] und kristallographischen^[258] Studien zufolge primär in Sudlow-Site I. In eigenen Arbeiten^[326] konnte dies im Wettbewerbsexperiment mit der NBD-markierten Gallensäure 24 (Abbildung 14) bestätigt werden. Wie zu erwarten, ist Iophenoxinsäure (5) auch im Wettbewerbsexperiment von Warfarin (2)-/HSA als spezifischer Marker für Sudlow-Site I kompetitiv ($K_I = 2.5 \pm 1.7 \mu\text{M}$) (Abbildung 30A).

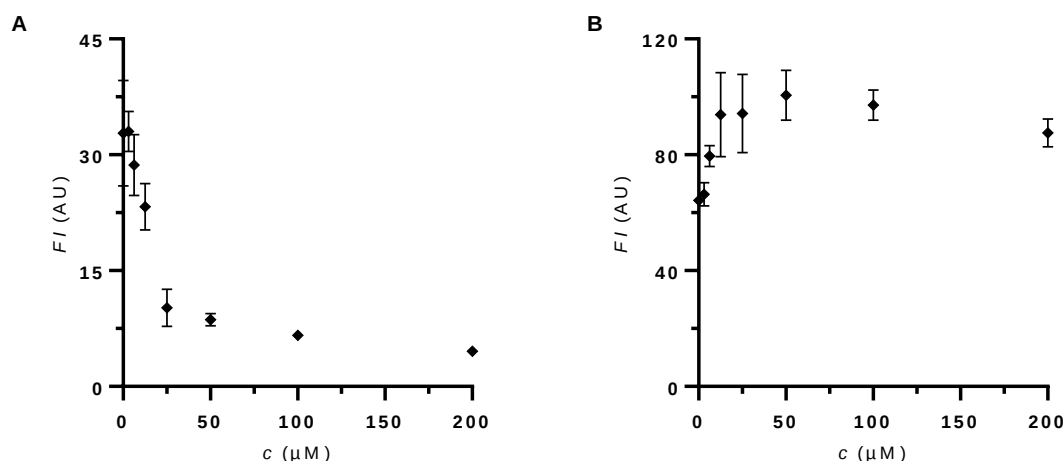


Abbildung 30: Wettbewerbsexperimente mit Iophenoxinsäure (5): A) Warfarin (2)-/HSA (je 25 µM). B) NBD-C₁₂-8/HSA (je 25 µM).

Im Wettbewerbsexperiment von NBD-C₁₂-8/HSA mit Iophenoxinsäure (5) ist wiederum ein Anstieg der Fluoreszenzintensität von NBD-C₁₂ 8 zu erkennen (Abbildung 30B). Diesen Beobachtungen nach binden zwar alle drei Substanzen in Sudlow-Site I, die Bindung von Iophenoxinsäure (5) und Warfarin (2) erfolgt aber wahrscheinlich aufgrund der Konkurrenz in der gleichen Sub-Site. Daher wurde ein FRET-Experiment geplant, das die Titration von NBD-C₁₂ 8 zu Iophenoxinsäure (5) gebundener HSA vorsieht, um einen Hinweis auf die Coexistenz von NBD-C₁₂ 8 und Iophenoxinsäure (5) in Sudlow-Site I zu erhalten. Der spektrale Überlapp ist in Abbildung 31A gezeigt. Auch bei diesem Versuchsaufbau kann ein FRET beobachtet werden (Abbildung 31B).

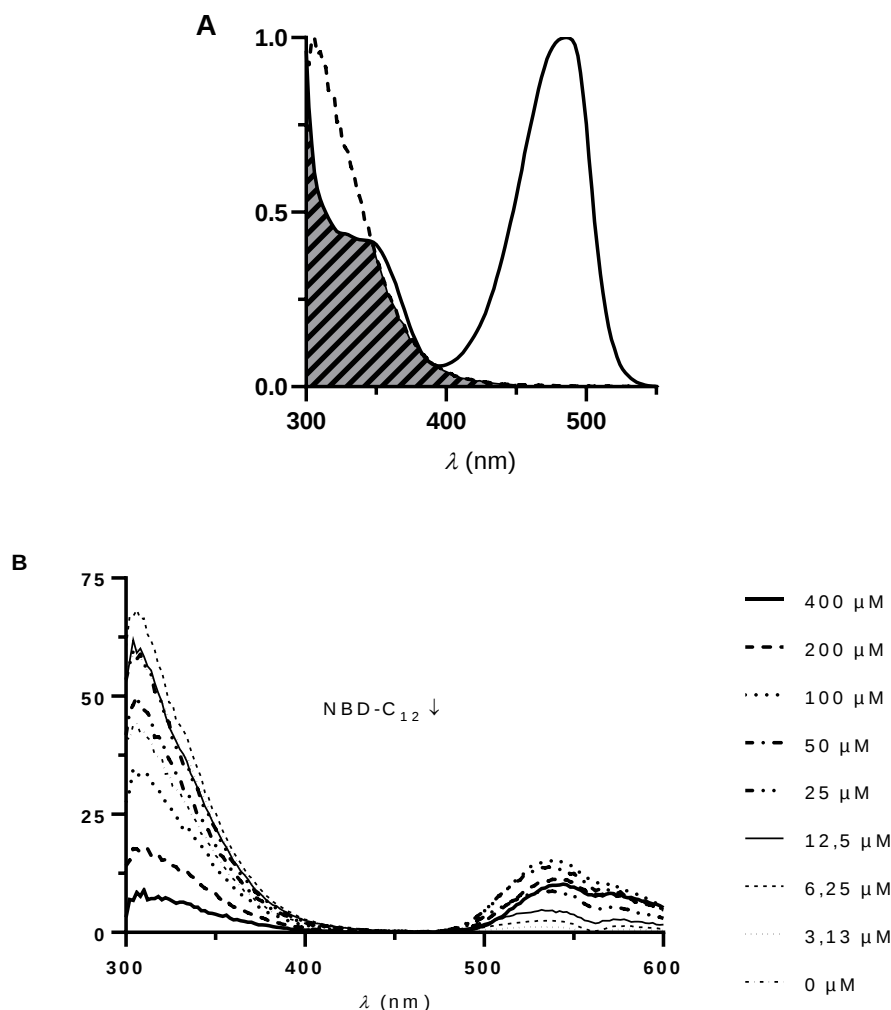


Abbildung 31: A) Fluoreszenzspektrum vom Iophenoxinsäure-(5)-/HSA-Komplex (je 25 μ M, gestrichelt) und Absorptionsspektrum von NBD- C_{12} 8 (normiert, 40 μ M, spektraler Überlapp: liniert). B) Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{exc} = 280$ nm) vom Iophenoxinsäure-(5)-/HSA-Komplex (je 25 μ M) mit zunehmender Konzentration an NBD- C_{12} 8 (0–400 μ M).

Ein sehr kleiner spektraler Überlapp zwischen Iophenoxinsäure (5) und HSA ist zwar gegeben (Abbildung 32), aber Iophenoxinsäure (5) emittiert keine Strahlung. Daher ist die charakteristische Fluoreszenz im Bereich von ca. 500–600 nm mit einem Maximum bei ungefähr 532 nm (Abbildung 31B) dem NBD-Farbstoff zuzuordnen und auf einen FRET zwischen NBD- C_{12} 8 und Trp-214 zurückzuführen. Dies ist nicht nur ein deutlicher Hinweis auf eine Coexistenz von Iophenoxinsäure (5) und der NBD-markierten Fettsäure 8 in Sudlow-Site I, sondern das FRET-Experiment unterstützt die Hypothese mehrerer Autoren,^[9, 12, 167, 251, 280] wonach Sudlow-Site I aus mehreren Sub-Sites aufgebaut ist. Diesen Ergebnissen zufolge binden NBD- C_{12} 8 und Iophenoxinsäure (5) bzw. Warfarin (2) in zwei verschiedenen Sub-Sites.

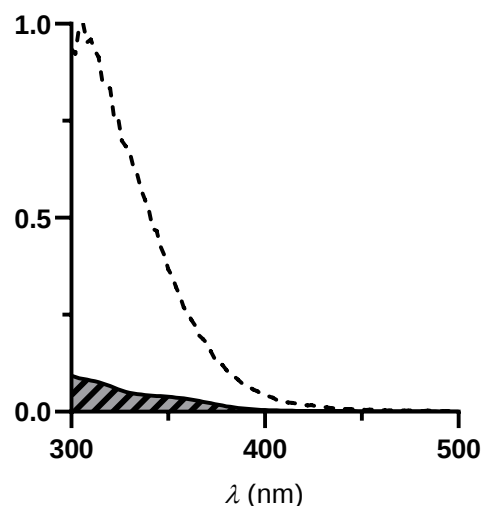


Abbildung 32: Fluoreszenzspektrum von HSA (gestrichelt) und Absorptionsspektrum von Iophenoxinsäure (5) (normiert, je 40 μM , spektraler Überlapp: liniert).

Das Sättigungsexperiment von NBD- C_{12} **8** an Warfarin gebundener HSA und die verschiedenen FRET-Experimente weisen auf die Bindung von NBD- C_{12} **8** in einer Sub-Site von Sudlow-Site I hin, bewiesen ist die Bindung in dieser Bindetasche damit allerdings noch nicht. Daher sollte versucht werden, HSA mit NBD- C_{12} **8** nach dem Hanging-Drop-Verfahren (siehe Abschnitt 1.2) zu kokristallisieren. In einigen Kristallisationsstudien wurde Myristinsäure (**3**) als Stabilisator^[10, 70, 92, 201-202, 254-257] eingesetzt, da reine HSA-Kristalle als zerbrechlich^[4, 336] beschrieben werden und dies das weitere Kristallhandling (z.B. Fischen) deutlich erschwert. Die Fragilität der HSA-Kristalle wird vermutlich der anderen Kristallpackung von fettfreier HSA zugrundeliegen. Myristinsäure (**3**)/HSA-Kristalle haben aufgrund ihrer Stabilität den Vorteil, dass sie für das Soaking geeignet sind. Dabei werden diese Kristalle mit einer Lösung der zu kristallisierenden Substanz versetzt, damit die Moleküle durch die Lösungsmittelkanäle hindurch diffundieren und in der Bindetasche binden können.^[4] Problematisch ist an dieser Stelle jedoch, dass sich Myristinsäure (**3**) im Competitionsexperiment kompetitiv zu NBD- C_{12} **8** zeigte. Diesem Ergebnis nach wäre es somit nicht möglich, eine Kokristallstruktur von der NBD-markierten Fettsäure **8** und HSA mit Myristinsäure (**3**) als Stabilisator zu erhalten, da Myristinsäure (**3**) NBD- C_{12} **8** aus der Bindetasche verdrängen würde. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden erste Kokristallisationsversuche mit der NBD-markierten C_{12} -Fettsäure **8** und fettfreier HSA (Fettsäuregehalt: $\leq 0.02\%$; A3287 von der Firma *Sigma*) unter Zugabe von Myristinsäure (**3**) durchgeführt. Unter den genannten Kristallisationsbedingungen konnte keine

Cokristallstruktur von HSA mit NBD-C₁₂ **8** erhalten werden. Im Umkehrschluss bedeutet dies auch, dass die Methode des Soakings mit bereits präparierten Myristinsäure (3)/HSA-Kristallen nicht angewendet werden kann, da die Bindestelle der NBD-markierten Fettsäure **8** bereits durch die affinere Myristinsäure (3) besetzt wäre und diese nicht durch NBD-C₁₂ **8** verdrängt werden kann.

Um dennoch eine Cokristallstruktur von HSA mit NBD-C₁₂ **8** zu erhalten, wurden neue Stabilisatoren gesucht. Als Alternativen wurden Stearinsäure (30), Palmitinsäure (29) und Warfarin (2) gewählt. Die C₁₆-Fettsäure **29** ist zwar ab einer Konzentration von ca. größer 50 µM kompetitiv (siehe Abbildung 23) zur NBD-markierten Fettsäure **8** (Verhältnis NBD-C₁₂ **8** /Palmitinsäure (29), 1:2), bei den Kristallisationsansätzen würde das Ligand/Stabilisator-Verhältnis aber nur bei 2:1 liegen, sodass NBD-C₁₂ **8** nicht durch Palmitinsäure (29) aus der Bindetasche verdrängt werden sollte. Die Eignung von Stearinsäure (30) ist gegeben, da es nicht kompetitiv zu NBD-C₁₂ **8** ist. Warfarin (2) bindet den bisherigen Daten (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27) zufolge simultan in der gleichen Bindestelle wie die NBD-C₁₂ **8**, könnte aber vielleicht aufgrund seiner starken Wirkstoffbindung die Konformation von HSA stabilisieren und so zum Erhalt einer Cokristallstruktur führen. Ein komplett neuer Ansatzpunkt ist die Verwendung von NBD-C₁₂ **8** als Stabilisator, da diese Substanz selbst als Struktureinheit eine C₁₂-Fettsäure trägt.

Dimeres HSA (5–20%), das durch intermolekulare Disulfidbrücken ausgehend von Cys-34 gebildet wird,^[4] wurde mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie abgetrennt, um qualitativ hochwertige Kristalle^[255, 259] zu erhalten. Zur Cokristallisation eines Liganden mit HSA wurden von Curry^[4] hohe Ligand-Konzentrationen (Molverhältnis Ligand/HSA, 10:1–40:1) eingesetzt, um die volle Besetzung der Bindetaschen und somit auch die Homogenität der Kristalle zu gewährleisten. Gerade bei hydrophoben Substanzen ist hierbei von Nachteil, dass auch sekundäre Bindestellen besetzt werden.^[4] Um die vollständige Besetzung der Bindetasche von NBD-C₁₂ **8** sicherzustellen, gleichzeitig aber auch die Bindung des Liganden **8** in niederaffinen Bindestellen zu verhindern, wurde das Molverhältnis Ligand/HSA unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Titrationsexperimenten (siehe Abbildung 16A–C) und aus den Job-Plots (siehe Abbildung 21A–B) gewählt. Die Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** ist bei einem Ligand/HSA-Verhältnis von maximal 6:1 vollständig besetzt. Da die C₁₂-Fettsäure **8** unter den bisher untersuchten Konzentrationen mit einer Bindungsstöchiometrie von 1:1 an HSA bindet, wurde NBD-C₁₂ **8** in Cokristallisationsansätzen mit HSA in einem Molverhältnis von 6:1

eingesetzt. Neben der Verwendung verschiedener Stabilisatoren wurde die Präzipitanslösung variiert, um die optimalen Bedingungen für das Kristallwachstum zu finden. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Präzipitanslösungen, die aus einem Phosphatpuffer, Polyethylenglycol-3350 (PEG-3350) und teilweise 5wt% Glycerol bestanden, ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3: Genaue Zusammensetzung der Präzipitanslösungen zur Cokristallisation von HSA mit NBD- C_{12} 8. Das zugehörige Pipettierschema ist unter Abschnitt 5.7.9 gezeigt.

Well	Phosphatpuffer pH-Wert	PEG-3350 wt%	Glycerol wt%
A1	7.0	21.5	5.0
A2	7.0	23.0	5.0
A3	7.0	24.5	5.0
A4	7.0	26.0	5.0
A5	7.0	27.5	5.0
A6	7.0	29.0	5.0
B1	7.0	30.5	5.0
B2	7.0	32.0	5.0
B3	7.0	33.5	5.0
B4	7.0	35.0	5.0
B5	7.0	36.5	5.0
B6	7.0	38.0	5.0
C1	7.5	21.5	-
C2	7.5	23.0	-
C3	7.5	24.5	-
C4	7.5	26.0	-
C5	7.5	27.5	-
C6	7.5	29.0	-
D1	7.5	30.5	-
D2	7.5	32.0	-
D3	7.5	33.5	-
D4	7.5	35.0	-
D5	7.5	36.5	-
D6	7.5	38.0	-

Um das Kristallwachstum zu induzieren, wurden mit Hilfe eines Schnurrhaares einer Katze kleine Kristallkeime in den HSA/Präzipitanslösung-Tropfen eingebracht (Streak Seeding^[337]). In ersten Kristallisationsversuchen mit fettfreier HSA wurden nach neun Tagen vier Kristalle beobachtet (Abbildung 33A–D).

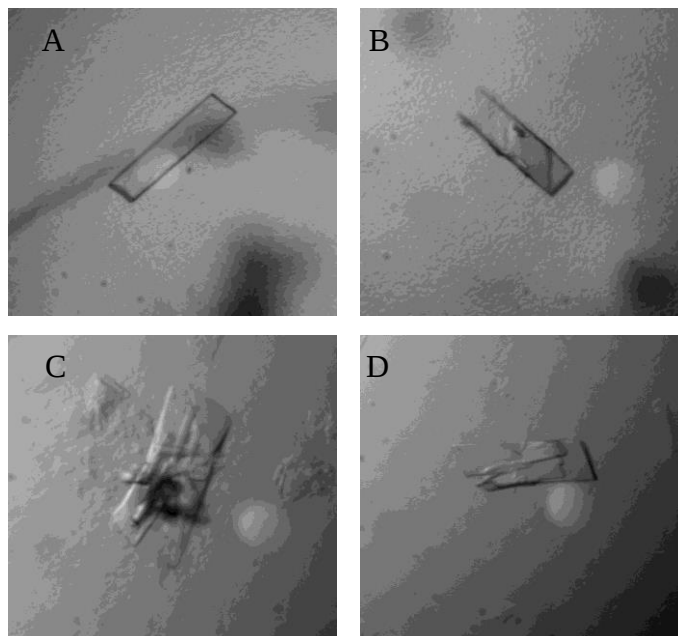


Abbildung 33: Erste Kristalle aus Cokristallisationsversuchen von HSA mit NBD- C_{12} **8**: A–B) Präzipitanslösung A6 (~17% PEG-3350, 0.3% Glycerol, Phosphatpuffer pH 7.0). C–D) Präzipitanslösung D1 (~19% PEG-3350, Phosphatpuffer pH 7.5).

Das Kristallwachstum erfolgte unter Zugabe von Palmitinsäure (**29**) (Abbildung 33A–B) und Stearinsäure (**30**) (Abbildung 33C–D) als Stabilisatoren. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Bildung der Kristalle sowohl mit (Well A6) als auch ohne (Well D1) Glycerol erfolgte und bisher keine Tendenz zu einer geeigneten Präzipitanslösung zu erkennen ist. Nach insgesamt 16 Tagen wurden die vier Kristalle mit einer Nylonschleife aus dem jeweiligen Kristallisationstropfen gefischt und mittels Röntgenstrukturanalyse an der Beamline PX-II des *Paul-Scherrer-Instituts* in Villigen (Schweiz) untersucht. Das Beugungsmuster von Kristall A deutete auf ein kleines Molekül hin, vermutlich die ungebundene NBD-markierte C_{12} -Fettsäure **8**, weshalb die Daten nicht analysiert wurden. Die Streuung der Kristalle B–D war von nicht ausreichender Qualität, weshalb auch hier keine Analyse erfolgte.

Nach diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob der Fettsäuregehalt des eingesetzten fettfreien Albumins ($\leq 0.02\%$) immer noch so hoch ist, dass die Bindung von NBD- C_{12} **8** in der Bindetasche verhindert wird. Daher wurde in weiteren Cokristallisationsversuchen essentiell fettfreie HSA (Fettsäuregehalt: $\leq 0.007\%$; A1887 von der Firma *Sigma*) eingesetzt. Wie in den Ansätzen zuvor wurden Myristinsäure (**3**), Palmitinsäure (**29**),

Stearinsäure (**30**) und die NBD-markierte C₁₂-Fettsäure **8** selbst als Stabilisatoren verwendet. Nach sieben Tagen wurden in Well B6 leicht orangefarbene, gestapelte Plättchen beobachtet, von denen vier Kristalle gefischt und am *Paul-Scherrer-Institut* untersucht wurden. Einer dieser Kristalle erzeugte eine ausreichende Anzahl an Reflexen. Dieser Kristall war deutlich anisotrop und zeigte in Richtung b* mit einer Auflösung von 2.4 Å die beste Streuung. In den anderen beiden Richtungen (a* und c*) wurden jeweils eine Auflösung von 3.1 Å berechnet. Die erhaltene Cokristallstruktur von HSA mit NBD-C₁₂ **8** ist in Abbildung 34 gezeigt.

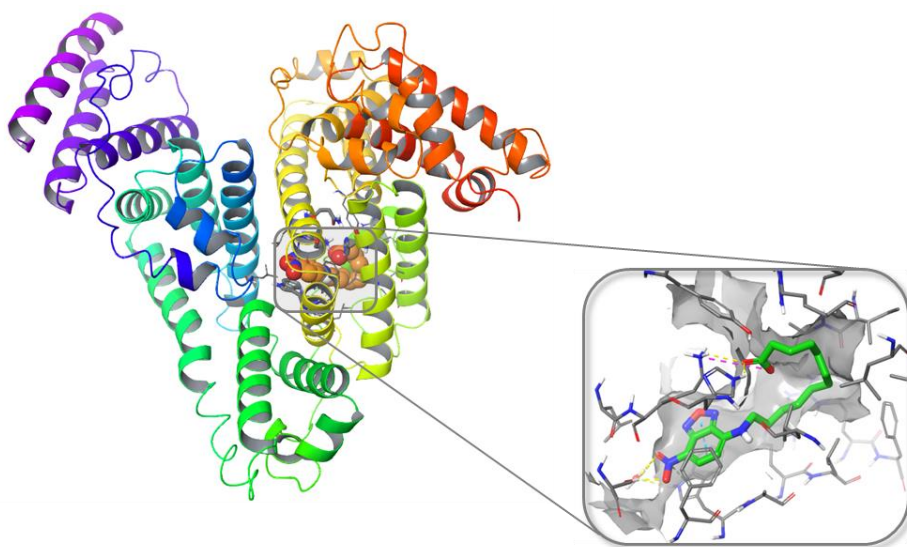


Abbildung 34: Röntgencokristallstruktur von NBD-C₁₂ **8** kokristallisiert mit essentiell fettfreier HSA (PDB^[46] Code: 6ezq^[239], Auflösung 3.0 Å).

Der Komplex aus HSA und NBD-markierter C₁₂-Fettsäure **8** scheint bemerkenswerterweise eine seltene Kristallpackung zu besitzen, die laut Proteindatenbank^[46] bei den bisher veröffentlichten Kristallstrukturen (>90) von HSA nicht beobachtet wurde. Lediglich eine publizierte HSA-Struktur weist eine ähnliche Konformation auf, weshalb die größte Übereinstimmung (2.8% rmsd) mit dieser fettfreien Kristallstruktur (PDB^[46] Code: 1uor^[45]) zu finden ist. Die Elektronendichte des NBD-Restes ist deutlich sichtbar, wohingegen die Elektronendichte der Methylengruppen von der NBD-markierten Fettsäure **8** nur schwach zu erkennen ist (Abbildung 35). Letzteres ist darauf zurückzuführen, dass die Alkylkette aufgrund ihrer Flexibilität in verschiedenen Konformeren vorliegen kann.

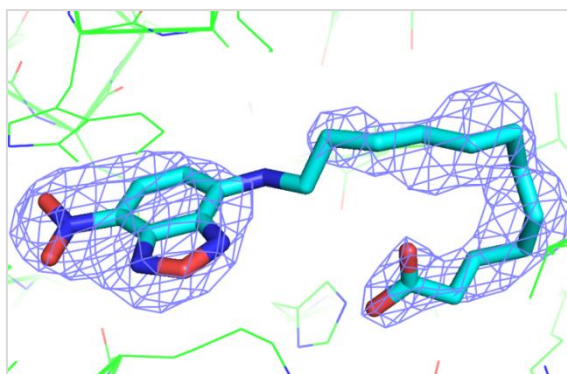


Abbildung 35: Omit-map des gebundenen NBD-C₁₂ **8** in der primären Bindestelle (Sudlow-Site I) (konturiert mit 3 σ).^[239]

Da in der neuen Cokristallstruktur von HSA nur ein Molekül NBD-C₁₂ **8** in Subdomäne IIA (Sudlow-Site I) gebunden vorliegt, kann diese NBD-markierte Fettsäure **8** als hochaffiner, spezifischer Ligand für die Bindestelle innerhalb von Sudlow-Site I bezeichnet werden. Abbildung 36 zeigt die detaillierte Bindung von NBD-C₁₂ **8** in dieser Bindetasche von HSA.

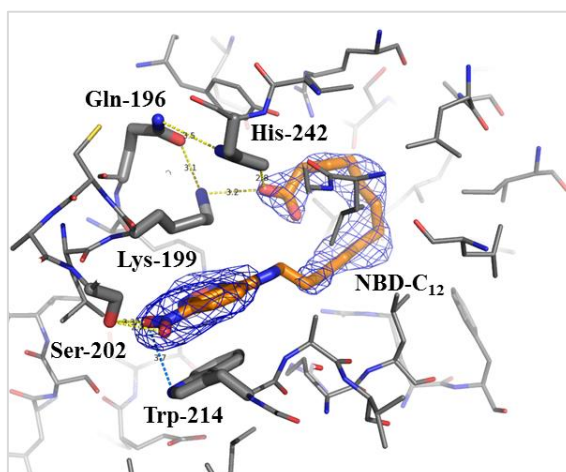


Abbildung 36: Ausschnitt aus der Röntgenkristallstruktur von NBD-C₁₂ **8** kokristallisiert mit essentiell fettfreier HSA (PDB^[46] Code: 6ezq^[239], Auflösung 3.0 Å).

Die Carboxylgruppe von NBD-C₁₂ **8** interagiert mit den Aminosäuren Lys-199 und His-242. Durch eine Veresterung der Carboxylgruppe wird diese Wechselwirkung deutlich reduziert und die Bindungsaffinität letztlich erniedrigt. Die Cokristallstruktur erklärt somit, wie die Carboxylgruppe von Myristinsäure (**3**) und von Carbonsäuren im Allgemeinen erkannt wird und warum Ester wie Myristinsäuremethylester (**9**) eine im Vergleich niedrigere Affinität zu der Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** zeigen. Die Nitrogruppe des Fluoreszenzlabels interagiert mit der Seitenkette von Ser-202, während zwischen dem Indolring des NBD-Labels und Trp-214, die sich in einem Abstand von ungefähr 3.7 Å befinden, π - π -Wechselwirkungen auftreten. Ein Ergebnis, das zu den Beobachtungen auf Basis der FRET-Experimente (siehe Abbildung 29B und Abbildung 31B) passt und die

Vermutung bestätigt, dass Sudlow-Site I die primäre Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** darstellt. Durch dieses Ergebnis wird die Coexistenz von Warfarin (**2**) und NBD-C₁₂ **8** in dieser Bindetasche wahrscheinlicher. Die Cokristallisation von HSA mit beiden, simultan gebundenen Liganden zum Beweis dieser Schlussfolgerung war bisher nicht erfolgreich. Auch die simultanen Cokristallisationsversuche mit Sulfasalazin (**6**) bzw. Balsalazid (**22**) und Warfarin (**2**) als alternativer Nachweis der Coexistenz scheiterten.

Um die genaue Bindestelle von Sulfasalazin (**6**) und Balsalazid (**22**), die beide sowohl zur NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** als auch zu Warfarin (**2**) kompetitiv sind, innerhalb von Sudlow-Site I zu identifizieren, wurden Kristallisationsansätze mit verschiedenen Stabilisatoren (Palmitinsäure (**29**), Stearinsäure (**30**), kein Stabilisator) unter Variation der Präzipitanslösungen (Vgl. Tabelle 3) durchgeführt. Kristalle wurden jedoch nicht erhalten.

Das Wissen, dass die NBD-markierte C₁₂-Fettsäure **8** in Sudlow-Site I bindet, ermöglicht nun auch eine Erklärung dafür, warum im Competitionsexperiment mit Ibuprofen (**4**)^[326] eine konstante Fluoreszenzintensität beobachtet wurde. Der Arzneistoff **4** bindet nach kristallographischen Daten^[45] in Subdomäne IIIA (Sudlow-Site II). HSA ist zwar ein hoch flexibles Protein, aber Studien^[167] zufolge sind die Interaktionen zwischen Sudlow-Site II und großer Teile (Sub-Site Ia und Ic) in Sudlow-Site I gering. Die Bindung von Ibuprofen (**4**) in Sudlow-Site II hat vermutlich daher keine Auswirkungen auf die Bindung von NBD-C₁₂ **8** in Sudlow-Site I und führt somit zu einer konstanten Fluoreszenzintensität.

Bei der weiteren Datenanalyse der Cokristallstruktur war eine zweite, deutlich schwächere Elektronendichte in der Nähe von Tyr-411 in Subdomäne IIIA zu erkennen, die weder Lösungsmittelmolekülen noch den Seitenketten des Proteins zugeordnet werden konnte. Die Cokristallisationsversuche mit der NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** wurden im oberen Sättigungsbereich (NBD-C₁₂-**8**/HSA, 6:1) durchgeführt, weshalb hier nun die beginnende Besetzung der sekundären Bindestelle (Sudlow-Site II) von NBD-C₁₂ **8** an HSA zu sehen ist (Abbildung 37A). Eine interessante Beobachtung, die auf die sequenzielle Besetzung der Fettsäurebindestellen von HSA hinweist. Auch im Sättigungsexperiment mit NBD-C₁₂ **8** (HSA-Konzentration 3 µM) ist die sequenzielle Auffüllung der einzelnen Bindestellen zu beobachten (Abbildung 37B).

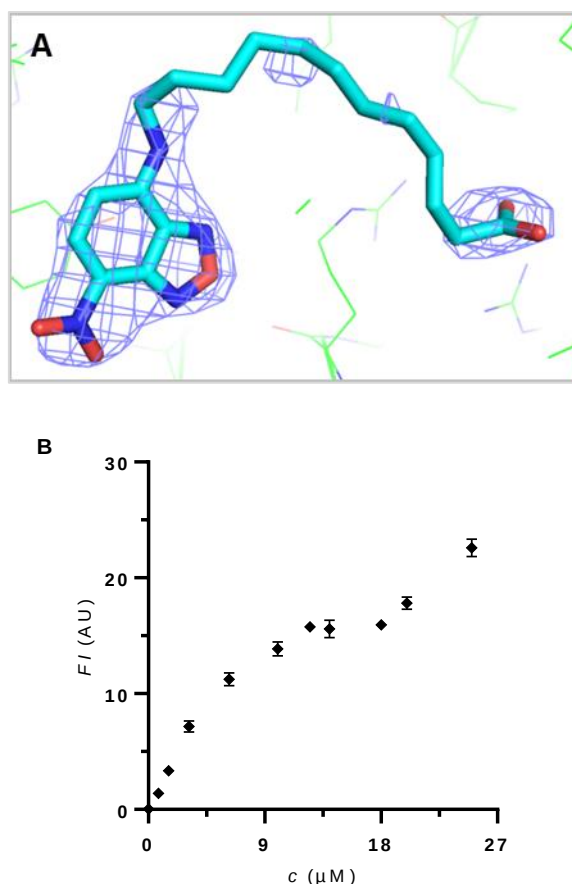


Abbildung 37: A) Omit-map des gebundenen NBD-C₁₂ **8** in der sekundären Bindestelle (Sudlow-Site II) (konturiert mit 3σ).^[239] B) Titrationskurve von NBD-C₁₂ **8** (0–27 μM) zu HSA (3 μM).

Nachdem Sudlow-Site I ungefähr bei einem Verhältnis von 4:1 gesättigt ist, beginnt die Besetzung der sekundären Bindestelle ab einer Ligandkonzentration von ca. 18 μM. Durch dieses Experiment ist nun auch nachvollziehbar, warum in der Röntgenkristallstruktur des NBD-C₁₂-**8**/HSA-Komplexes eine zweite Elektronendichte in Sudlow-Site II gefunden wurde.

Um die kristallographischen Daten hinsichtlich der sekundären Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** mit einer weiteren Technik abzusichern, könnte bspw. ein Konkurrenzexperiment mit einem site-spezifischen Marker für Sudlow-Site II durchgeführt werden. Ein möglicher Farbstoff zur Markierung dieser Wirkstoffbindestelle wäre das von Chang^[181] entwickelte 4-Propyloxy-BODIPY **23**. Darauf wird in Abschnitt 3.3 genauer eingegangen.

3.2 Synthese und Bindestudien von Sulfasalazin-Derivaten zur Erstellung einer Struktur-Affinitäts-Beziehung

Die antiinflammatorisch wirkenden Arzneistoffe Sulfasalazin (**6**) ($K_I = 217.9 \pm 1.5 \mu\text{M}$) und Balsalazid (**22**) ($K_I = 139.8 \pm 2.8 \mu\text{M}$) sind bisher die einzigen Substanzen, die sich in eigenen Arbeiten^[326] als kompetitiv zur NBD-markierten Fettsäure **8** erwiesen haben (Abbildung 38).

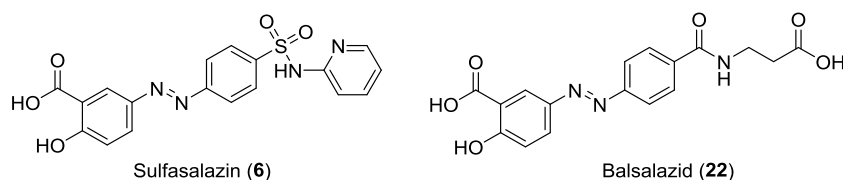


Abbildung 38: Strukturen von Sulfasalazin (**6**) und Balsalazid (**22**).

Daher sollte untersucht werden, welche Struktureinheiten der beiden strukturverwandten Verbindungen **6** und **22** zur Bindung essentiell sind sowie welcher räumliche Anspruch und welche funktionellen Gruppen toleriert werden. Beim Vergleich von Sulfasalazin (**6**) und Balsalazid (**22**) fällt auf, dass diese Verbindungen als gemeinsames Strukturelement eine Salicylsäureeinheit aufweisen, die in *para*-Position zur phenolischen OH-Gruppe durch eine Azogruppe substituiert ist. Hierbei stellt sich die Frage, ob die Salicylsäureeinheit bei der Bindung erkannt wird oder ob strukturelle Modifikationen wie z.B. eine Veresterung der Carboxylgruppe oder Substitution der phenolischen OH-Gruppe durch ein Chloratom erlaubt sind. Dass sich die beiden Arzneistoffe **6** und **22** in der Substitution am zweiten Aromaten unterscheiden, deutet daraufhin, dass in *para*-Position zur Azogruppe Strukturvariationen eher erlaubt zu sein scheinen. Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurden verschiedene Sulfasalazin-Derivate synthetisiert.

Um den Einfluss der Sulfonylgruppe zu untersuchen, wurde zuerst Anilin (**31**) diazotiert und mit Salicylsäure (**32**) in einer Azokupplung zu 2-Hydroxy-5-[(*E*)-phenyldiazenyl]benzoesäure (**33**) umgesetzt (Abbildung 39). Der gewünschte Azofarbstoff **33** wurde in 59% Ausbeute erhalten und wurde durch Veresterung unter Zusatz von Bortrifluorid-Etherat in 2-Hydroxy-5-[(*E*)-phenyldiazenyl]benzoesäuremethylester (**34**) überführt. Bei der nachfolgenden Chlorierung mit Thionylchlorid in Tetrahydrofuran wurde kein Umsatz beobachtet.

3.2 SYNTHESE UND BINDESTUDIEN VON SULFASALAZIN-DERIVATEN ZUR ERSTELLUNG EINER STRUKTUR-AFFINITÄTS-BEZIEHUNG

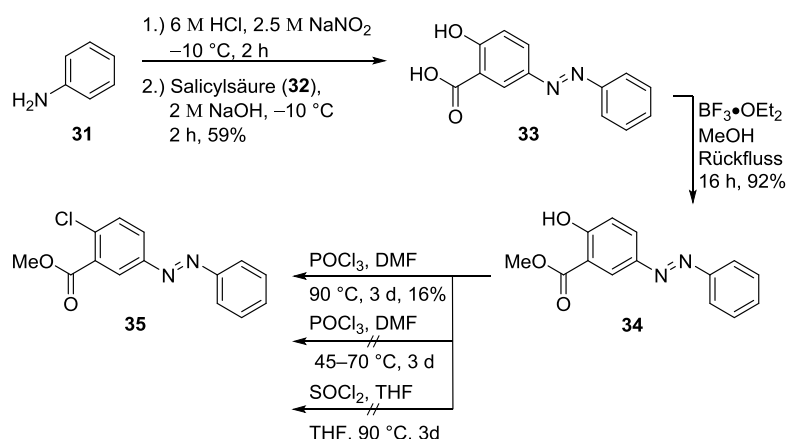


Abbildung 39: Darstellung von 2-Hydroxy-5-[(E)-phenyldiazenyl]benzoesäure (**33**) mit Veresterung und Chlorierung.

Alternativ wurde das Vilsmeier-Reagenz unter Eiskühlung hergestellt und anschließend mit dem Salicylsäuremethylester **34** bei 45 °C bzw. 70 °C in *N,N*-Dimethylformamid umgesetzt. Unter den genannten Temperaturen fand keine Reaktion statt. Erst bei einer Temperatur von 90 °C^[338] konnte das gewünschte Produkt **35** nach Flashchromatographie und Reinigung mittels HPLC in nennenswerter Ausbeute von 16% isoliert werden (Abbildung 39). Durch den Einsatz des Salicylsäuremethylesters **34** im Wettbewerbsexperiment sollte überprüft werden, ob die Carboxylgruppe ähnlich wie bei Myristinsäure (**3**) zur Bindung in der Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** notwendig ist. Die Substitution des Phenols durch ein Chloratom am Salicylsäuremethylester **34** sollte eine Aussage über den Einfluss der Hydroxygruppe auf die Bindungsaffinität ermöglichen. Die Wettbewerbsexperimente von NBD-C₁₂-**8**/HSA mit den beiden Azofarbstoffen **33** und **34** sind in Abbildung 40A–B gezeigt.

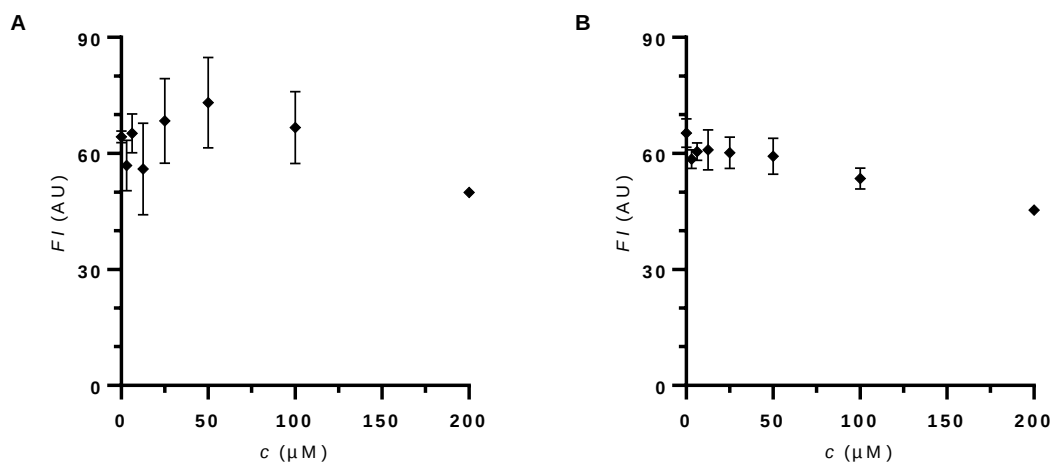


Abbildung 40: Wettbewerbsexperimente von NBD-C₁₂-**8**/HSA (je 25 μM) mit: A) Salicylsäure-Derivat **33**. B) Salicylsäuremethylester-Derivat **34**.

Da in der Konkurrenzkurve mit der Salicylsäure **33** fluktuierende FI-Werte zu erkennen sind (Abbildung 40A), wird NBD- C_{12} **8** nicht durch den Azofarbstoff **33** verdrängt. Das Sulfasalazin-Derivat **33** bindet somit in einer anderen Bindetasche oder nicht an HSA. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass zur Bindung in der neu identifizierten Bindestelle mindestens ein Akzeptor wie bspw. eine Sulfonyl- oder eine Carbonylgruppe (Vgl. Sulfasalazin (**6**) oder Balsalazid (**22**), Abbildung 38) nötig ist.

Auch beim Salicylsäuremethylester **34** sind zunächst konstante FI-Werte zu beobachten (Abbildung 40B). Erst ab deutlich höheren Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) scheint der Azofarbstoff **34** kompetitiv zu NBD- C_{12} **8** zu sein. Somit bindet auch dieses Sulfasalazin-Derivat **34** nicht primär in der Bindestelle der NBD-markierten C_{12} -Fettsäure **8**. Über den Einfluss der Carboxylgruppe auf die Bindungsaffinität kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, da die Salicylsäure **33** nicht in der untersuchten Bindestelle von HSA bindet. Nur ein direkter Vergleich zwischen der Carbonsäure und dem entsprechenden Ester erlaubt eine qualitative Einschätzung darüber, wie sehr die Wirkstoffbindung von Sulfasalazin (**6**) von der Carboxylgruppe abhängt und ob diese Stelle am Molekül möglicherweise modifiziert werden kann.

Die FI-Werte aus dem Konkurrenzexperiment mit dem 2-Chlorsalicylsäuremethylester **35** folgen einem ähnlichen Trend wie beim Salicylsäuremethylester **34**, da erst ab einer Konzentration von $>50 \mu\text{M}$ eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen ist (Abbildung 41).

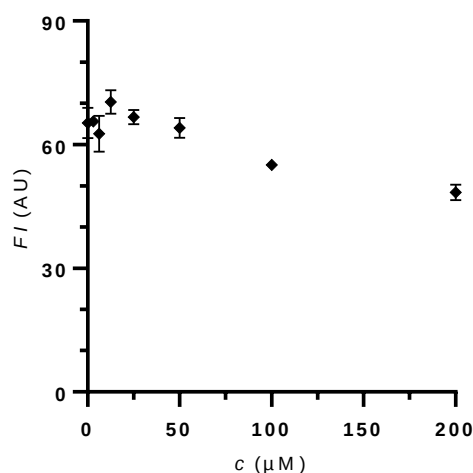


Abbildung 41: Konkurrenzexperiment von NBD- C_{12} -**8**/HSA (je $25 \mu\text{M}$) mit dem 2-Chlorsalicylsäuremethylester **35**.

Dass der chlorierte Ester **35** nicht in der Bindestelle von NBD- C_{12} **8** bindet, unterstützt die bisherigen Beobachtungen und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen. Da nach

3.2 SYNTHESE UND BINDESTUDIEN VON SULFASALAZIN-DERIVATEN ZUR ERSTELLUNG EINER STRUKTUR-AFFINITÄTS-BEZIEHUNG

den vorliegenden Daten die drei synthetisierten Sulfasalazin-Derivate **33–35**, die alle keine Sulfonylgruppe besitzen und sich nur im Bereich der Salicylsäureeinheit unterscheiden, nicht in der Bindestelle der NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** binden, kann an dieser Stelle keine Aussage über den Einfluss der Carboxylgruppe bzw. Hydroxygruppe auf die Bindungsaffinität getroffen werden. Daher wurden neue Derivate von Sulfasalazin (**6**) geplant. Ziel war die Synthese eines Azofarbstoffes, der an dem zweiten Arylring in der 4-Position eine Sulfonsäuregruppe trägt. Zusätzlich sollten die zugehörigen Salicylsäuremethylester-, 2-Chlorsalicylsäuremethylester- und 2-Chlorsalicylsäure-Derivate dargestellt werden.

Die Synthese des Benzolsulfonsäure-Azofarbstoffes **36** wurde ausgehend von Salicylsäure (**32**) und Sulfanilsäure (**37**) durchgeführt und gelang nach Diazotierung mit anschließender Azokupplung in quantitativer Ausbeute (Abbildung 42).

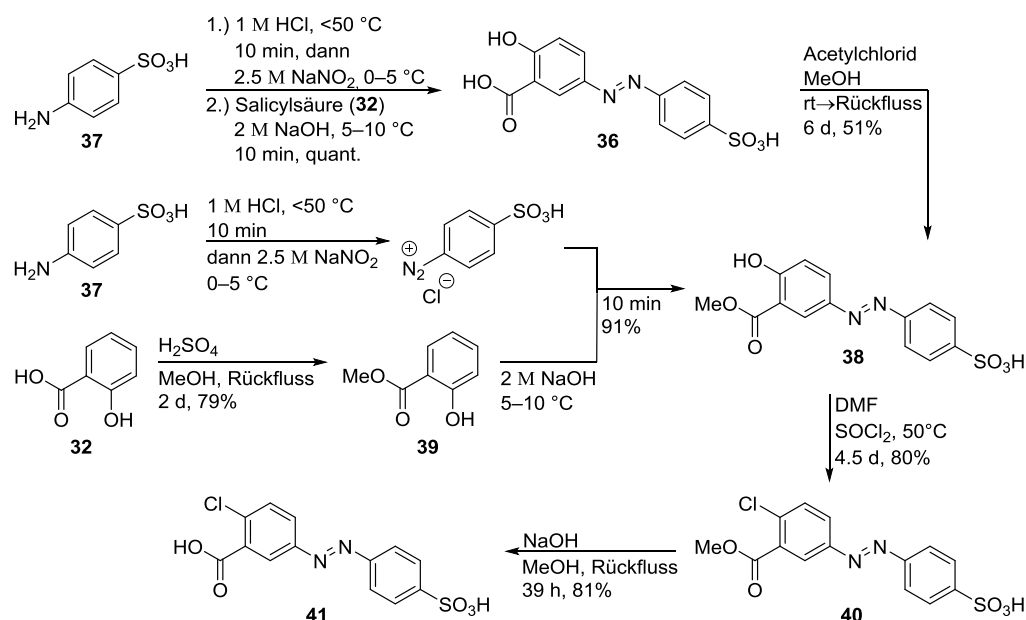


Abbildung 42: Synthese der Benzolsulfonsäure-Azofarbstoffe **36**, **38**, **40** und **41**.

Zur Darstellung des Salicylsäuremethylesters **38** wurde Sulfanilsäure (**37**) nach erfolgreicher Diazotierung mit Salicylsäuremethylester (**39**), der über eine Veresterung von Salicylsäure (**32**) in Methanol zugänglich war, in 4-[(E)-[4-Hydroxy-3-(methoxycarbonyl)phenyl]diazenyl]benzolsulfonsäure (**38**) in einer Ausbeute von 91% überführt. Alternativ führte eine Veresterung des Benzolsulfonsäure-Azofarbstoffes **36** in Methanol unter Zusatz von Acetylchlorid nach Reinigung mittels HPLC in einer Ausbeute von 51% zum gewünschten Produkt **38**. Die anschließende Chlorierung mit Sulfonylchlorid und Verseifung lieferten den 2-Chlorsalicylsäuremethylester **40** sowie die 2-Chlorsalicylsäure **41**.

Im Konkurrenzexperiment mit dem Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **36** ist ab einer Konzentration von 12.5 μM eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen (Abbildung 43A), der auf die Verdrängung der NBD-markierten C_{12} -Fettsäure **8** aus der Bindetasche zurückzuführen ist ($K_I = 21.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$). Damit bestätigt sich die Hypothese, dass ein Akzeptor (z.B. $-\text{SO}_2\text{-R}$) zur Bindung in der Bindestelle von NBD- C_{12} **8** ausreichend ist. Ein weiterer Substituent wird nicht unbedingt benötigt.

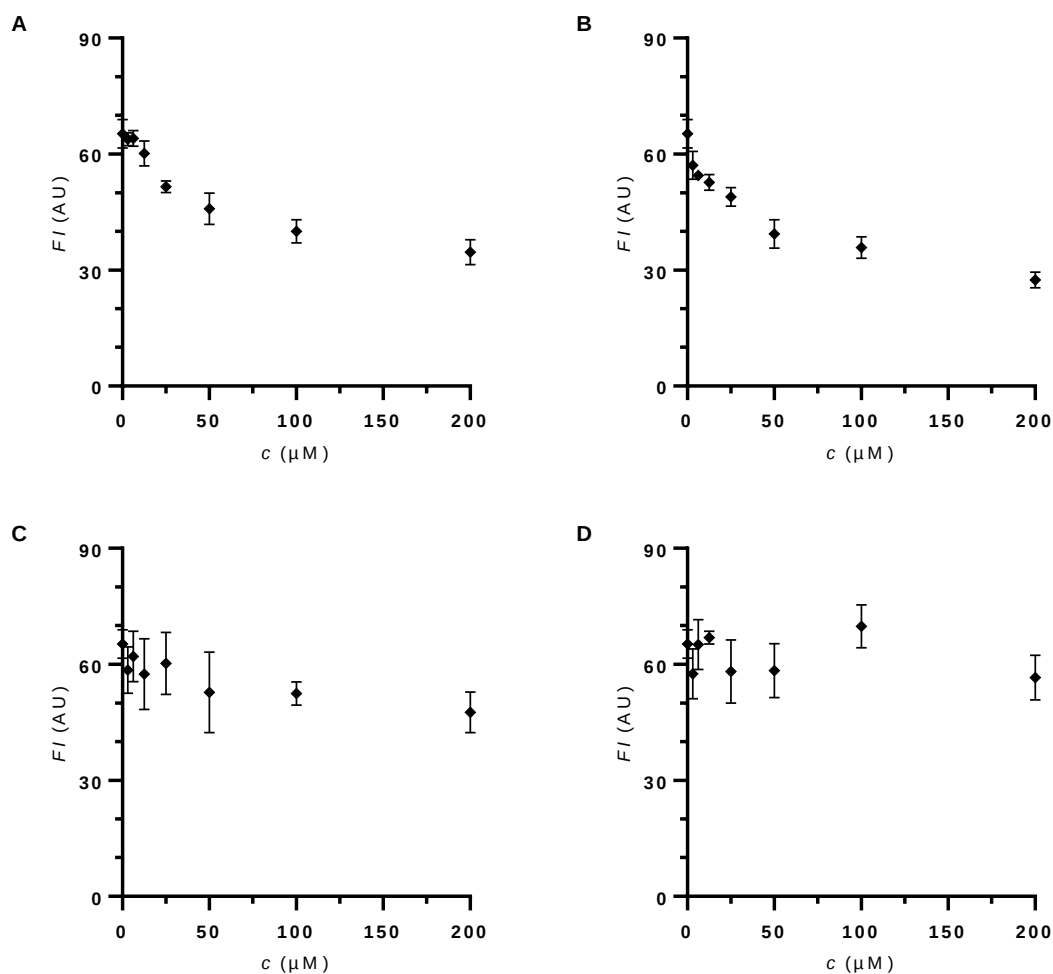


Abbildung 43: Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -**8**/HSA (je 25 μM) mit: A) Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **36** (♦). B) Veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **38** (♦). C) Chlorierter, veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **40** (♦). D) Chlorierter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **41** (♦).

Interessanterweise scheint der Ester **38** auch in dieser Bindetasche von HSA zu binden ($K_I = 31.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$, Abbildung 43B). Gleichzeitig zeigt sich im Konkurrenzexperiment mit dem chlorierten Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **41**, dass durch die Substitution des Phenols durch ein Chloratom keine Konkurrenz von NBD- C_{12} **8** mehr möglich ist (Abbildung 43D). Nach diesen Beobachtungen spielt nicht wie erwartet die Carboxylgruppe die entscheidende Rolle zur Bindung von Substanzen mit einer ähnlichen Grundstruktur wie Sulfasalazin (**6**), sondern die phenolische OH-Gruppe ist für die

Verdrängung der NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** von großer Bedeutung. Demnach scheint nicht die charakteristische Struktureinheit der Salicylsäure in der Bindetasche erkannt zu werden, sodass eine Modifizierung der Carboxylgruppe zu neuartigen, in der Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** bindenden Substanzen führen könnte.

Bei dem chlorierten und veresterten Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **40** sind, wie nach den bisherigen Daten zu erwarten, ebenfalls konstante FI-Werte zu beobachten (Abbildung 43C), d.h. dass dieser Azofarbstoff **40** ebenso wie der chlorierte Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **41** nicht oder in einer anderen Bindetasche von HSA bindet. Ein Ergebnis, das die soeben anhand der vorliegenden Daten gezogenen Schlussfolgerungen bezüglich der Bedeutung der Sulfonylgruppe und der phenolischen OH-Gruppe der Salicylsäure als essentieller Teil für die Bindung von Sulfasalazin (**6**) stützt. Weder die Sulfonylgruppe noch der Salicylsäure-Rest oder die phenolische OH-Gruppe allein sind für die Bindung in der Bindetasche von NBD-C₁₂ **8** ausreichend (Vgl. Konkurrenzexperimente von Salicylsäure-Derivat **33**, Salicylsäuremethylester-Derivat **34** und chlorierter, veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **40**). Um die Bedeutung der Methoxycarbonyl-Gruppe bei Verbindung **38** näher zu beleuchten und die Hypothese zu stützen, könnte die Untersuchung von 4-[(E)-(4-Hydroxyphenyl)diazenyl]benzolsulfonsäure im Konkurrenzexperiment dienen.

Um zu untersuchen, ob die Substitution der phenolischen OH-Gruppe von Sulfasalazin (**6**) durch ein Chloratom ebenfalls die Bindung in der Bindetasche von NBD-C₁₂ **8** verhindert, sollte Sulfasalazin (**6**) in das Chlorderivat überführt werden. Dazu wurde Sulfasalazin (**6**) in den entsprechenden Methylester **42** in 77% Ausbeute überführt (Abbildung 44). Die anschließende Substitution der phenolischen OH-Gruppe von Produkt **42** wurde unter Zugabe des *Vilsmeier*-Reagenz durchgeführt. Nach massenspektrometrischen Untersuchungen mittels LC/MS war das Edukt vollständig umgesetzt, aber die Masse des entstandenen Produktes deutete auf den chlorierten Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **40** hin, bei dem das Sulfonamid gespalten wurde. Da die Reinigung mittels HPLC sehr kompliziert war, wurde das Rohprodukt **40** in der Verseifung eingesetzt. Danach wurde nach Reinigung mittels HPLC der chlorierte Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **41** in einer moderaten Ausbeute von 31% über 2 Stufen isoliert. Das gewünschte chlorierte Sulfasalazin-Derivat **43** konnte auf diesem Weg nicht synthetisiert werden.

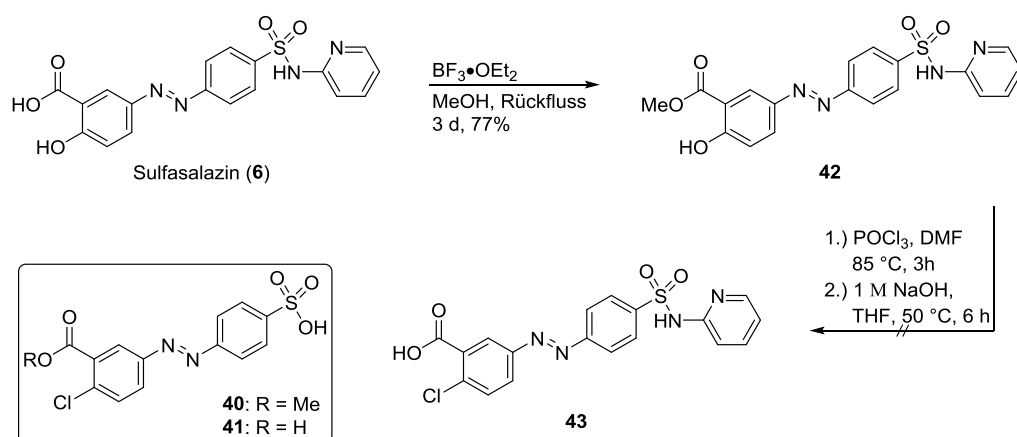


Abbildung 44: Versuch zur Substitution der phenolischen OH-Gruppe von Sulfasalazin (6).

Um eine Aussage über den Bindungsmodus von Sulfasalazin (6) an HSA treffen zu können, wurde molekulares Modelling durchgeführt, da Cokristallisationsansätze von HSA mit Sulfasalazin (6) bisher nicht erfolgreich waren. Abbildung 45A zeigt die beste Pose aus dem Docking-Experiment mit Sulfasalazin (6) in der Bindestelle von NBD- C_{12} 8. Für einen direkten Vergleich ist Sulfasalazin (6) gleichzeitig mit der NBD-markierten C_{12} -Fettsäure 8 gezeigt (Abbildung 45B).

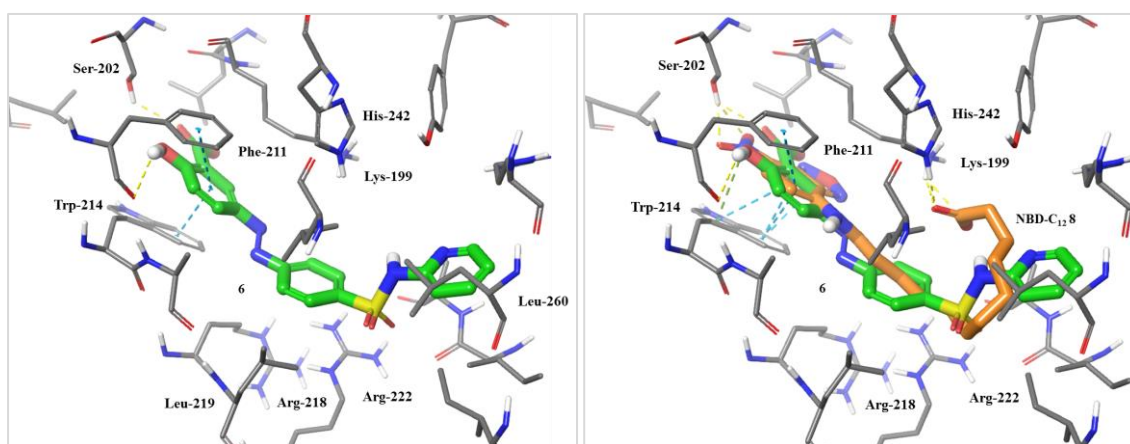


Abbildung 45: Docking-Experimente in der Bindestelle von NBD- C_{12} 8 an HSA (PDB^[46] Code: 6eqz^[239]): A) Sulfasalazin (6) (C: grün, O: rot, H: weiß, S: gelb, N: blau). B) Sulfasalazin (6) mit NBD- C_{12} 8 (C: orange, O: rot, N: blau)).

Der Docking-Studie nach finden π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Phenylring des Salicylsäure-Restes von Sulfasalazin (6) und den Aminosäuren Trp-214 sowie Phe-211 statt. Anstelle der Nitrogruppe des 4-NBD-Restes könnte die Carboxylgruppe mit Ser-202 interagieren, während die phenolische OH-Gruppe mit der Carbonylgruppe von Phe-211 wechselwirkt. Die Sulfonylgruppe bildet vermutlich eine Wasserstoffbrücke mit Arg-222 aus. Die Daten aus der Docking-Studie erklären viele Beobachtungen aus den Konkurrenzexperimenten, gesichert sind die Ergebnisse damit aber nicht, da alternativ auch die Bindung von Sulfasalazin (6) in vertikal gedrehter Position denkbar wäre. In

diesem Fall könnten die π - π -Wechselwirkungen zwischen Trp-214 und dem Pyridinyling von Sulfasalazin (**6**) auftreten, während sich zwischen der Sulfonylgruppe und Arg-218 eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet. Die Erkennung des Salicylsäurerestes wäre über Ser-287, das mit der phenolischen OH-Gruppe interagiert, möglich und würde durch eine Salzbrücke zwischen Arg-257 und der Carboxylgruppe von Sulfasalazin (**6**) verstärkt werden. Für eine weitere Beurteilung der Wechselwirkungen zwischen Sulfasalazin (**6**) und den beteiligten Aminosäuren wäre die Cokristallstruktur von Sulfasalazin (**6**) mit HSA sehr hilfreich.

Zusammenfassend sind ein Akzeptor wie z.B. eine Sulfonylgruppe und mindestens eine phenolische OH-Gruppe in 4-Position zur Azogruppe die strukturellen Voraussetzungen zur Bindung in der neu identifizierten Bindestelle in Sudlow-Site I.

Um zu untersuchen, wie sich eine Strukturvariation am Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **36** auf die Bindungsaffinität auswirkt, sollten *N*-substituierte Benzolsulfonamid-Azofarbstoffe synthetisiert werden. Die Strukturvariation sollte z.B. durch die Einführung einer weiteren funktionellen Gruppe oder eines räumlich anspruchsvollen Restes realisiert werden. Die Azofarbstoffe sollten ausgehend von Salicylsäure (**32**) und Sulfanilsäure (**37**) über eine Diazotierung-Azokupplung-Chlorierungs-Sequenz mit anschließender Umsetzung mit aliphatischen sowie aromatischen Aminen zugänglich sein (Abbildung 46).

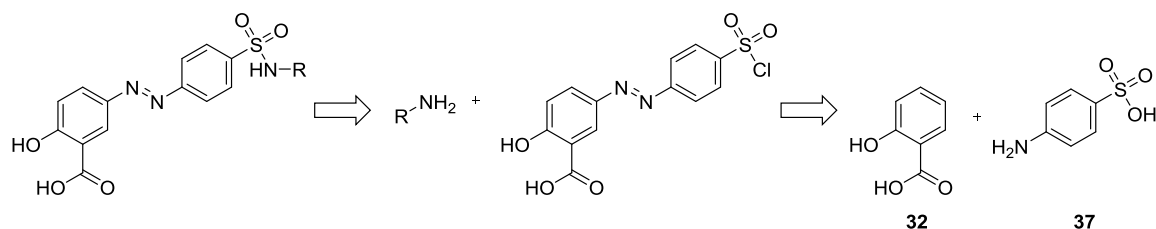


Abbildung 46: Retrosynthese zu den *N*-substituierten Benzolsulfonamid-Azofarbstoffen über eine Diazotierung-Azokupplung-Chlorierungs-Sequenz.

Der Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **36** war in quantitativer Ausbeute verfügbar (siehe Abbildung 42). Da die Chlorierung des Salicylsäuremethylester **38** in Thionylchlorid unter Zusatz von DMF bei 50 °C zum 2-Chlorsalicylsäuremethylester **40** führte, wurde die Chlorierung des Benzolsulfonsäure-Azofarbstoffes **36** bei Raumtemperatur getestet. Nach 20 Stunden Reaktionszeit wurden massenspektrometrisch mittels LC-MS ein dichlorierter Azofarbstoff und eine unidentifizierte Substanz beobachtet (Abbildung 47). Neben der Bildung des Sulfonsäure- und Carbonsäurechlorides ist auch die Substitution der phenolischen OH-Gruppe durch ein Chloratom möglich (**44a** und **44c**).

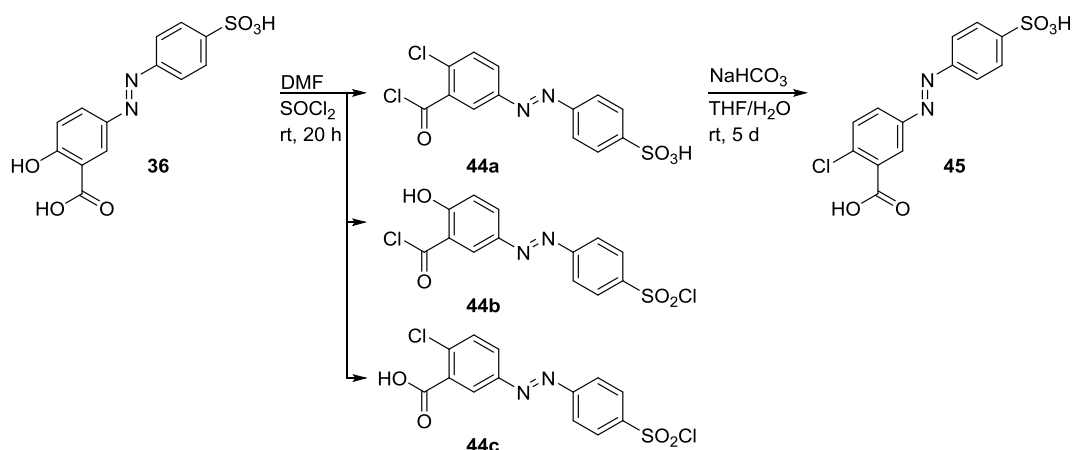


Abbildung 47: Versuch zur Chlorierung des Benzolsulfonsäure-Azofarbstoffes **36**.

Anstelle der Substitution der phenolischen OH-Gruppe ist auch die Bildung des Benzolsulfonsäurechlorids **44b** denkbar, die anschließende Hydrolyse mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung in Tetrahydrofuran führte nach der massenspektrometrischen Untersuchung mittels LC/MS jedoch zu einer monochlorierten Substanz. Auch wenn Sulfonsäurechloride aufgrund elektronischer Effekte deutlich langsamer hydrolysiert werden, sollten beide Säurechloride nach fünf Tagen unter den genannten Bedingungen hydrolysiert worden sein, sodass für das dichlorierte Produkt die Strukturen **44a** und **44c** wahrscheinlicher sind. Unter der Annahme, dass das Carbonsäurechlorid **44a** unter den Bedingungen der massenspektrometrischen Untersuchung mittels LC/MS hydrolysiert werden müsste, ist die Bildung der Struktur **44c** oder der entsprechenden trichlorierte Spezies am wahrscheinlichsten.

Auch bei der Verwendung des Esters **38** konnte unter den gleichen Reaktionsbedingungen kein Produkt isoliert werden, weshalb ein neuer Syntheseweg zum Erhalt von Sulfasalazin-Derivaten geplant wurde. Dazu sollte Sulfanilamid (**46**) nach Diazotierung mit Salicylsäure (**32**) in einer Azokupplung umgesetzt werden. Anschließend könnte der erhaltene Azofarbstoff **47** mit Bromiden **48** oder Olefinen derivatisiert werden (Abbildung 48).

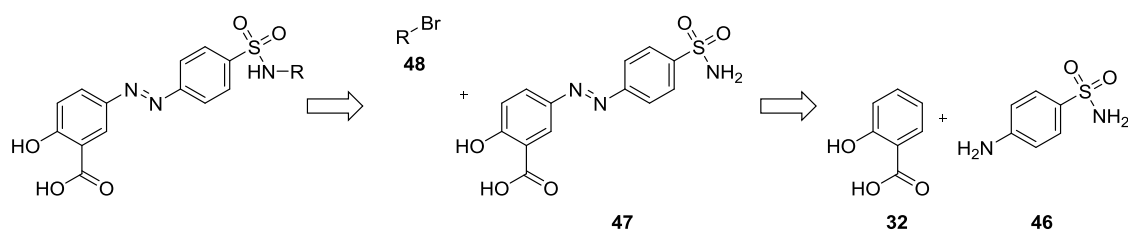


Abbildung 48: Retrosynthese zu den N-substituierten Benzolsulfonamid-Azofarbstoffen über eine Diazotierung-Azokupplung-Alkylierungs-Sequenz.

3.2 SYNTHESE UND BINDESTUDIEN VON SULFASALAZIN-DERIVATEN ZUR ERSTELLUNG EINER STRUKTUR-AFFINITÄTS-BEZIEHUNG

Die Synthese des Benzolsulfonamid-Azofarbstoffes **47** gelang zuerst in einer Ausbeute von 13%. Auffällig war hierbei die starke Gasentwicklung während der Diazotierung, die zu einer deutlichen Schaumbildung führte. Daher wurde die Diazotierung von Sulfanilamid **46** unter milderen Bedingungen (1 M HCl) durchgeführt. Nach der anschließenden Azokupplung wurde allerdings ein Produktgemisch erhalten, das säulenchromatographisch nicht getrennt werden konnte. Trotz der sehr niedrigen Ausbeute wurde versucht, den Benzolsulfonamid-Azofarbstoff **47** am Sulfonsäureamid zu derivatisieren. Zur *N*-Alkylierung wurde auf eine Vorschrift von Li^[339] zurückgegriffen. Dabei wird das Sulfonamid **47** mit einem Olefin unter Zusatz von Bortrifluorid-Etherat in 1,2-Dichlorethan umgesetzt. Unter diesen Bedingungen wurde jedoch kein Umsatz mit dem Sulfonamid **47** beobachtet.

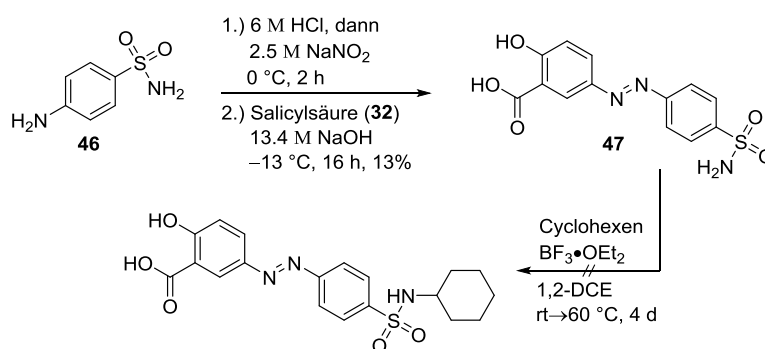


Abbildung 49: Synthese des Benzolsulfonamid-Azofarbstoffes **47** und Versuch zur *N*-Alkylierung.

Daher wurde lediglich der Benzolsulfonamid-Azofarbstoff **47** im Wettbewerbsexperiment mit der NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** eingesetzt (Abbildung 50).

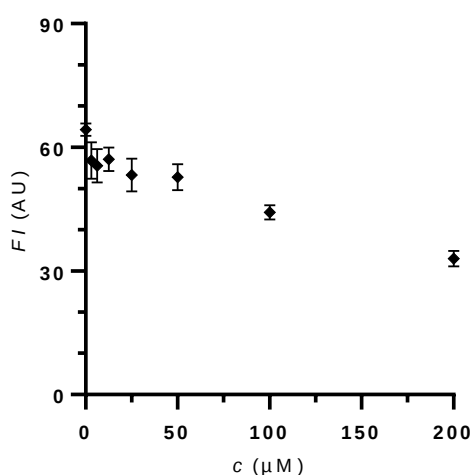


Abbildung 50: Wettbewerbsexperiment von NBD-C₁₂-**8**/HSA (je 25 μM) mit Benzolsulfonamid-Derivat **47**.

Auch dieses Sulfasalazin-Derivat **47** ist kompetitiv zur NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8**, allerdings zeigt es im Vergleich zum Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **36** eine deutlich niedrigere Bindeaffinität, da die Abnahme der FI erst ab einer Konzentration von >50 µM zu beobachten ist ($K_I = 255.0 \pm 2.1 \mu\text{M}$). Dennoch ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass ein Akzeptor am zweiten Phenylring zur Bindung in dieser Sub-Site von Sudlow-Site I benötigt wird, wenn neue potentielle Wirkstoffe ausgehend von Sulfasalazin (**6**) als Leitstruktur designt und optimiert werden sollen. Da parallel an einer Alternative zur Darstellung der Sulfasalazin-Derivate gearbeitet wurde, wurde die *N*-Alkylierung des Benzolsulfonamid-Azofarbstoffes **47** nicht weiter verfolgt.

Die Idee war, die *N*-substituierten Sulfonamide zu synthetisieren und diese nach der Diazotierung durch eine Azokupplung mit Salicylsäure (**32**) in die gewünschten Azofarbstoffe zu überführen. Dazu wurde Sulfanilsäure (**37**) nach den Synthesevorschriften von *Godfroid* und *Bieber*^[340-341] chloriert und mit *n*-Butylamin umgesetzt (Abbildung 51). Das gewünschte Sulfonamid **49** konnte in einer Ausbeute von 16% isoliert werden.

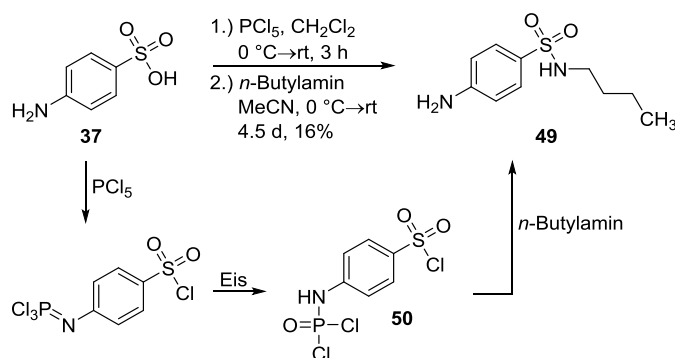


Abbildung 51: Synthese von 4-Amino-N-butylbenzolsulfonamid (**49**).

Bei dem Einsatz von Isopropylamin sowie Benzylamin und der Verwendung von Phosphoroxychlorid als alternatives Lösungsmittel^[340] zur Chlorierung von Sulfanilsäure (**37**) wurde das gewünschte Produkt nicht erhalten. Stattdessen wurden die Phosphorsäuretriamide **51** und **52** isoliert (Abbildung 52). Als weiteres Indiz für die Bildung der Phosphorsäureamide sind die Signale im ^{31}P -NMR zu erwähnen. Solche Phosphoramide können durch die Reaktion des Amins mit dem Phosphorsäureamiddichlorid **50** entstehen, weshalb das Amin in deutlichem Überschuss (6.0 äq.) eingesetzt wurde. Auch *Bieber*^[340] beschreibt unter diesen Bedingungen die Bildung von Phosphorsäuredi- und teilweise -triamiden, die sauer hydrolysiert werden können. Die Zwischenprodukte wurden daher in 1 M Salzsäure bei Raumtemperatur gerührt. Die gewünschten Produkte **53** und **54** konnten allerdings nicht isoliert werden.

3.2 SYNTHESE UND BINDESTUDIEN VON SULFASALAZIN-DERIVATEN ZUR ERSTELLUNG EINER STRUKTUR-AFFINITÄTS-BEZIEHUNG

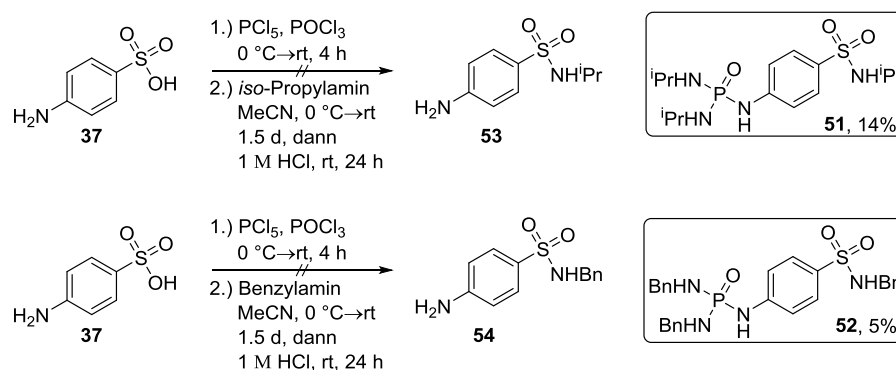


Abbildung 52: Versuche zur Darstellung der *N*-Isopropyl- und *N*-Benzylsulfonamide **53** und **54**.

Daraufhin wurde die Chlorierung der Arylsulfonsäure **37** in Dichlormethan durchgeführt und das erhaltene Rohprodukt nach Umsetzung mit Isopropylamin in 1 M Salzsäure unter Rückfluss erhitzt. Durch diese Methode war es erstmals möglich, 4-Amino-*N*-isopropylbenzolsulfonamid (**53**) in moderater Ausbeute von 37% zu erhalten. Die entwickelte Methode wurde dann für die Synthese von weiteren Benzolsulfonsäureamiden angewendet (Abbildung 53). Während der Einsatz von aliphatischen, acyclischen oder cyclischen Aminen (**53–56**) sowie von unterschiedlich substituierten Anilinen (**57–66**) erfolgreich war, konnte das gewünschte Produkt bei der Verwendung heterocyclischer, aromatischer Amine (**67–69**) nicht isoliert werden. Die Reaktion des Benzolsulfonsäurechlorids **50** mit 4-Benzyloxyanilin (**70**) wurde massenspektrometrisch mittels LC/MS verfolgt. Dabei wurde neben dem Anilin **70**, das in einem deutlichen Überschuss eingesetzt wurde, das gewünschte Produkt 4-Amino-*N*-[4-(benzyloxy)phenyl]benzolsulfonamid (**66**) beobachtet. Allerdings konnte das Produkt nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel nicht isoliert werden. Die NMR-Spektren wiesen lediglich auf eine Mischung aus 4-Benzyloxyanilin **70** und vermutlich Benzylalkohol im Verhältnis von 1:0.8 hin. Da das gewünschte Sulfonamid **66** nicht zugänglich war, wurde die Diazotierung und Azokupplung mit 4-Benzyloxyanilin (**70**) durchgeführt. Eine Untersuchung dieses Sulfasalazin-Derivates **88** (Abbildung 54) wäre interessant, da so ein Azofarbstoff mit drei Aryleinheiten vorliegt, der erstmals keine Sulfonylgruppe aufweist. Zwar ist nach den bisherigen Ergebnissen die Sulfonylgruppe für die Bindung in der Bindestelle von NBD- C_{12} **8** notwendig, aber vielleicht ermöglicht auch die Etherbrücke eine Bindung in der zu untersuchenden Bindetasche.

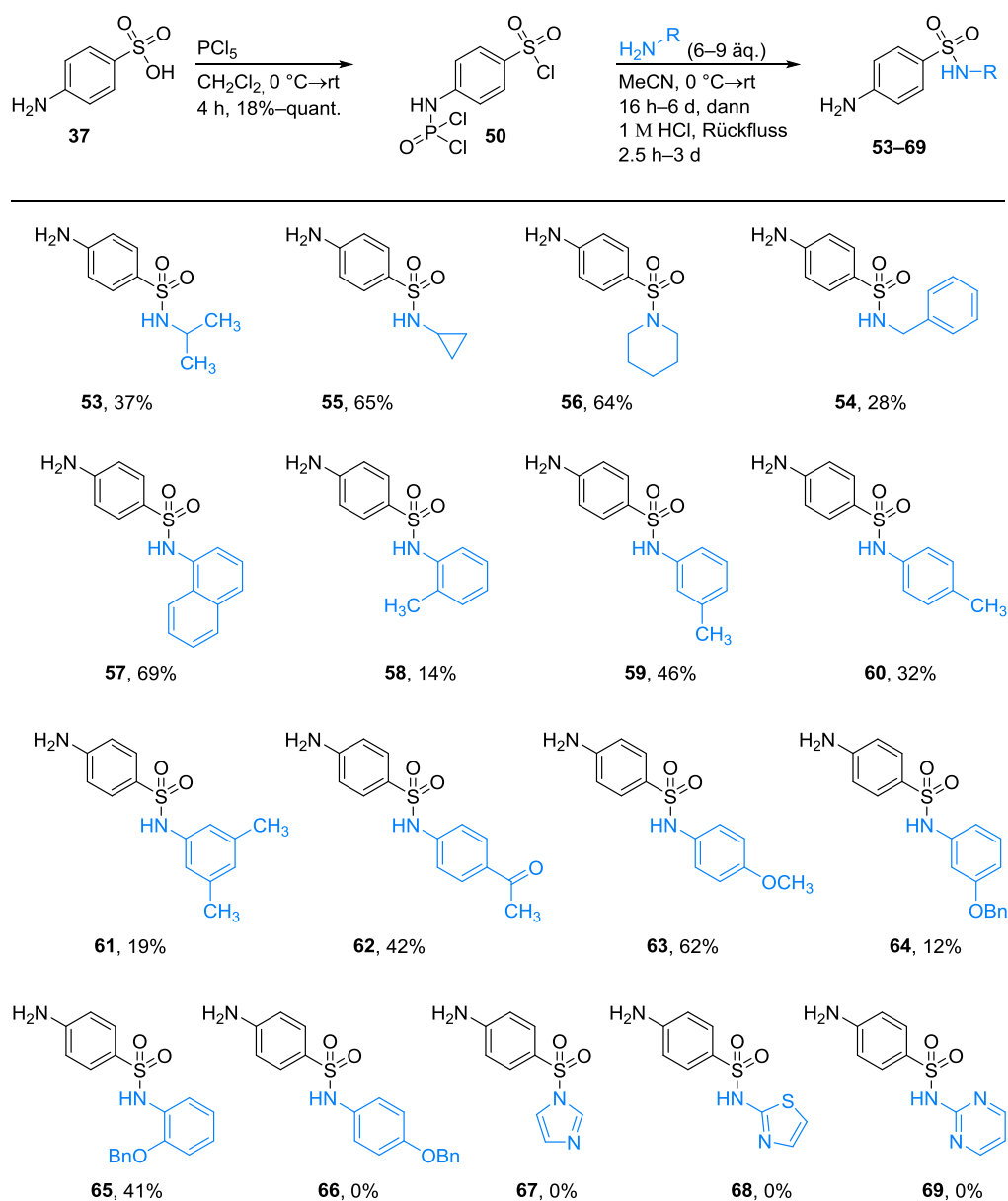


Abbildung 53: Synthetisierte N-Alkyl- und N-Arylsulfonamide.

Die N-substituierten Sulfonamide **53-65** sowie 4-Benzoyloxylanilin (**70**) wurden diazotiert und mit Salicylsäure (**32**) in einer Azokupplung eingesetzt. Die Sulfasalazin-Derivate **71-88** wurden nach HPLC-Reinigung in niedrigen bis sehr hohen Ausbeuten erhalten (Abbildung 54).

3.2 SYNTHESE UND BINDESTUDIEN VON SULFASALAZIN-DERIVATEN ZUR ERSTELLUNG EINER STRUKTUR-AFFINITÄTS-BEZIEHUNG

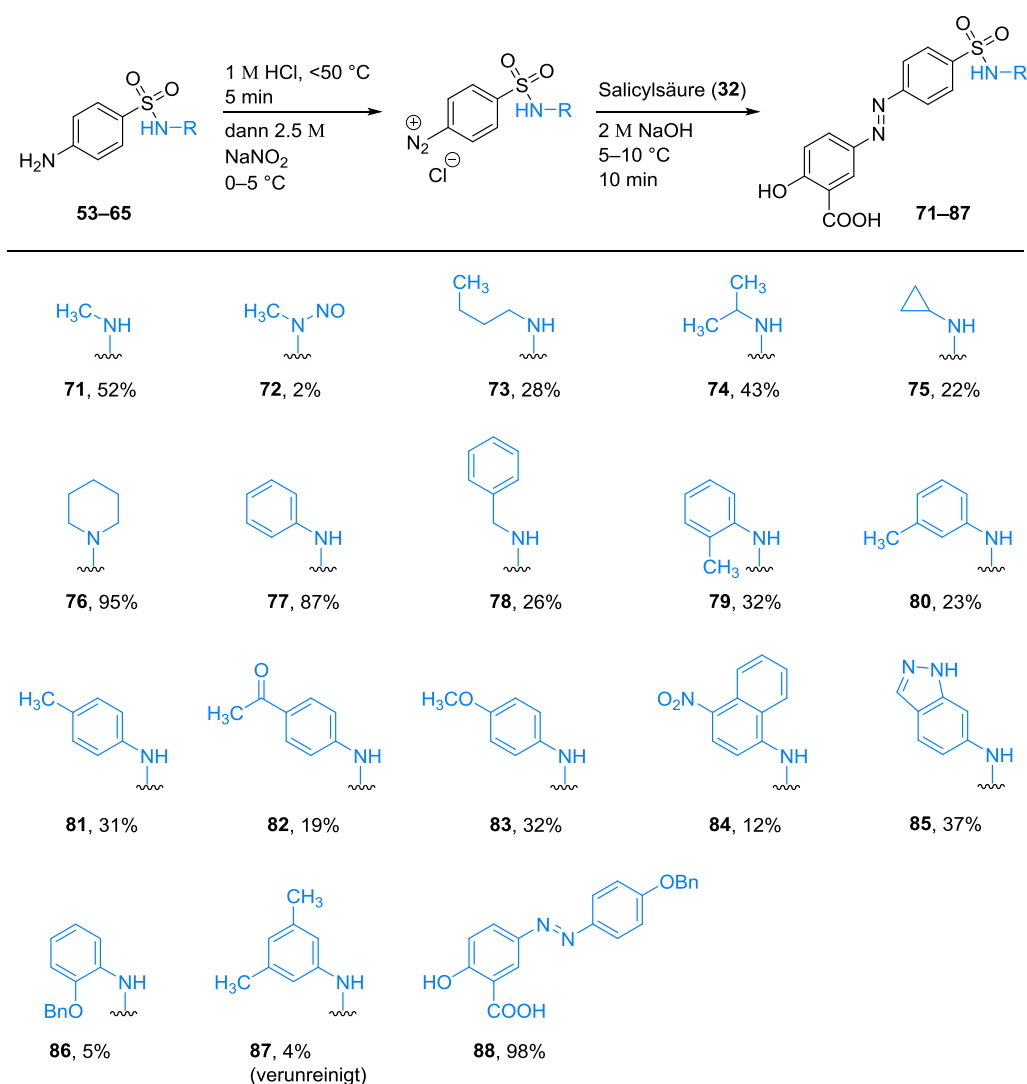


Abbildung 54: Synthetisierte Sulfasalazin-Derivate **71–88**.

Während der Diazotierung des naphthylsubstituierten Benzolsulfonamids **57** trat als Nebenreaktion eine Nitrierung am Naphthylrest in der 4-Position auf, wodurch das nitrierte Produkt **84** erhalten wurde. Bei der Azokupplung mit 4-Amino-N-(3,5-dimethylphenyl)benzolsulfonamid (**61**) konnte lediglich verunreinigtes Produkt **87** isoliert werden. Bereits die Diazotierung im Mikromaßstab gestaltete sich schwierig, da das Edukt aus harten Blättchen bestand und auch nach mechanischer Bearbeitung kaum in Lösung ging bzw. suspendierbar war. Dadurch wurde wahrscheinlich nur wenig Anilin **61** in das Diazoniumsalz überführt. Die Verunreinigungen konnten auch nach HPLC-Reinigung nicht entfernt werden.

Um erstmals auch ein Sulfasalazin-Derivat mit freier Hydroxygruppe am dritten Phenylring im Konkurrenzexperiment untersuchen zu können, wurde der Methylarylether **83** durch Zugabe der Lewis-Säure Bortribromid gespalten (Abbildung

55). Das gewünschte Produkt **89** wurde nach HPLC-Reinigung in einer Ausbeute von 69% erhalten.

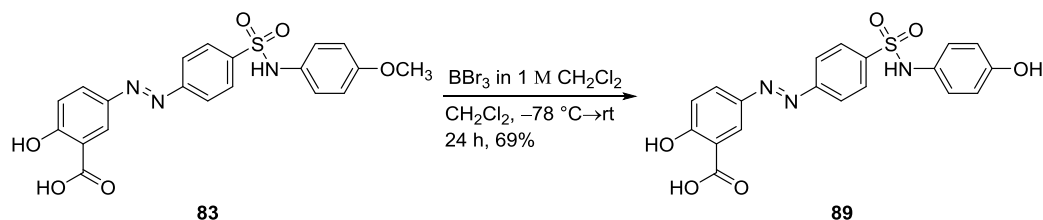


Abbildung 55: Spaltung des Methylarylethers **83** unter Zusatz von Bortribromid.

Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wurde auch die Benzylschutzgruppe am Azofarbstoff **86** abgespalten. Allerdings konnte die Verunreinigung nicht mittels HPLC-Reinigung von dem Produkt **90** entfernt werden (Abbildung 56).

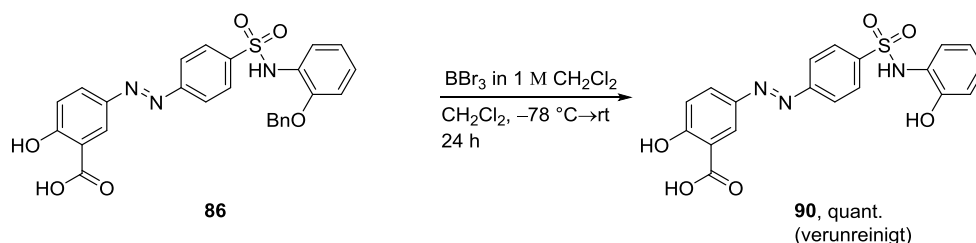
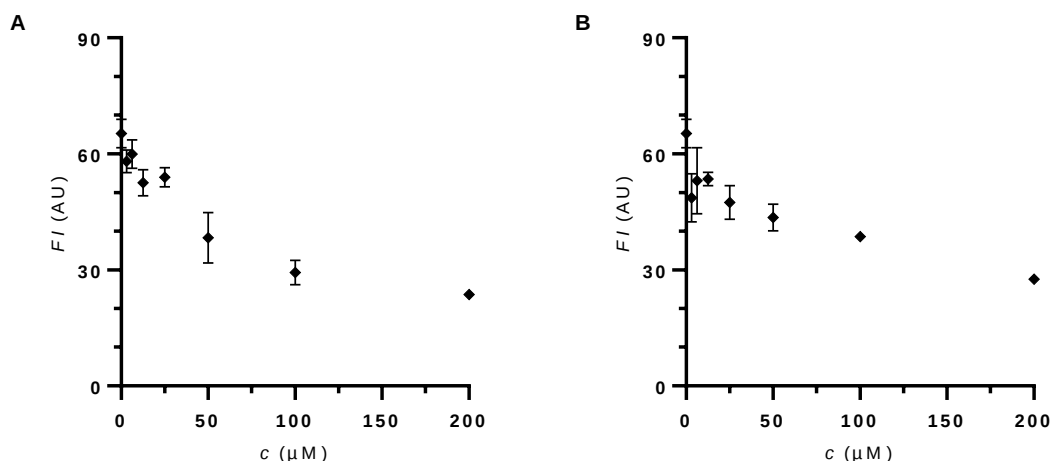


Abbildung 56: Abspaltung der Benzylschutzgruppe am Sulfasalazin-Derivat **86**.

Aufgrund der Verunreinigungen wurden die Sulfasalazin-Derivate **87** und **90** nicht in den Konkurrenzexperimenten eingesetzt. Der Azofarbstoff **88** ohne Sulfonylgruppe konnte ebenfalls nicht getestet werden, da diese Substanz unter den Standardbedingungen zum Ansetzen der Stammlösungen (10 mM in Ethanol, 800 μM in DPBS (max. 5 Vol% DMSO)) nicht in Lösung ging. Auch in 5 mM ethanolischer Lösung war keine ausreichende Löslichkeit gegeben.

Die Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -**8**/HSA mit den *N*-Alkyl substituierten Azofarbstoffen **71** und **73–76** sind in Abbildung 57A–E gezeigt.



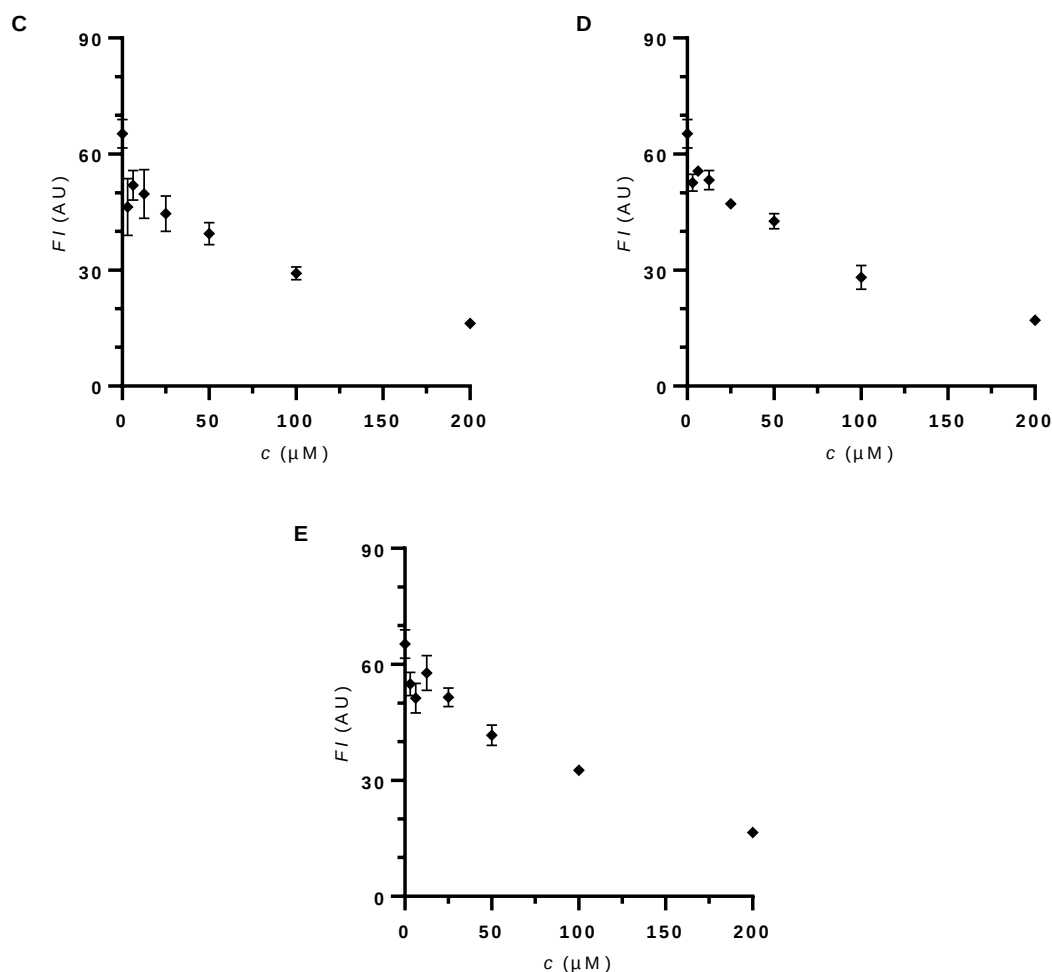


Abbildung 57: Konkurrenzexperimente von NBD-C₁₂ **8**/HSA (je 25 μM) mit N-Alkyl substituierten Azofarbstoffen. A) N-Methyl **71** (♦). B) N-Butyl **73** (♦). C) N-Isopropyl **74** (♦). D) N-Cyclopropyl **75** (♦). E) N-Piperidinyl **76** (♦).

Die fünf getesteten, aliphatisch substituierten Azofarbstoffen **71** und **73–76** verdrängen alle NBD-C₁₂ **8** aus der Bindestelle. Bei den verzweigten Substituenten **74** ($K_I = 81.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$) und **75** ($K_I = 66.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$) sowie bei dem tertiären Sulfonamid **76** ($K_I = 89.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$) sind die Inhibitionskonstanten sehr ähnlich. Eine höhere Bindungsaffinität ist lediglich bei dem N-Methyl substituierten Azofarbstoff **71** ($K_I = 37.3 \pm 1.4 \mu\text{M}$) zu erkennen. Interessant ist an dieser Stelle die deutlich schwächere Affinität des N-Butyl substituierten Derivates **73** ($K_I = 222.6 \pm 2.5 \mu\text{M}$). Diesen Beobachtungen nach können kurzkettige Substituenten in der Bindetasche von Sulfasalazin (**6**) besonders gut mit den Aminosäureresten interagieren. Für längere, flexible Alkylketten scheint die Stabilisierung schwieriger zu sein (siehe Konkurrenzexperiment mit Azofarbstoff **73**). Ob die Verzweigung über ein sekundäres oder tertiäres Sulfonamid führt, ist nach diesen Daten nicht relevant, da die Unterschiede zwischen den K_I -Werten des sekundären **76** und des tertiären Sulfonamids **74** vernachlässigbar sind.

Um die zu untersuchende Bindetasche weiter auf ihren räumlichen Anspruch hin zu untersuchen, wurden Konkurrenzexperimente mit *N*-Phenyl **77**, *N*-Benzyl **78**, *N*-(4-Methoxyphenyl) **83** und *N*-(Methylphenyl) substituierten Azofarbstoffen **79–81** durchgeführt (Abbildung 58A–F). Auch diese Sulfasalazin-Derivate sind alle kompetitiv zu NBD-C₁₂ **8**, allerdings sind die Inhibitionskonstanten teilweise deutlich größer. Die K_I-Werte der 3-(Methylphenyl) und 4-(Methylphenyl) substituierten Azofarbstoffe **80** und **81** sind untereinander vergleichbar (K_I (**80**) = 271.0 ± 1.9 μM, K_I (**81**) = 261.8 ± 1.8 μM) und liegen ungefähr im Bereich der *N*-Butyl substituierten Verbindung **73**, wohingegen bei dem 2-(Methylphenyl)-Derivat **79** (K_I = 120.9 ± 1.5 μM) eine signifikant höhere Bindungsaffinität beobachtet werden kann. Dies könnte auf eine Interaktion zwischen der Methylgruppe in 2-Position mit der Aminosäure Ala-215 zurückgeführt werden. Ein weiteres Sulfasalazin-Derivat, das in 4-Position einen relativ hydrophoben Rest trägt, ist der *N*-(4-Methoxyphenyl)-Azofarbstoff **83** (K_I = 309.1 ± 3.0 μM), dessen Bindungsaffinität ebenso vergleichsweise gering ist.

Die deutlich stärkere Bindungsaffinität der 3-(Methylphenyl) und 4-(Methylphenyl) substituierten Azofarbstoffe **80** und **81** im Vergleich zu den *N*-Phenyl- und *N*-Benzyl-Derivaten **77** und **78** (K_I (**77**) = 740.4 ± 3.5 μM, K_I (**78**) = 687.0 ± 4.1 μM) könnte auf schwachen Wechselwirkungen mit hydrophoben Aminosäureresten wie bspw. Leu-198 beruhen. Weiterhin könnte die freie Drehbarkeit der Benzylgruppe die π-π-Wechselwirkungen mit Trp-214 aufgrund der schlechteren Überlappung schwächen.

3.2 SYNTHESE UND BINDESTUDIEN VON SULFASALAZIN-DERIVATEN ZUR ERSTELLUNG EINER STRUKTUR-AFFINITÄTS-BEZIEHUNG

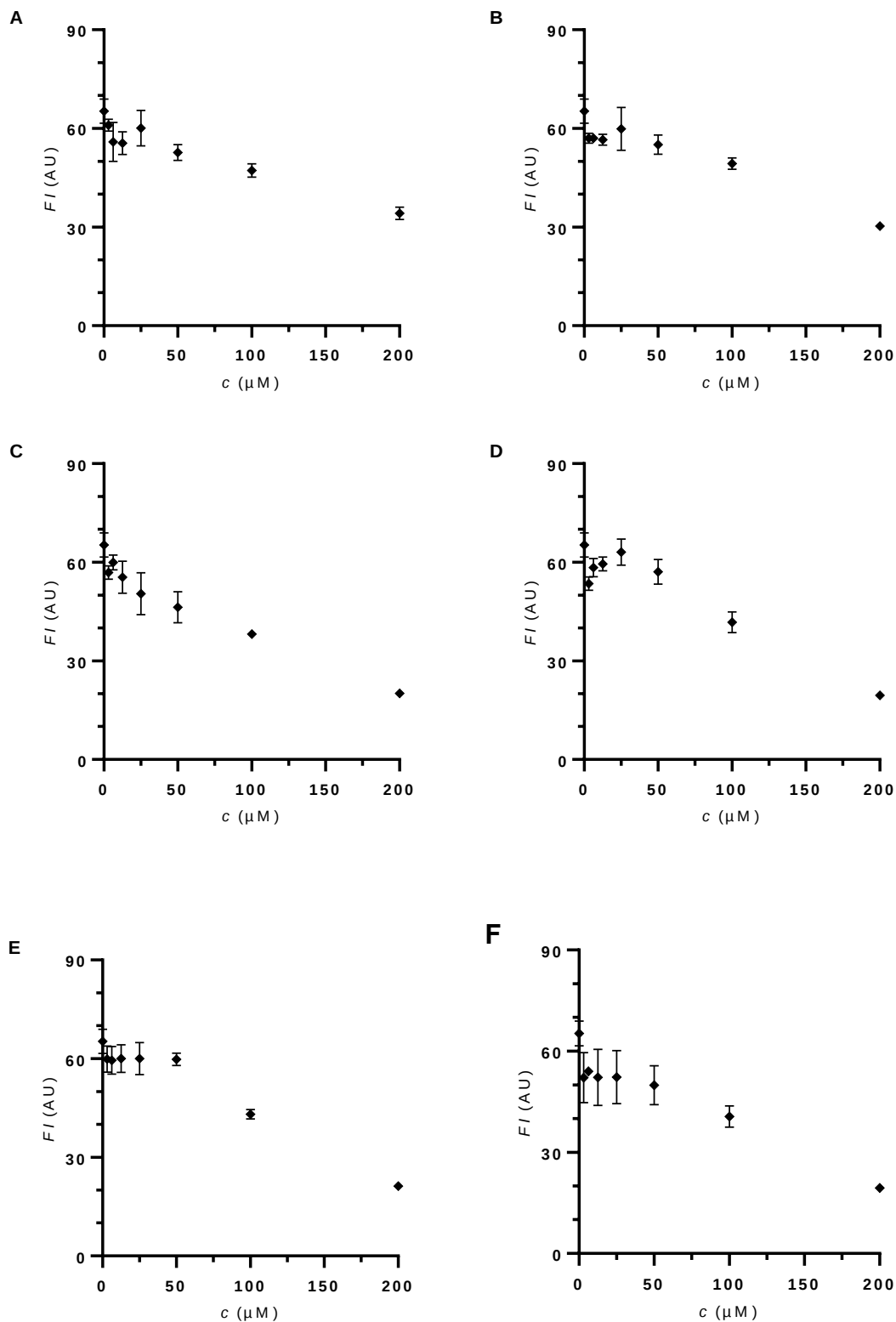


Abbildung 58: Konkurrenzexperimente von NBD-C₁₂ 8/HSA (je 25 μM) mit N-Aryl substituierten Azofarbstoffen. A) N-Benzyl 78 (♦). B) N-Phenyl 77 (♦). C) N-(2-Methylphenyl) 79 (♦). D) N-(3-Methylphenyl) 80 (♦). E) N-(4-Methylphenyl) 81 (♦). F) N-(4-Methoxyphenyl) 83.

Um den Einfluss funktioneller Gruppen auf die Wirkstoffbindung zu untersuchen, wurden die Azofarbstoffe **82**, **89**, **84** und **85** in Konkurrenzexperimenten von NBD-C₁₂-**8**/HSA eingesetzt (Abbildung 59A–D).

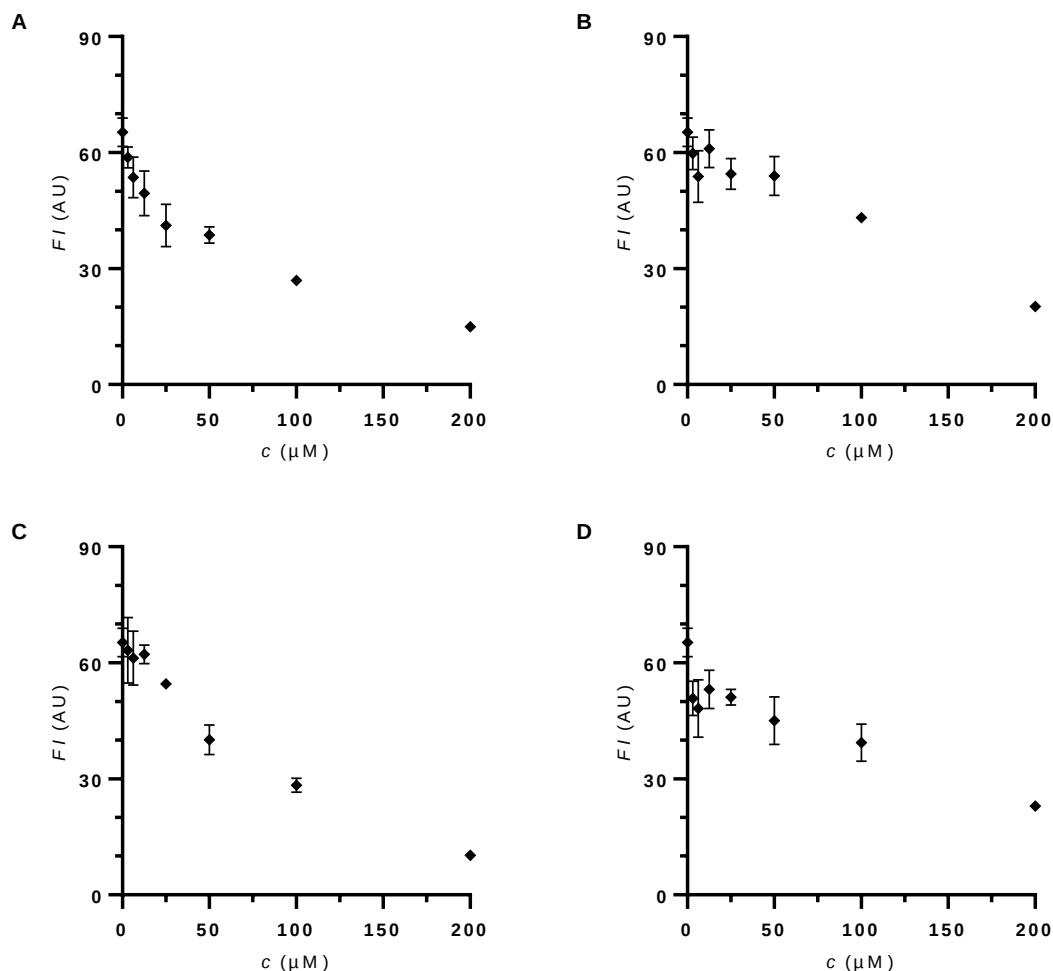


Abbildung 59: Konkurrenzexperimente von NBD-C₁₂ **8**/HSA (je 25 µM) mit N-Aryl substituierten Azofarbstoffen. A) N-(4-Acetylphenyl) **82** (♦). B) N-(4-Hydroxyphenyl) **89** (♦). C) N-(4-Nitronaphth-1-yl) **84** (♦). D) N-(Indazol-6-yl) **85** (♦).

Diese Azofarbstoffe verdrängen alle NBD-C₁₂ **8**, allerdings zeigt das N-(4-Hydroxyphenyl)-Derivat **89** die geringste Affinität zur untersuchten Bindestelle ($K_I = 215.2 \pm 1.9 \mu\text{M}$). Die im Vergleich zum N-Phenyl substituierten Azofarbstoff **77** größere Bindungsaffinität könnte mit einer Wechselwirkung zwischen der Hydroxygruppe des Binders **89** und Ser-202 begründet werden. Das 4-(Acetylphenyl)-Derivat **82** interagiert vermutlich ebenfalls mit dieser Aminosäure. Durch den kleineren Abstand zwischen der Carbonylgruppe und Ser-202 könnten sich im Vergleich zum N-(4-Hydroxyphenyl)-Derivat **89** stärkere, elektrostatische Kräfte ausbilden, wodurch die Bindungsaffinität erhöht wird ($K_I = 42.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$). Eine ähnliche Bindungsaffinität ist bei der N-(4-Nitronaphthalen-1-yl) substituierten Verbindung **84** zu beobachten ($K_I = 52.5 \pm 1.4 \mu\text{M}$).

Wahrscheinlich führt eine sehr gute Überlappung des Azofarbstoffes **84** und Trp-214 zu starken π - π -Wechselwirkungen zwischen den beiden Bicyklen. Gleichzeitig könnte eine Interaktion zwischen der in 4-Position befindlichen Nitrogruppe mit Ser-202 stattfinden. Eine solche Erkennung wurde bereits bei der Nitrogruppe des NBD-Fluorophors in der Cokristallstruktur von NBD- C_{12} **8** mit HSA beobachtet (siehe Abbildung 36). Ausgeprägte π - π -Wechselwirkungen führen vermutlich auch zu der starken Bindungsaffinität des *N*-(Indazol-6-yl) substituierten Azofarbstoffes **85** ($K_I = 79.4 \pm 1.6 \mu\text{M}$). Durch den fehlenden Akzeptor könnte die K_I im Vergleich zum *N*-(4-Nitronaphth-1-yl) Derivat **84** um den 2-fachen Wert geschwächt werden.

Ein weiteres Sulfasalazin-Derivat, das zur Untersuchung der Größe der Bindetasche geeignet ist, ist das *N*-(2-Benzoyloxy)phenyl-Derivat **86**. Auch dieser Azofarbstoff **86** ist kompetitiv zu NBD- C_{12} **8** (Abbildung 60). Die Bindungsaffinität dieser Verbindung **86** ($K_I = 116.2 \pm 1.6 \mu\text{M}$) ist vergleichbar mit der des *N*-(2-Methylphenyl) Azofarbstoffes **79** ($K_I = 120.9 \pm 1.5 \mu\text{M}$) und könnte neben den bekannten π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Arylrest und Trp-214 auch auf π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Benzylrest und Phe-211 zurückzuführen sein.

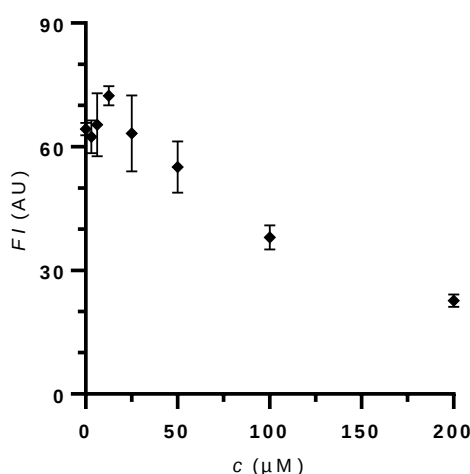


Abbildung 60: Konkurrenzexperiment von NBD- C_{12} -**8**/HSA (je $25 \mu\text{M}$) mit der *N*-(2-Benzoyloxy)phenyl Verbindung **86**.

Um den genauen Bindungsmodus der Sulfasalazin-Derivate nachzuweisen, wurde der *N*-(4-Methoxyphenyl) substituierte Azofarbstoff **83** beispielhaft in Cokristallisationsansätzen mit HSA verwendet. Bei den Kristallisationsansätzen, die unter Zugabe von Palmitinsäure (**29**), Stearinsäure (**30**) oder Warfarin (**2**) als Stabilisatoren vorbereitet wurden, konnte kein Kristall erhalten werden.

Der Einsatz der synthetisierten Sulfasalazin-Derivate **33–36**, **38**, **40**, **41**, **47**, **71**, **73–86** und **89** in Konkurrenzexperimenten von NBD-C₁₂-8/HSA ermöglichte Schlussfolgerungen zum räumlichen Anspruch und zur Toleranz funktioneller Gruppen bezogen auf die untersuchte Bindetasche. Weiterhin konnten die strukturellen Voraussetzungen für eine Bindung in der Sub-Site von Sudlow-Site I identifiziert und die Bindungsaffinität von Sulfasalazin (**6**) optimiert werden. Mit Hilfe der erstellten Struktur-Affinitäts-Beziehungen können weitere Strukturanaloga mit erhöhter Affinität zur untersuchten Bindestelle designt werden. Zur Veranschaulichung wurden sowohl die Grundkörper **33–36**, **38**, **40**, **41** und **47** wie auch die *N*-Alkyl und *N*-Aryl substituierten Azofarbstoffe **71**, **73–86** und **89** nach ihren aus den K_I -Werten ermittelten Bindungsaffinitäten klassifiziert und in Abbildung 61 und Abbildung 62 zusammengefasst.

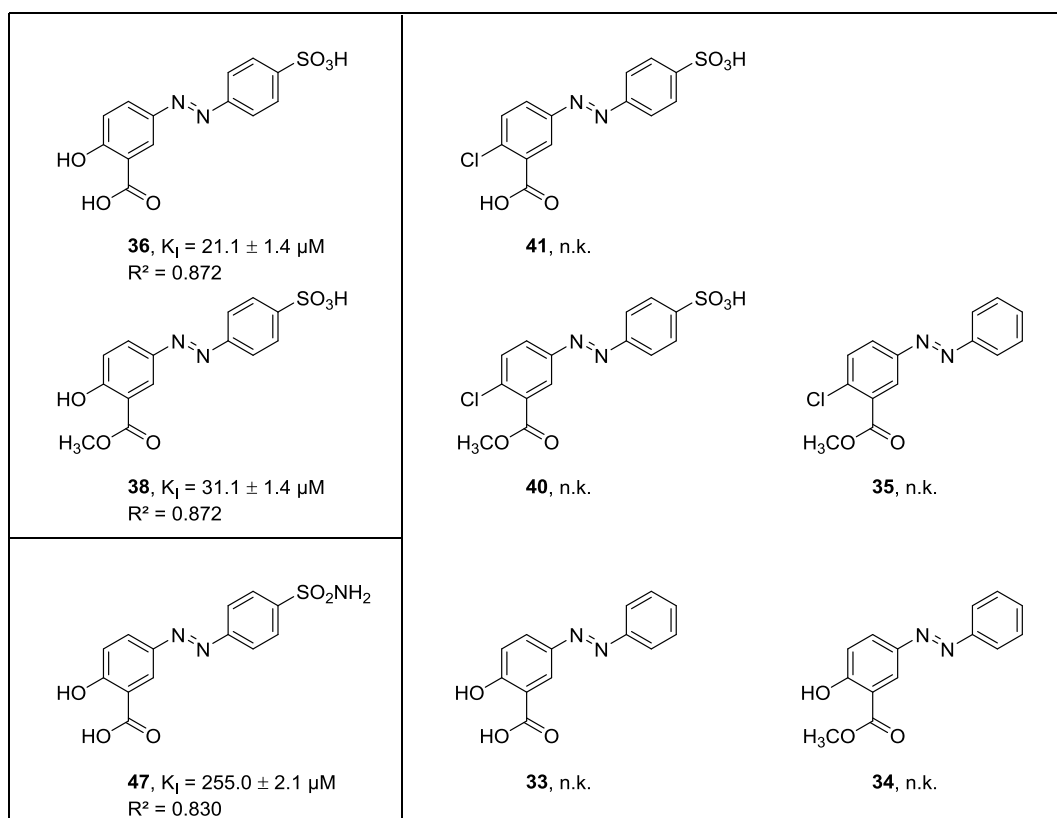


Abbildung 61: Klassifizierung der Azofarbstoff-Grundkörper **33–36**, **38**, **40**, **41** und **47** nach ihrer Bindungsaffinität für die neu identifizierte Bindestelle an HSA.

3.2 SYNTHESE UND BINDESTUDIEN VON SULFASALAZIN-DERIVATEN ZUR ERSTELLUNG EINER STRUKTUR-AFFINITÄTS-BEZIEHUNG

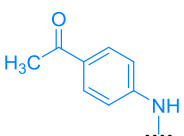
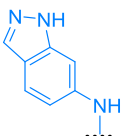
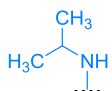
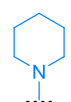
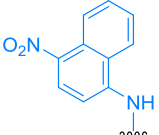
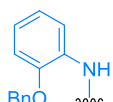
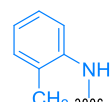
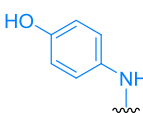
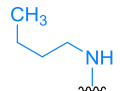
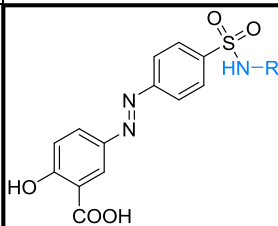
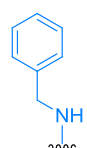
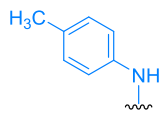
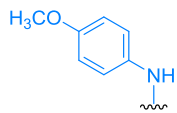
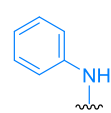
 71, $K_I = 37.6 \pm 1.4 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.868$	 82, $K_I = 42.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.873$	 85, $K_I = 79.4 \pm 1.6 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.832$	 74, $K_I = 81.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.785$	 76, $K_I = 89.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.911$
 84, $K_I = 51.5 \pm 1.4 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.893$	 75, $K_I = 66.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.953$	 86, $K_I = 116.2 \pm 1.6 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.848$	 79, $K_I = 120.9 \pm 1.5 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.883$	
 89, $K_I = 215.2 \pm 1.9 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.835$	 73, $K_I = 222.6 \pm 2.5 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.731$	 80, $K_I = 271.0 \pm 1.9 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.883$		 78, $K_I = 687.0 \pm 4.1 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.837$
 81, $K_I = 261.8 \pm 1.8 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.890$	 83, $K_I = 309.1 \pm 3.0 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.742$	 77, $K_I = 740.4 \pm 3.5 \mu\text{M}$ $R^2 = 0.881$		

Abbildung 62: Klassifizierung der N-Alkyl und N-Aryl substituierten Azofarbstoffe **71**, **73–86** und **89** nach ihrer Bindungsaffinität (K_I -Wert) für die neu identifizierte Bindestelle an HSA.

3.3 Entwicklung eines trichromatischen Fluoreszenzassays

Mit der Entwicklung^[319-320] der NBD-markierten Fettsäure **8** konnte nicht nur eine neue Fettsäurebindestelle von HSA identifiziert werden, sondern der spezifische Binder **8** konnte auch in Konkurrenzexperimenten eingesetzt werden, die zur Identifizierung weiterer Moleküle dienten, die in der neu identifizierten Bindetasche binden (siehe Abschnitt 3.2). Solche Konkurrenzexperimente stellen nicht nur eine einfache Methode dar, um den Bindungsort zu lokalisieren. Sie bieten auch gleichzeitig die Möglichkeit, die Stärke einer Bindung zu analysieren. Je leichter die in Konkurrenzexperimenten eingesetzten Verbindungen NBD-C₁₂ **8** verdrängen, desto stärker binden sie selbst in dieser Bindestelle an HSA. Der berechnete K_I-Wert ist hierbei das Maß für die Bindungsstärke der untersuchten Verbindung. Die Konkurrenzexperimente erlauben folglich eine Korrelation zwischen funktionellen Gruppen und Bindungsaffinität. Dies könnte zur Optimierung bestehender oder Entwicklung neuer Wirkstoffe, die spezifisch in der neu identifizierten Bindestelle binden, beitragen. Letztlich kann aus solchen Experimenten eine Struktur-Affinitäts-Beziehung abgeleitet werden.

Ziel war es nun, dieses Prinzip auf weitere, bekannte Bindestellen von HSA auszuweiten und einen trichromatischen Konkurrenzassay zu entwickeln, der es ermöglichen sollte, mehrere Bindestellen simultan zu erfassen. Neben der Fettsäurebindestelle wurden die bekannten Wirkstoffbindestellen Sudlow-Site I und Sudlow-Site II gewählt. Für den Aufbau eines solchen Assays wurden zwei fluoreszenzmarkierte Binder als Marker benötigt, die einerseits spezifisch in einer Bindetasche binden, aber andererseits auch in Konkurrenzexperimenten verdrängt werden können. Zusätzlich musste sichergestellt werden, dass die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe komplementär eingesetzt werden konnten. Dazu wurden sowohl die Anregungswellenlängen als auch die Emissionswellenlängen der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe entsprechend optimiert. Außerdem mussten die neuen, fluoreszenzmarkierten Binder für Sudlow-Site I und Sudlow-Site II jeweils solvatochrome Eigenschaften besitzen, um als Marker im Konkurrenzassay eingesetzt werden zu können. Das Grundprinzip des Assays basiert auf der Fluoreszenzzunahme des Fluorophors mit steigender Hydrophobizität der Umgebung (siehe Abbildung 11). Somit wird eine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet, sobald der Marker aus der Bindetasche verdrängt wird. Ein geeigneter Marker musste daher eine polaritätsabhängige Fluoreszenz aufweisen.

Sudlow et al.^[174] setzte Dansylsarcosin in Konkurrenzexperimenten als site-spezifischen Binder für die Charakterisierung von Sudlow-Site II ein. Auch ein BODIPY-Farbstoff (4,4-Difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen) wurde bereits erfolgreich als Fluoreszenzmarker für diese Bindestelle genutzt. Die Arbeitsgruppe Chang^[181] verwendete in ihrem bichromatischen Assay neben Dansylamid (Sudlow-Site I) das 4-Propyloxy-BODIPY **23** als spezifischen, hoch sensitiven Binder für Sudlow-Site II, um die Bindung einer Testsubstanz in den zwei Bindestellen simultan in einem Hochdurchsatz-Screening untersuchen zu können.

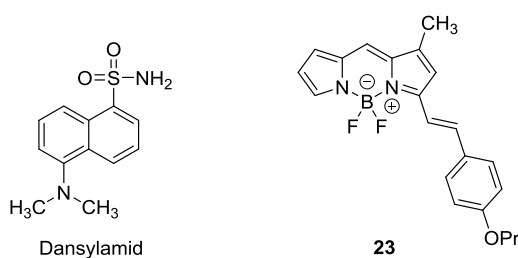


Abbildung 63: Strukturen von Dansylamid und dem 4-Propyloxy-BODIPY **23**.

Nach dem Vorbild des von Chang^[181] entwickelten bichromatischen Assays könnte mit Hilfe der NBD-markierten Fettsäure **8** als spezifischem Binder für eine dritte Wirkstoffbindestelle in Kombination mit zwei spezifischen, fluoreszenzmarkierten Bindern für Sudlow-Site I und II die Entwicklung eines trichromatischen Testsystems gelingen. Dieser Assay könnte zur simultanen Untersuchung dieser drei verschiedenen Wirkstoffbindestellen von HSA genutzt werden, sodass das Fluoreszenzsignal eine direkte Aussage über den Bindungsort liefert. Durch das Wissen über den Aufbau der einzelnen Bindetaschen könnte die zu untersuchende Verbindung anschließend modifiziert werden, um die Wirkstoffbindung spezifisch für eine Bindestelle zu optimieren. Ein Vorteil^[181] gegenüber den etablierten Methoden wie bspw. Kristallstrukturanalyse oder Assays mit radioaktiven Substanzen wäre die Anwendbarkeit in einem Hochdurchsatz-Screening. Eine Voraussetzung für ein trichromatisches Testsystem mit NBD-C₁₂ **8** ist, dass die neuen Farbstoffe solvatochrom sind und die Fluoreszenzen der einzelnen Farbstoffe nicht interferieren. Des Weiteren müsste der fluoreszierende Binder spezifisch mit hoher Affinität an HSA binden.

Um die Anwendbarkeit des 4-Propyloxy-BODIPYs **23** in Kombination mit NBD-C₁₂ **8** zu untersuchen, wurde zuerst dieser BODIPY-Farbstoff **23** synthetisiert. Dazu wurde das BODIPY **91** ausgehend von 2,4-Dimethylpyrrol (**92**) und Pyrrol-2-carbaldehyd (**93**) dargestellt (Abbildung 64). Anschließend wurde der BODIPY-Grundkörper **91** mit 4-(Propyloxy)benzaldehyd (**94**), der über eine Williamson-Ethersynthese mit 4-

Hydroxybenzaldehyd und 1-Brompropan zugänglich war, zum 4-Propyloxy-BODIPY **23** umgesetzt. Das gewünschte Produkt **23** konnte in einer Ausbeute von 41% isoliert werden.

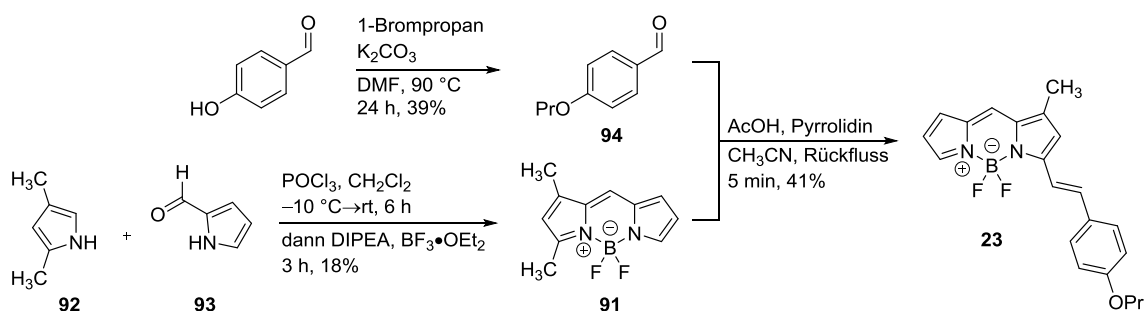


Abbildung 64: Synthese des von Chang entwickelten 4-Propyloxy-BODIPYs **23**.

Anschließend wurden die von *Chang* publizierten Daten bzgl. Dissoziationskonstante, Bindungsstöchiometrie im 4-Propyloxy-BODIPY-**23**/HSA-Komplex und Verdrängung durch Ibuprofen (**4**) evaluiert. Dazu wurden zunächst die Fluoreszenzspektren vom 4-Propyloxy-BODIPY **23** ohne und mit Zugabe von HSA aufgenommen, um die solvatochrome Eigenschaft des Farbstoffes nachzuweisen. Die Anregungswellenlänge ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$) wurde dem bichromatischen Testsystem von *Chang*^[181] entnommen. Wie erwartet steigt die Fluoreszenz des 4-Propyloxy-BODIPYs **23** nach der Zugabe von HSA deutlich an, sodass die erste Voraussetzung (polares Medium: keine/kaum Fluoreszenz, unpolares Medium: Fluoreszenz) für einen Einsatz im etablierten Testsystem von NBD- C_{12} **8** gegeben ist (Spektren nicht gezeigt). Die Titrationskurve des 4-Propyloxy-BODIPYs **23** zu HSA zeigt den initialen Anstieg bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen und geht ab einer Konzentration von ca. $12.5 \mu\text{M}$ in die Sättigung über (Abbildung 65A). Der experimentell ermittelte K_D -Wert ($K_D = 5.6 \pm 1.4 \mu\text{M}$) stimmt mit den Literaturdaten sehr gut überein (Lit.^[181] $K_D = 4.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$). Allerdings wird der Abfall der Fluoreszenzintensität bei einer Konzentration von ca. $50 \mu\text{M}$ in der Literatur nicht beschrieben, da das Sättigungsexperiment dort nur bis zu einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ durchgeführt wurde. Welcher Effekt dieser Fluoreszenzlöschung zugrunde liegt, ist nicht bekannt. Zur Bestimmung der Bindungsstöchiometrie wurde ein *Job-Plot*^[324-325] erstellt, der das postulierte^[181] 1:1 Verhältnis im 4-Propyloxy-BODIPY-**23**/HSA-Komplex bestätigte (Abbildung 65B).

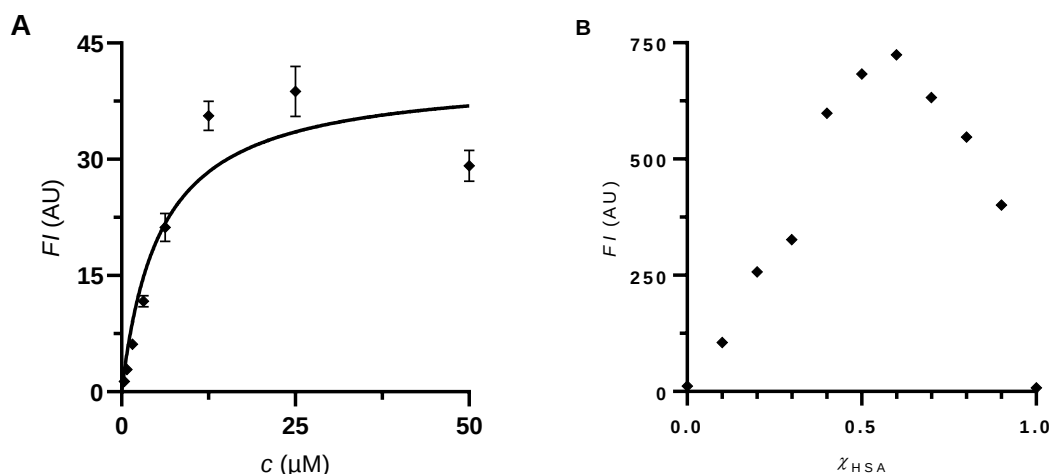
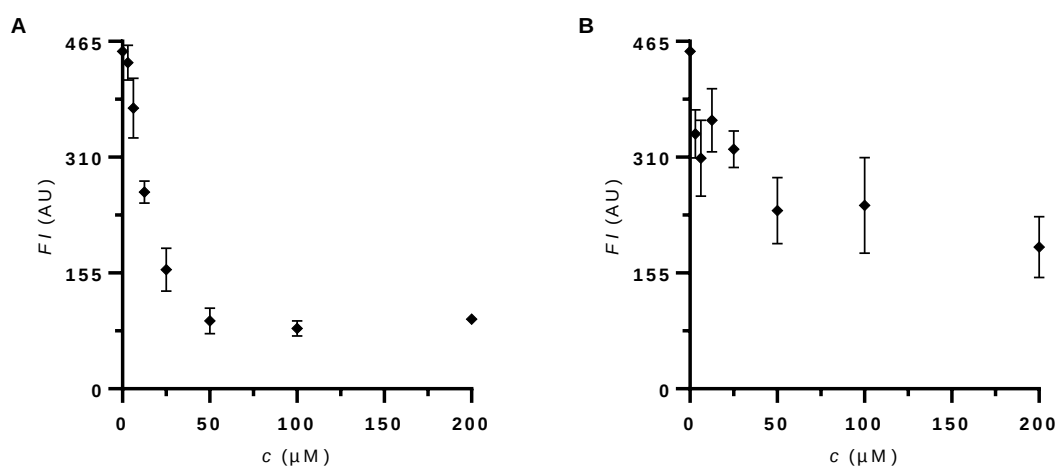


Abbildung 65: A) Titrationskurve von BODIPY 23 (0.39–50 μM) zu HSA (25 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 565 \text{ nm}$). B) Job-Plot von BODIPY 23 im Komplex mit HSA (50 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 565 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 588 \text{ nm}$).

Im anschließenden Konkurrenzexperiment mit Ibuprofen (**4**) wurde das 4-Propyloxy-BODIPY 23 durch Ibuprofen (**4**) verdrängt ($K_{\text{I}} = 1.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$, Abbildung 66A). Neben Ibuprofen (**4**) wurden auch Ketoprofen (**7**) und Naproxen (**95**) in Konkurrenzexperimenten eingesetzt (Abbildung 66B–C). Naproxen (**95**) zeigte sich kompetitiv zum 4-Propyloxy-BODIPY 23 ($K_{\text{I}} = 1.4 \pm 1.6 \mu\text{M}$), wohingegen die Konkurrenzkurve mit Ketoprofen (**7**) ab einer Konzentration von ca. 50 μM abfällt ($K_{\text{I}} = 13.5 \pm 3.2 \mu\text{M}$). Die Interpretation ist aufgrund großer Fehlerintervalle (Balken) allerdings nicht eindeutig (Abbildung 66B). Dennoch kann das von Chang^[181] entwickelte 4-Propyloxy-BODIPY 23 als spezifischer, fluoreszierender Binder für Sudlow-Site II verwendet werden.



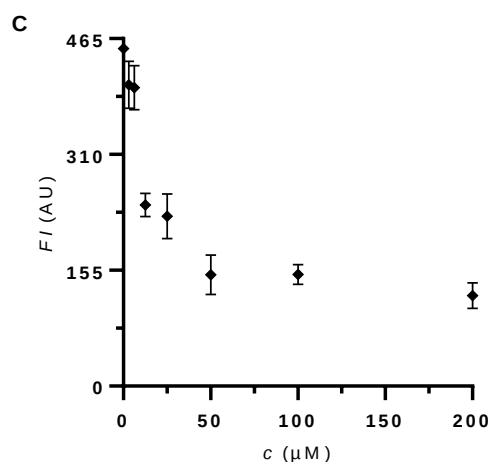


Abbildung 66: Konkurrenzexperiment von 4-Propyloxy-BODIPY 23/HSA (je 25 μM) mit: A) Ibuprofen (**4**). B) Ketoprofen (**7**). C) Naproxen (**95**). $\lambda_{\text{exc}} = 565 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 588 \text{ nm}$.

Dansylamid wurde von Sudlow et al.^[173-174] und Chang^[181] als Fluoreszenzmarker für Sudlow-Site I verwendet. Kristallisationsstudien von Curry^[202] und Vorarbeiten von Volkmar^[320] weisen jedoch darauf hin, dass das Dansyllabel eine Eigenaffinität besitzt. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein Job-Plot mit Dansyl-markierter Laurinsäure **96** (Dansyl- C_{12}) durchgeführt. Diese Dansyl-markierte C_{12} -Fettsäure **96** wurde durch Umsetzung von 12-Aminododecansäure (**97**) mit 5-(Dimethylamino)naphth-1-ylsulfonsäurechlorid (**98**) in einer Ausbeute von 60% erhalten.

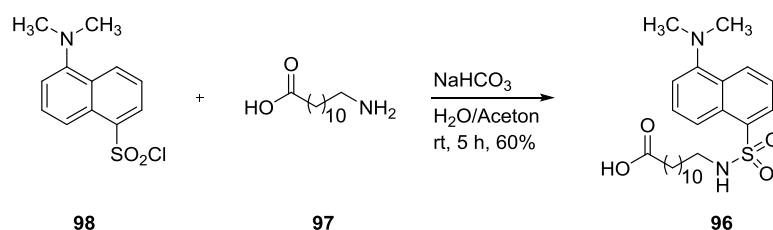


Abbildung 67: Synthese der Dansyl-gelabelten Laurinsäure **96**.

Neben den Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Dansyl- C_{12} **96** wurde auch ein Fluoreszenzspektrum nach der Zugabe von HSA aufgenommen, um den solvatochromen Effekt für Dansyl- C_{12} **96** nachzuweisen. Die Zunahme der Fluoreszenz nach der Zugabe von HSA bestätigt die solvatochrome Eigenschaft der Dansyl-markierten Fettsäure **96** (Spektren nicht gezeigt).

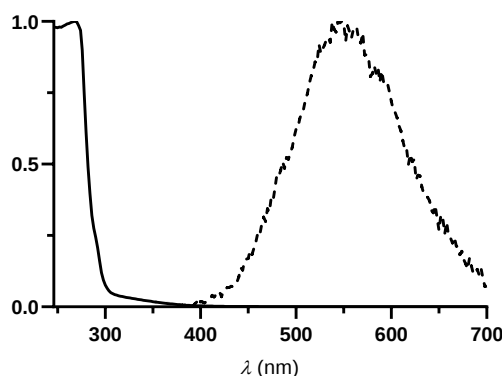


Abbildung 68: A) Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$, gestrichelt) von Dansyl- C_{12} **96** (normiert, je $40 \mu\text{M}$ DPBS (0.4% EtOH)).

Um zu überprüfen, ob bei der Zugabe von Dansyl- C_{12} **96** zu HSA eine Sättigung erreicht wird, wurde ein Titrationsexperiment durchgeführt (Abbildung 69A). Die Titrationskurve zeigt, dass die Sättigung bei einem Dansyl- C_{12} -**96**/HSA-Verhältnis von ca. 8:1 erreicht wird. Zur Bestimmung der genauen Bindungsstöchiometrie wurde wiederum ein *Job*-Plot^[324-325] erstellt (Abbildung 69B).

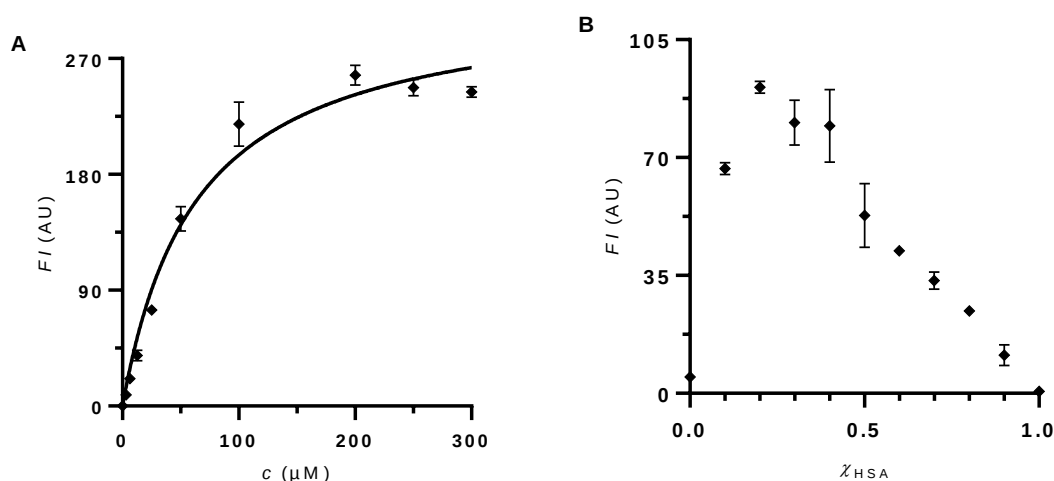
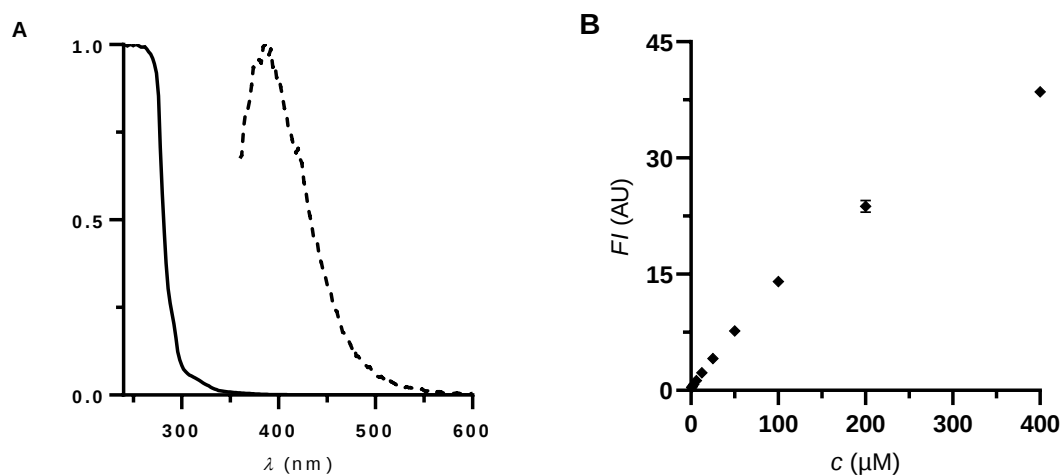


Abbildung 69: A) Titrationskurve von Dansyl- C_{12} **96** (0–300) zu HSA ($12.5 \mu\text{M}$). B) *Job*-Plot von Dansyl- C_{12} **96** im Komplex mit HSA ($25 \mu\text{M}$). $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$.

Auch wenn der *Job*-Plot bei einem Stoffmengenanteil von HSA von 0.3–0.4 große Fehlerbalken aufweist, ist unter Beachtung der Literaturdaten^[202, 320] von einer Eigenaffinität des Fluoreszenzlabels auszugehen. Dies wurde auch von Curry^[202] beobachtet, der die Eigenaffinität auf Wasserstoffbrückbindungen zwischen der Sulfonylgruppe und verschiedenen Aminosäuren (Arg-222, Tyr-411, Ser-489) sowie auf die Wechselwirkung zwischen dem Amid-Stickstoff und der Aminosäure Ala-291 zurückzuführen. Da die Dansyl-markierte Fettsäure **96** nicht als spezifischer Binder für Sudlow-Site I in Betracht kommt, wurde nach einer Alternative gesucht. Als bekannter

Sudlow-Site I-Binder wurde Warfarin (**2**) bereits von mehreren Arbeitsgruppen^[118, 168, 235] als Site-Label für diese Bindestelle an HSA in Kompetitionsassays eingesetzt. Ähnlich wie bei der NBD-markierten Fettsäure **8** wurde sich auch hier die Fluoreszenzzunahme von Warfarin (**2**) durch die Bindung an HSA zunutze gemacht. Um die Eignung von Warfarin (**2**) als spezifischen Binder für Sudlow-Site I zu überprüfen, wurden zunächst das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von racemischem Warfarin (**2**) aufgenommen (Abbildung 70A). Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen an Warfarin (**2**) zu DPBS titriert sowie das Fluoreszenzspektrum nach Zugabe von HSA gemessen (Abbildung 70B–C). Mit Hilfe dieser beiden Experimente wurde zum einen der in der Literatur^[118, 168, 235] beschriebene, solvatochrome Effekt nachgewiesen, zum anderen ist ein linearer Anstieg der Fluoreszenz bis zu einer Konzentration von 100 μM zu erkennen. Diese Beobachtung ist für den Fluoreszenzassay von Bedeutung, um einen Abfall der Fluoreszenzintensität aufgrund von Fluoreszenzlöschung ausschließen zu können. Das Sättigungsexperiment mit Warfarin (**2**) an HSA zeigt den initialen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit Übergang in die Sättigung bei einem Warfarin-(**2**)/HSA-Verhältnis von ca. 4–5:1. Die Dissoziationskonstante wurde mit $31.3 \pm 3.4 \mu\text{M}$ (Lit.^[118, 235] K_D (Warfarin) = 4–11 μM) berechnet und ist somit mit der K_D von NBD- C_{12} **8** vergleichbar.



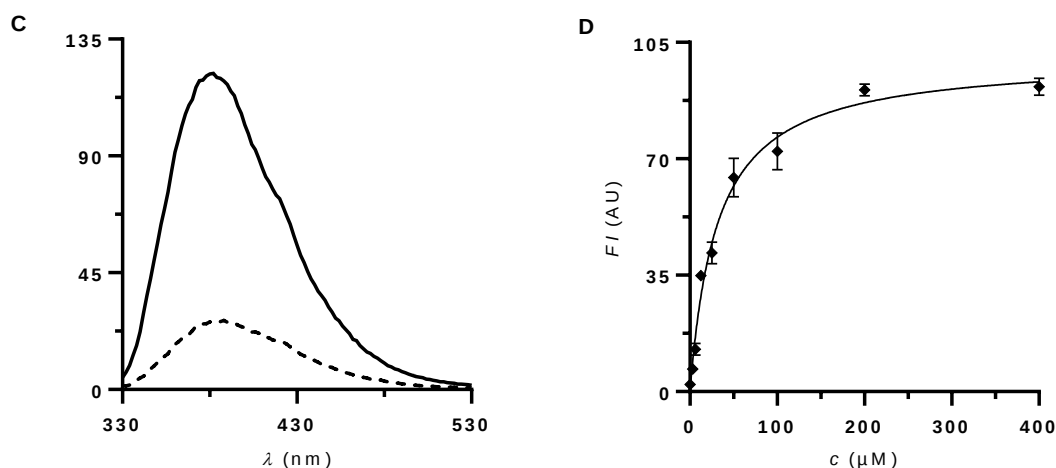


Abbildung 70: A) Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{exc} = 309$ nm, gestrichelt) von Warfarin (2) (normiert, je $40 \mu\text{M}$ in DPBS/EtOH(0.4%)). B) Titration von Warfarin (2) ($0\text{--}200 \mu\text{M}$) zu DPBS. $\lambda_{exc} = 309$ nm. $\lambda_{em} = 388$ nm. C) Fluoreszenzspektrum von Warfarin (2) ohne (---) und mit (—) HSA (je $40 \mu\text{M}$). $\lambda_{exc} = 309$ nm. D) Titrationskurve von Warfarin (2) ($0\text{--}400 \mu\text{M}$) zu HSA ($25 \mu\text{M}$). $\lambda_{exc} = 309$ nm. $\lambda_{em} = 388$ nm.

Der Job-Plot^[324-325] zeigt die gewünschte 1:1 Bindungsstöchiometrie im Warfarin-(2)/HSA-Komplex (Abbildung 71A). Für das Konkurrenzexperiment mit Warfarin (2) als Site-Label wurde Iphenoxinsäure (5) als bekannter^[172, 235, 242, 258] Sudlow-Site I-Binder gewählt. Iphenoxinsäure (5) zeigte sich, wie bereits beschrieben, kompetitiv zu Warfarin (2) ($K_I = 2.5 \pm 1.7 \mu\text{M}$, siehe Abschnitt 3.1).

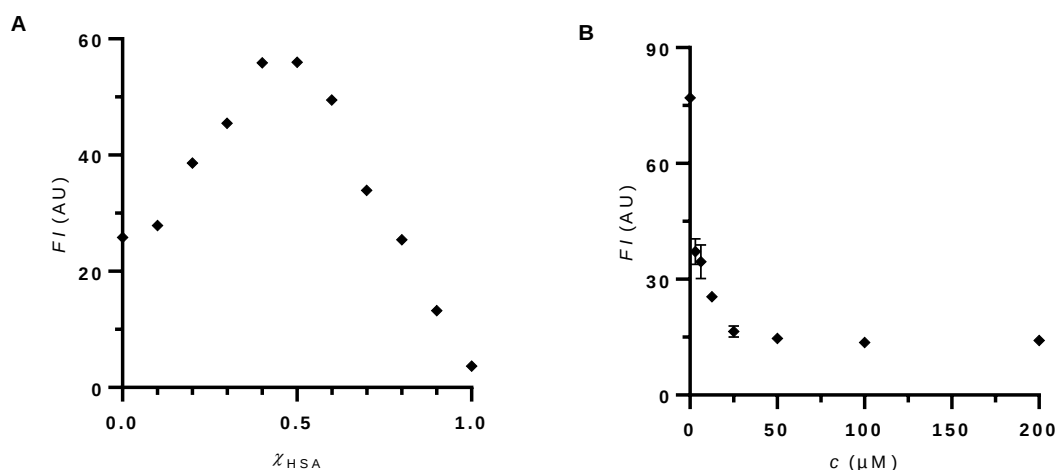


Abbildung 71: A) Job-Plot von Warfarin (2) im Komplex mit HSA ($25 \mu\text{M}$). B) Konkurrenzexperiment von Warfarin (2)/HSA (je $25 \mu\text{M}$) mit Iphenoxinsäure (5). $\lambda_{exc} = 309$ nm, $\lambda_{em} = 388$ nm.

Des Weiteren wurden Salicylsäure (32), Myristinsäuremethylester (9) und Cholesterin im Hinblick auf eine potentielle Konkurrenz untersucht. Beim Vergleich der drei Konkurrenzkurven ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität im Experiment mit Salicylsäure (32) deutlich zu erkennen (Abbildung 72A–C). In eigenen Arbeiten^[326] wurde ein solcher Anstieg z.B. bei hohen Konzentrationen ($100 \mu\text{M}$) von Ibuprofen (4)

beobachtet. Von *Wade*^[174] wurde ein Anstieg der Fluoreszenzintensität von Warfarin (**2**) bei Zugabe des Sudlow-Site II-Binders Ibuprofen (**4**) beschrieben. Laut *Carter*^[45] können Konformationsänderungen in Domäne II durch die Bindung von Liganden in Domäne III induziert werden, die auf eine gemeinsame Grenzfläche zwischen Subdomäne IIA und IIIA zurückgeführt werden können. Seiner Einschätzung nach wäre auch die Beeinflussung der Bindungsaffinitäten von Liganden, die in Domäne II binden, auf diesem Wege möglich. Unter Beachtung dieser Erkenntnisse weisen die Daten aus dem Konkurrenzexperiment auf die Bindung von Salicylsäure (**32**) in Sudlow-Site II hin. Dass Salicylsäure (**32**) in Sudlow-Site II bindet, wurde von *Carter*^[47] anhand kristallographischer Daten gezeigt. Auch Myristinsäuremethylester (**9**) ist bis zu einer Konzentration von ca. 100 μM nicht kompetitiv und bindet somit ebenfalls nicht in Sudlow-Site I (Abbildung 72B). Cholesterin ($K_I = 65.9 \pm 1.3 \mu\text{M}$) verdrängt Warfarin (**2**) mit niedriger Affinität aus der Bindestelle (Abbildung 72C). Diese Beobachtungen bestätigen die Daten aus eigenen^[326] Vorarbeiten.

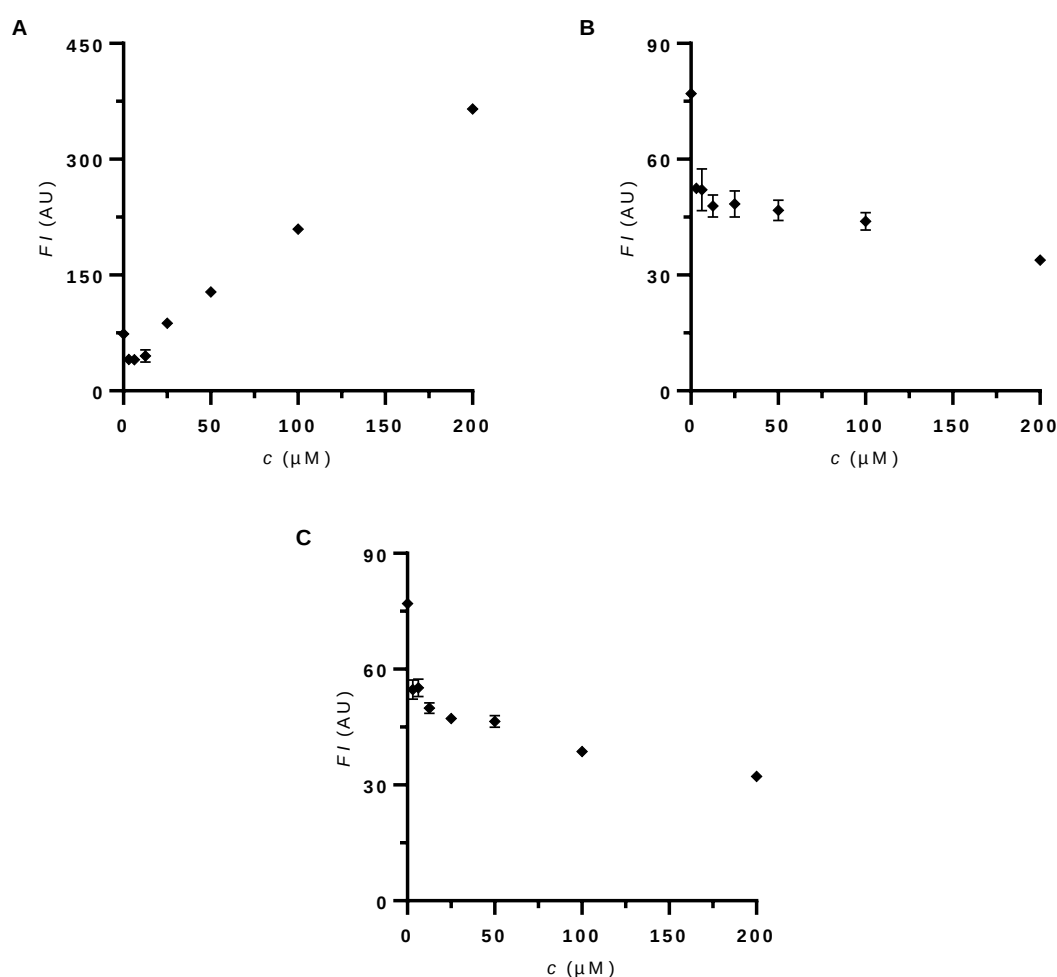


Abbildung 72: Konkurrenzexperiment von Warfarin-(2)/HSA (je 25 μM) mit: A) Salicylsäure (**32**). B) Myristinsäuremethylester (**9**). C) Cholesterin. $\lambda_{\text{exc}} = 309 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 388 \text{ nm}$.

Warfarin (**2**) erfüllt alle geforderten Eigenschaften eines site-spezifischen, fluoreszierenden Binders. Die vorliegenden Ergebnisse sind auch im Einklang mit Literaturdaten. Somit kann Warfarin (**2**) direkt als Site-Label für Sudlow-Site I in Konkurrenzexperimenten eingesetzt werden.

Zum Aufbau eines trichromatischen Assays zur Bestimmung der Albuminbindung wurden die drei site-spezifischen Farbstoffe NBD- C_{12} **8**, Warfarin (**2**) und das von Chang entwickelte 4-Propyloxy-BODIPY **23** in einem ersten Versuch kombiniert. Die drei Farbstoffe wurden jeweils mit einer Konzentration von 8 μM eingesetzt, um eine maximale Empfindlichkeit zu erreichen. Myristinsäure (NBD- C_{12} **8**), Ibuprofen (4-Propyloxy-BODIPY **23**) und Bumetanid (Warfarin (**2**)) wurden als Testverbindungen für die Konkurrenzexperimente gewählt, da sie spezifisch in je einer der zu untersuchenden Bindestellen binden. Der Einsatz von Bumetanid beruht darauf, dass es von *Sjödin*^[146] als Sudlow-Site I-Binder beschrieben und dieses Ergebnis in eigenen Arbeiten^[326] bestätigt wurde.

Im trichromatischen Konkurrenzexperiment (Abbildung 73A) verdrängt Myristinsäure (**3**) ab einer Konzentration von ca. 12.5 μM wie gewünscht die NBD-markierte Fettsäure **8**. Eine Konkurrenz mit Warfarin (**2**) wird nicht beobachtet. Bemerkenswert ist, dass sich Myristinsäure (**3**) ab einer Konzentration von ca. 25 μM kompetitiv zum 4-Propyloxy-BODIPY **23** zeigt (Abbildung 73B).

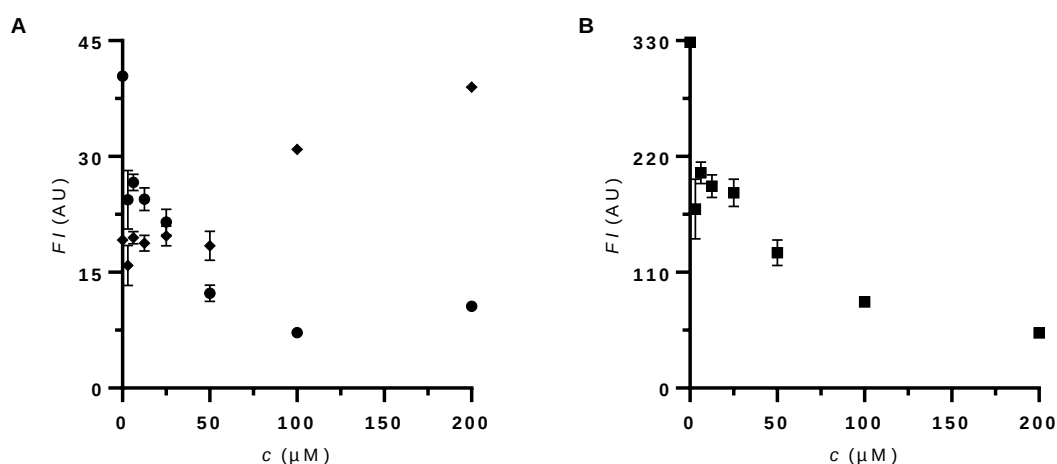


Abbildung 73: Konkurrenzexperiment mit Myristinsäure (**3**) (0–200 μM). A) ♦ Warfarin-(**2**)/HSA. ● NBD- C_{12} -**8**/HSA. B) 4-Propyloxy-BODIPY-**23**/HSA.

Die Konkurrenzkurven mit Ibuprofen (**4**) zeigen sowohl bei NBD- C_{12} **8** als auch bei Warfarin (**2**) keine Abnahme der Fluoreszenzintensität (Abbildung 74A). Die gewünschte Verdrängung des spezifischen Sudlow-Site II-Markers **23** ist jedoch deutlich zu erkennen (Abbildung 74B).

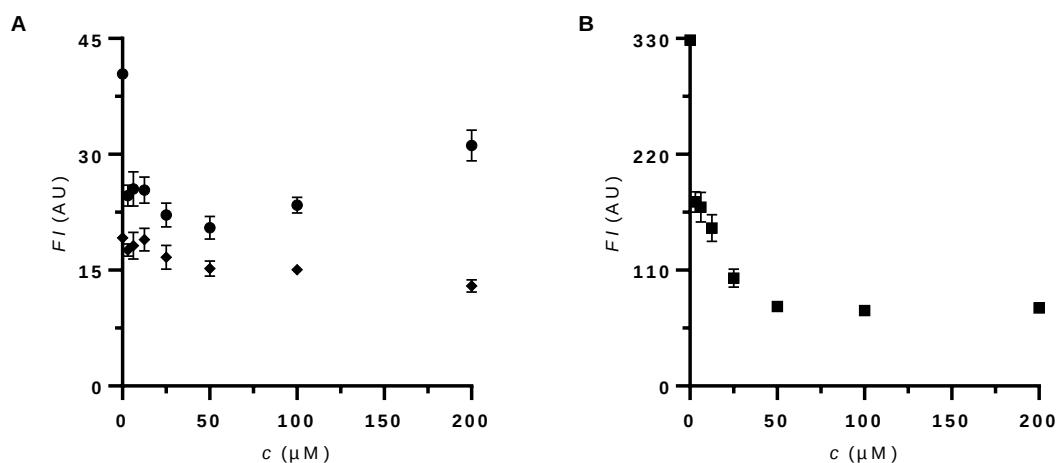


Abbildung 74: Konkurrenzexperiment mit Ibuprofen (**4**) (0–200 µM) mit: A) ♦ Warfarin-(2)/HSA. • NBD- C_{12} -**8**/HSA. B) 4-Propyloxy-BODIPY-**23**/HSA.

Interessanterweise ist bei keinem der Konkurrenzexperimente mit Bumetanid (Abbildung 75) eine Verdrängung zu beobachten. Dies war bei der NBD-markierten Fettsäure **8** sowie bei dem 4-Propyloxy-BODIPY **23** zu erwarten, allerdings sollte Bumetanid kompetitiv zu dem Sudlow-Site I-Marker Warfarin (**2**) sein.

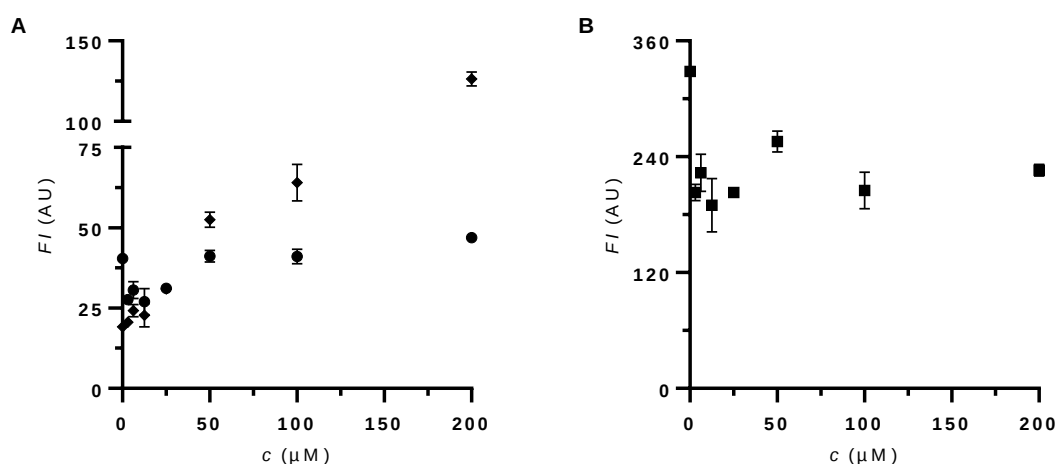


Abbildung 75: Konkurrenzexperiment mit Bumetanid (0–200 µM) mit: A) ♦ Warfarin-(2)/HSA. • NBD- C_{12} -**8**/HSA. B) 4-Propyloxy-BODIPY-**23**/HSA.

Um die Ursache für den Anstieg der Fluoreszenzintensität zu finden, wurde zunächst ein Konkurrenzexperiment von Warfarin-(2)/HSA mit Bumetanid durchgeführt (Abbildung 76).

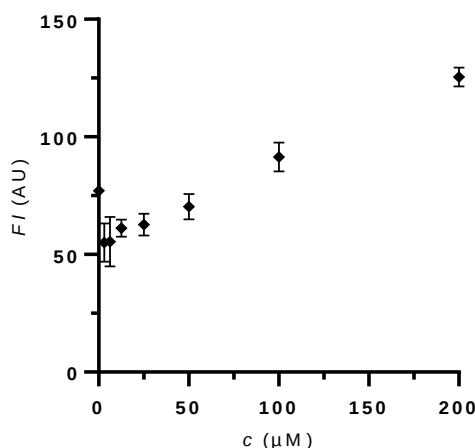


Abbildung 76: Konkurrenzexperiment von Warfarin-(2)/HSA (je 25 μM) mit Bumetanid. $\lambda_{\text{exc}} = 309 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 388 \text{ nm}$.

Da auch in diesem Experiment keine Verdrängung von Warfarin (2) zu beobachten ist, kann eine durch die drei simultan gebundenen Farbstoffe 2, 8 und 23 induzierte Konformationsänderung von HSA, die zu einer Erhöhung der Bindeaffinität von Warfarin (2) führen und die Verdrängung aus Sudlow-Site I erschweren könnte, ausgeschlossen werden. Um eine intrinsische Fluoreszenz von Bumetanid ausschließen zu können, wurden die Fluoreszenzintensitäten einer 25 μM Bumetanid-Lösung bei den drei zuvor verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen ohne HSA bestimmt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Fluoreszenzintensitäten von Bumetanid bei verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen.

#	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	FI (AU)	Site-Label
1	309	388	36.36	Warfarin (2)
2	435	535	0.03	NBD- C_{12} 8
3	565	588	3.84	4-Propyloxy-BODIPY 23

Bei einer Anregungswellenlänge von 435 nm bzw. 565 nm ist keine bzw. eine geringe Fluoreszenz zu erkennen. Auffällig ist jedoch der FI-Wert bei einer Anregung bei 309 nm. Diesen Daten zufolge ist der Anstieg der Fluoreszenzintensitäten in den Konkurrenzexperimenten (siehe Abbildung 75, Abbildung 76) auf eine intrinsische Fluoreszenz von Bumetanid zurückzuführen. Somit ist Bumetanid nicht als Testsubstanz für Sudlow-Site I geeignet und es wurde auf Iophenoxinsäure (5) als alternative Testverbindung zurückgegriffen (Abbildung 77).

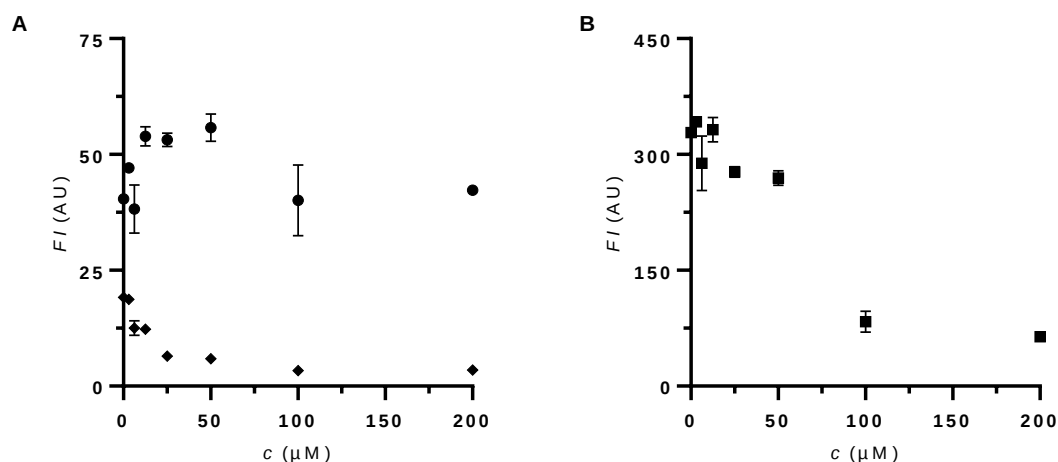


Abbildung 77: Konkurrenzexperiment mit Iphenoxinsäure (5) (0–200 µM) mit: A) ♦ Warfarin-(2)/HSA. • NBD-C₁₂-8/HSA. B) 4-Propyloxy-BODIPY-23/HSA.

Die Titrationskurve aus dem trichromatischen Konkurrenzexperiment mit NBD-C₁₂-8/HSA zeigt bis zu einer Konzentration von ca. 50 µM einen Anstieg der FI-Werte. Somit ist Iphenoxinsäure (5) wie erwartet nicht kompetitiv zur NBD-markierten Fettsäure **8** (Vgl. Abbildung 30). Die Verdrängung von Warfarin (**2**) ist jedoch deutlich zu erkennen. Gleichzeitig ist auch die Konkurrenz des 4-Propyloxy-BODIPYs **23** bei hohen Konzentrationen (>50 µM) zu beobachten. Demnach bindet Iphenoxinsäure (5) nicht nur in Sudlow-Site I, sondern besitzt vermutlich auch noch eine sekundäre Bindestelle (Sudlow-Site II). Diese Vermutung wird durch kristallographische Arbeiten von Curry^[258] bestätigt. Um Sudlow-Site II als sekundäre Bindestelle von Iphenoxinsäure (5) auch fluoreszenzspektroskopisch zu bestätigen, wurde ein Konkurrenzexperiment von 4-Propyloxy-BODIPY-23/HSA mit Iphenoxinsäure (5) durchgeführt. Die Daten aus diesem Experiment weisen auf eine Konkurrenz ab einer Konzentration von ca. 100 µM hin, können allerdings aufgrund der Schwankungen nicht eindeutig interpretiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die vorgestellten Konkurrenzexperimente (Abbildung 73–74, Abbildung 77) zeigen, dass das trichromatische Testsystem funktioniert. Um den Bereich zwischen der Emissionswellenlänge von NBD-C₁₂ **8** und der Absorption des 4-Propyloxy-BODIPYs **23** zu erweitern, wurden verschiedene BODIPY-Derivate synthetisiert. Zur bathochromen Verschiebung der Absorption des 4-Propyloxy-BODIPYs **23** wurden aromatische Aldehyde mit elektronenschiebenden Gruppen in der Kondensationsreaktion mit dem BODIPY-Grundkörper **91** eingesetzt (Abbildung 78). Um den Trend der bathochromen Verschiebung zu veranschaulichen, wurde zusätzlich 4-(Trifluormethyl)benzaldehyd

verwendet. Mit Ausnahme des Trifluormethyl-BODIPYs **102** konnten die gewünschten Produkte **99–101** in Ausbeuten von 44–81% erhalten werden.

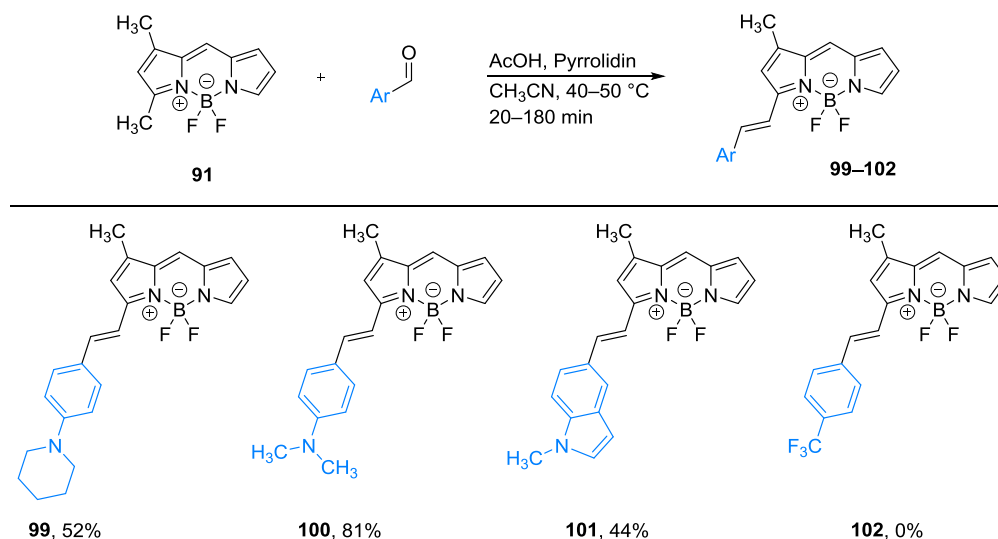


Abbildung 78: Synthese der BODIPY-Derivate **99–102**.

Um Zugang zu weiteren BODIPY-Derivaten über palladiumkatalysierte Kreuzkupplungen zu erhalten, wurde der bromierte BODIPY-Grundkörper **103** synthetisiert (Abbildung 79). Dazu wurde Pyrrol-2-carbaldehyd (**93**) mit NBS bromiert und das Produkt **104** mit 2,4-Dimethylpyrrol (**92**) zum bromierten BODIPY **103** in einer Ausbeute von 21% umgesetzt. Anschließend wurde der bromierte BODIPY-Grundkörper **103** durch eine Kondensation mit 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzaldehyd in das bromierte Dimethylamino-BODIPY **105** überführt. Das gewünschte Produkt **105** wurde in einer hohen Ausbeute von 81% isoliert.

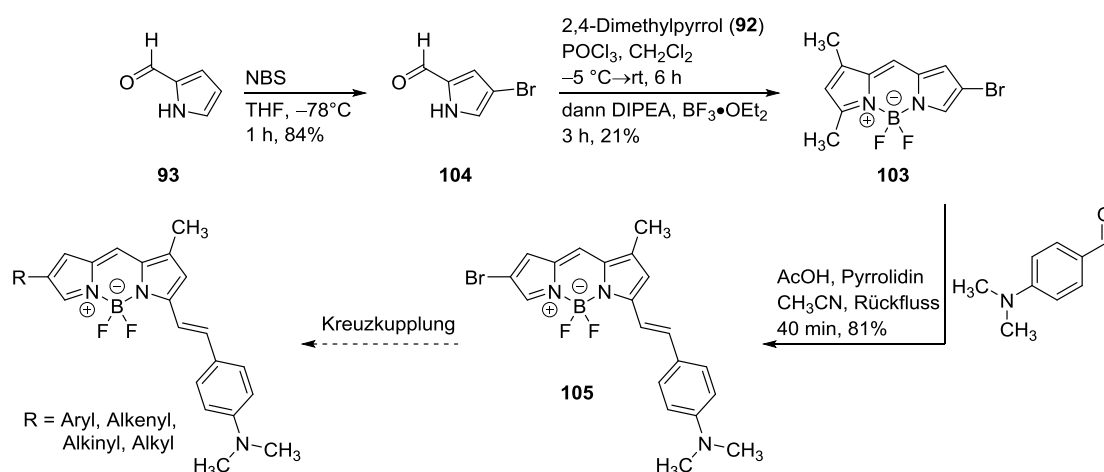


Abbildung 79: Synthese des bromierten Dimethylamino-BODIPY-Farbstoffes **105**.

Zuerst wurde die Eignung der BODIPY-Derivate **99–101** als spezifische Binder für Sudlow-Site II geprüft. Dazu wurden jeweils die Absorptions- und Fluoreszenzspektren

aufgenommen, um geeignete Anregungs- und Emissionswellenlängen zu ermitteln und den Stokes-Shift sowie den molaren Extinktionskoeffizienten (ε) der Farbstoffe **99–101** zu bestimmen. Das Indolyl-BODIPY **101** zeigt im Fluoreszenzspektrum nach Zugabe von HSA den solvatochromen Effekt (Spektrum nicht gezeigt). Mit zunehmender Konzentration an Indolyl-BODIPY **101** in DPBS ist ebenfalls der lineare Anstieg der Fluoreszenzintensität zu erkennen (Abbildung 80B). Im Titrationsexperiment mit HSA wird die Sättigung bei einer Konzentration von ca. 25 μM bei einem Indolyl-BODIPY-**101**/HSA-Verhältnis von ungefähr 2:1 erreicht ($K_D = 5.8 \pm 0.8 \mu\text{M}$). Der Job-Plot^[324-325] zeigt die gewünschte 1:1 Bindungsstöchiometrie im BODIPY-**101**/HSA-Komplex (Abbildung 80D).

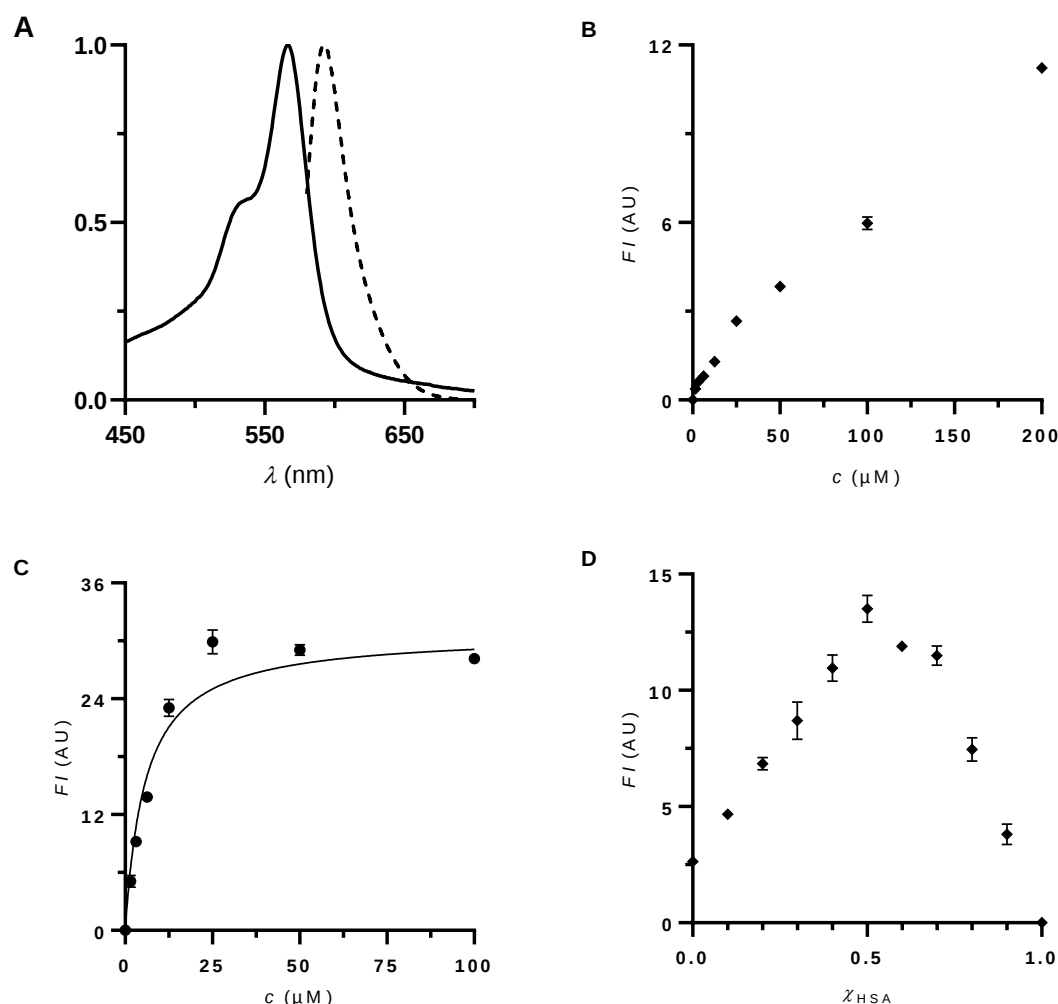


Abbildung 80: A) Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 567 \text{ nm}$, gestrichelt) von BODIPY **101** (normiert in EtOH). B) Titration von BODIPY **101** (0–200 μM) zu DPBS. $\lambda_{\text{exc}} = 554 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$. C) Titrationskurve von BODIPY **101** (0–100 μM) zu HSA (12.5 μM). $\lambda_{\text{exc}} = 554 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$. D) Job-Plot von BODIPY **101** im Komplex mit HSA (12.5 μM). $\lambda_{\text{exc}} = 554 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$.

Auch das Piperidiny-BODIPY **99** zeigt nach Zugabe von HSA den solvatochromen Effekt im Fluoreszenzspektrum (Spektrum nicht gezeigt). Der lineare Anstieg der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Konzentration an Piperidiny-BODIPY **99** in DPBS ist ebenfalls zu beobachten (Abbildung 81B). Die Sättigungskurve mit HSA geht bei einer Konzentration von ca. 12.5 μM und bei einem Piperidiny-BODIPY-**99**/HSA-Verhältnis von ca. 1:1 in die Sättigung über ($K_D = 3.6 \pm 0.7 \mu\text{M}$). Der *Job*-Plot^[324-325] zeigt im BODIPY-**99**/HSA-Komplex eine 1:1 Bindungsstöchiometrie (Abbildung 81D).

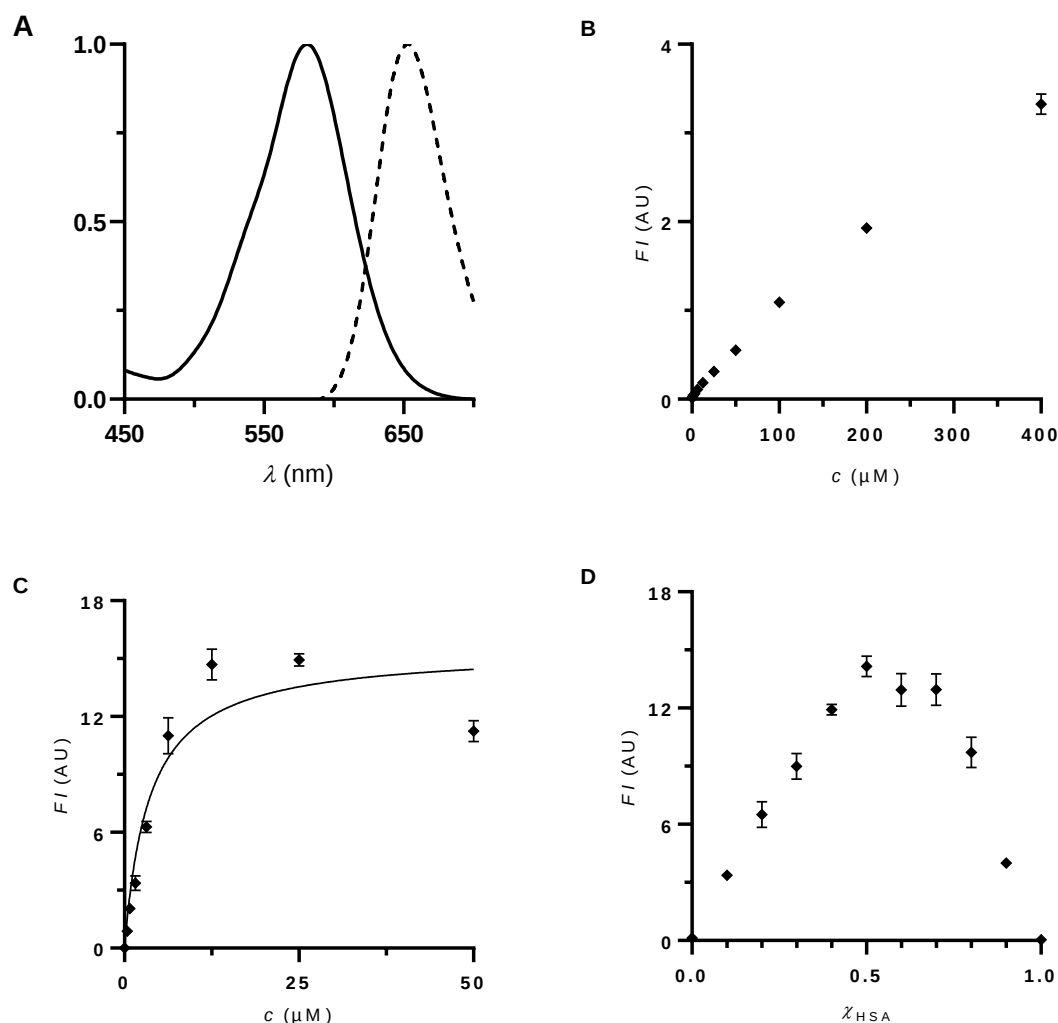


Abbildung 81: A) Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 581 \text{ nm}$, gestrichelt) von BODIPY **99** (normiert in EtOH). B) Titration von BODIPY **99** (0–400 μM) zu DPBS. $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 678 \text{ nm}$. C) Titrationskurve von BODIPY **99** (0–50 μM) zu HSA (12.5 μM). $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 678 \text{ nm}$. D) Job-Plot von BODIPY **99** im Komplex mit HSA (12.5 μM).

Für das Konkurrenzexperiment von den BODIPY-Farbstoffen **99** und **101** als Site-Label für Sudlow-Site II wurde wie zuvor Ibuprofen (**4**) als Testverbindung gewählt. In diesem Test verdrängt der Wirkstoff **4** wie erwartet sowohl das Indolyl-BODIPY **101** ($K_1 = 0.30$

$\pm 2.0 \mu\text{M}$) wie auch das Piperidinyl-BODIPY **99** ($K_I = 0.98 \pm 1.2 \mu\text{M}$) jeweils aus der Bindetasche in Subdomäne IIIA (Abbildung 82A–B).

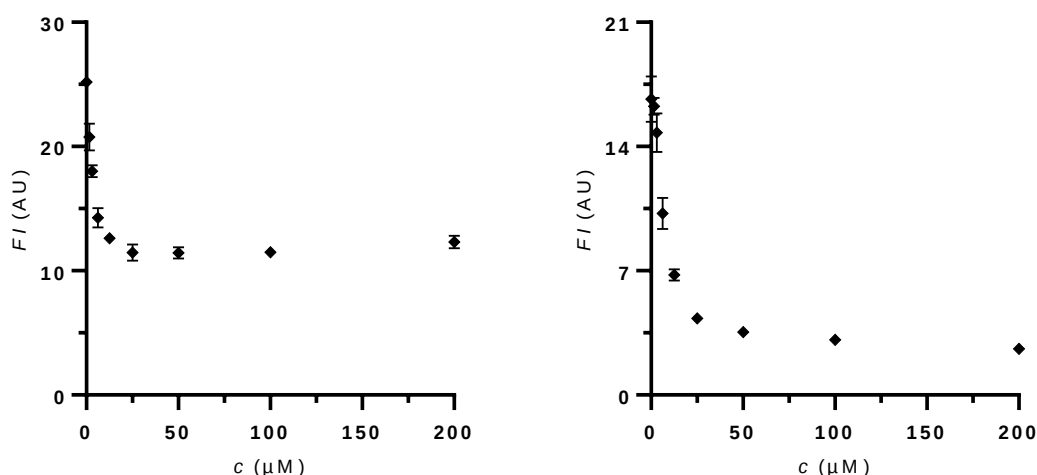


Abbildung 82: Konkurrenzexperiment mit Ibuprofen (**4**) (0–200 μM) mit: A) Indolyl-BODIPY-**101**/HSA (je 12.5 μM). $\lambda_{\text{exc}} = 554 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$. B) Piperidinyl-BODIPY-**99**/HSA (je 12.5 μM). $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 678 \text{ nm}$.

Der Anstieg der Fluoreszenz bei Zugabe von HSA ist wie erwartet auch bei dem Dimethylamino-BODIPY **100** zu beobachten (Spektrum nicht gezeigt). In DPBS steigt mit zunehmender Konzentration des BODIPY-Farbstoffes **100** die Fluoreszenzintensität an (Abbildung 83B). Im Sättigungsexperiment an HSA wird bei einer Konzentration von ca. 12.5 μM die Sättigung erreicht, was einem Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA-Verhältnis von ca. 1:1 entspricht. Die Dissoziationskonstante wurde mit $K_D = 4.6 \pm 0.8 \mu\text{M}$ berechnet. Der *Job-Plot*^[324-325] zeigt im BODIPY-**100**/HSA-Komplex die gewünschte 1:1 Bindungsstöchiometrie und Ibuprofen (**4**) verdrängt das Dimethylamino-BODIPY **100** aus Sudlow-Site I ($K_I = 0.86 \pm 1.6 \mu\text{M}$, Abbildung 83D–E).

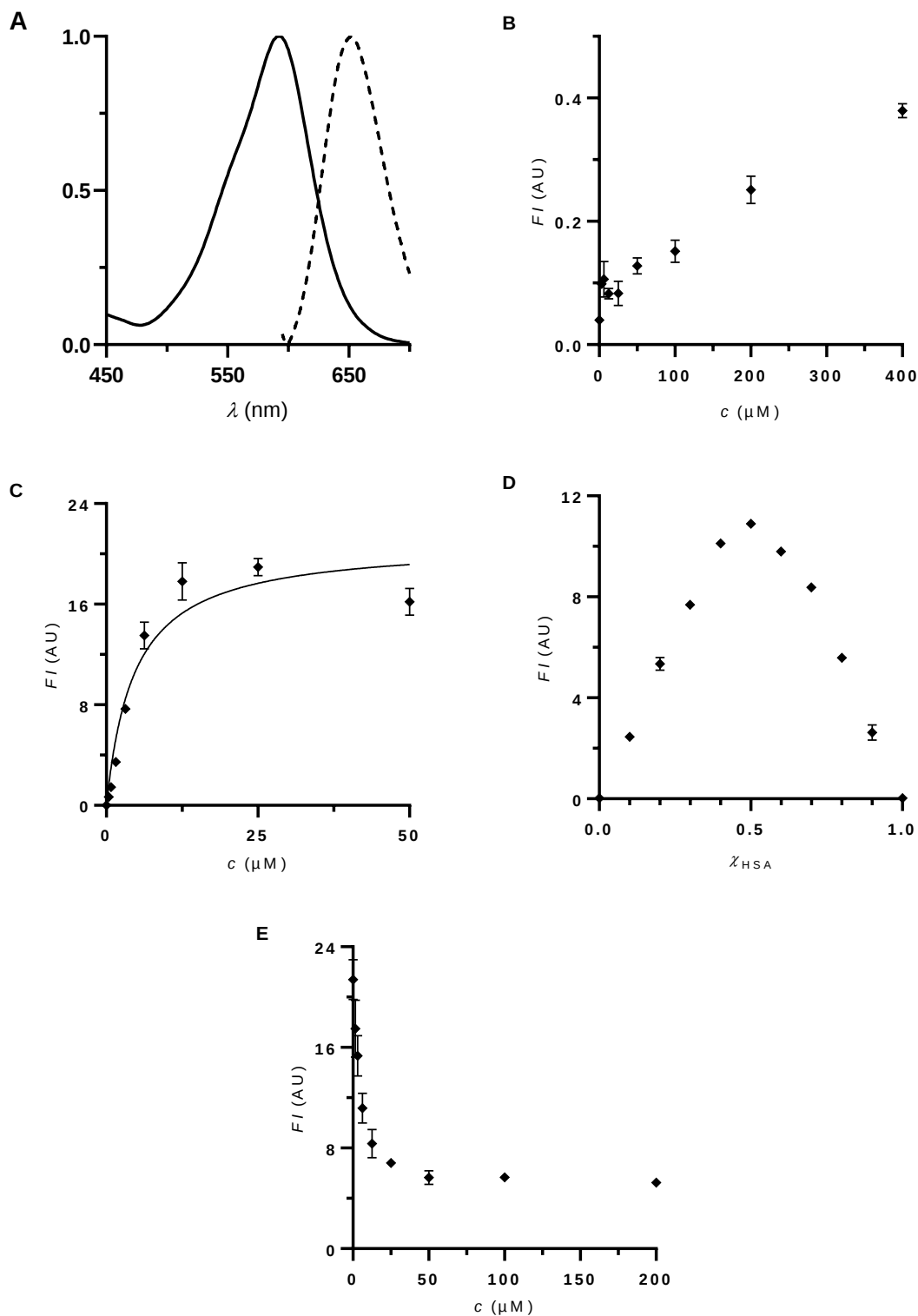


Abbildung 83: Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 593 \text{ nm}$, gestrichelt) von BODIPY **100** (normiert in EtOH). B) Titration von BODIPY **100** (0–400 μM) zu DPBS. $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$. C) Titrationskurve von BODIPY **100** (0–50 μM) zu HSA (12.5 μM). $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$. D) Job-Plot von BODIPY **100** im Komplex mit HSA (12.5 μM). $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$. E) Konkurrenzexperiment von BODIPY-100/HSA (je 25 μM) mit Ibuprofen (**4**). $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$.

Tabelle 5: Spektroskopische Daten zu den BODIPY-Derivaten **23** und **99–101**.

	$\lambda_{\text{max,abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max,em}}$ (nm)	Stokes-Shift (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
4-Propyloxy-BODIPY ^[342] 23 ^a	560	580	20	39130
Indolyl-BODIPY 101 ^b	567	592	25	8081
Piperidiny-BODIPY 99 ^b	581	653	72	28859
Dimethylamino-BODIPY 100 ^b	593	652	59	26457

^a Spektren gemessen in 100 μM MeOH. ^b Spektren gemessen in 40 μM EtOH.

Prinzipiell erfüllen alle drei BODIPY-Farbstoffe **99–101** die Voraussetzungen, um jeweils in Konkurrenzexperimenten als spezifischer Marker für Sudlow-Site II eingesetzt zu werden. Die stoffspezifischen Daten der BODIPYs **99–101** wurden in Tabelle 5 zusammengefasst und den Daten des von *Chang* entwickelten 4-Propyloxy-BODIPYs **23** gegenübergestellt. Allerdings wird für die Kombination des BODIPY-Farbstoffes mit zwei weiteren Farbstoffen (u.a. NBD-C₁₂ **8**) ein Farbstoff benötigt, der im Bereich von 600 nm absorbiert, um Interferenzen mit der NBD-markierten Fettsäure **8** möglichst zu minimieren. Das Indolyl-BODIPY **101** ist hierfür nicht geeignet, da die Anregung des Farbstoffes ($\lambda_{\text{exc}} = 554$ nm) zu nah an der Emissionswellenlänge von NBD-C₁₂ **8** liegt und das Indolyl-BODIPY **101** zusätzlich bei 435 nm, der Anregungswellenlänge von NBD-C₁₂ **8**, absorbiert. Das Piperidiny-BODIPY **99** und das Dimethylamino-BODIPY **100** sind hinsichtlich ihrer Anregungswellenlänge vergleichbar. Auch die Bindungsparameter für HSA sind identisch, weshalb in diesem Bereich keiner dieser beiden Farbstoffe zu bevorzugen ist. Da die Synthese des Dimethylamino-BODIPYs **100** mit deutlich höherer Ausbeute möglich und 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzaldehyd zu einem erheblich günstigeren Preis verfügbar ist, wurde das Dimethylamino-BODIPY **100** als fluoreszierender, spezifischer Binder für Sudlow-Site II in den nachfolgenden Konkurrenzexperimenten eingesetzt.

Um den Assay mit Dimethylamino-BODIPY **100** zu validieren, die bisherigen Ergebnisse aus den Konkurrenzexperimenten mit NBD-C₁₂ **8** zu evaluieren und die Schlussfolgerungen aus eigenen Arbeiten^[326] hinsichtlich der Bindung von Indometacin, Diclofenac, Meloxicam, Paracetamol sowie Celecoxib zu bestätigen, wurden diese Verbindungen in Konkurrenzexperimenten mit dem neuen Sudlow-Site II-Marker **100** getestet (Abbildung 84–86). Die bekannten Sudlow-Site II-Binder^[174, 194] Ketoprofen (**7**)

($K_I = 2.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$) und Naproxen (**95**) ($K_I = 0.37 \pm 3.0 \mu\text{M}$) verdrängen wie erwartet das Dimethylamino-BODIPY **100** (Abbildung 84A–B). Auch Diclofenac ist bereits bei niedrigen Konzentrationen kompetitiv zu **100** ($K_I = 4.5 \pm 1.3 \mu\text{M}$). Dieses Ergebnis wird durch kristallographische Studien^[301] an Serum-Albumin aus Pferden (Equines Serum-Albumin) unterstützt. In einem trichromatischen Wettbewerbsexperiment (siehe Abbildung 77B) zeigte sich Iphenoxinsäure (**5**) bei hohen Konzentrationen ($>50 \mu\text{M}$) kompetitiv zu dem von Chang^[181] entwickelten Sudlow-Site II-Binder 4-Propyloxy-BODIPY **23**. Eine Interpretation der Daten aus dem Wettbewerbsexperiment mit dem 4-Propyloxy-BODIPY **23** an HSA allein war jedoch nicht möglich. Die Verdrängung des Dimethylamino-BODIPYs **100** durch Iphenoxinsäure (**5**) ab einer Konzentration von ca. $25 \mu\text{M}$ ($K_I = 11.8 \pm 1.6 \mu\text{M}$) bestätigt nicht nur die Beobachtung aus dem trichromatischen Wettbewerbsexperiment, sondern weist Sudlow-Site II als sekundäre Bindestelle von Iphenoxinsäure (**5**) mit Hilfe einer spektroskopischen Methode nach. In Studien von Curry^[258] wurde diese sekundäre Bindestelle von Iphenoxinsäure (**5**) bereits postuliert. Indometacin wird in der Literatur^[10] als Sudlow-Site I-Binder beschrieben. Dennoch ist dieser Arzneistoff kompetitiv zum Dimethylamino-BODIPY **100** ($K_I = 9.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$) (Abbildung 84E). Interessanterweise ist auch in der Wettbewerbskurve mit Myristinsäuremethylester (**9**) ab einer Konzentration von ca. $12.5 \mu\text{M}$ die Verdrängung des Dimethylamino-BODIPYs **100** zu erkennen ($K_I = 12.8 \pm 1.6 \mu\text{M}$). Myristinsäure (**3**) zeigte sich ab einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ kompetitiv zu NBD- C_{12} **8**, während die Verdrängung durch den Ester **9** erst ab deutlich höheren Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) zu beobachten war (siehe Abbildung 22). Auch im Wettbewerbsexperiment mit dem spezifischen Sudlow-Site I-Marker Warfarin (**2**) ist die Verdrängung durch Myristinsäuremethylester (**9**) erst ab hohen Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) zu erkennen (Abbildung 72B). Die Verdrängung des Dimethylamino-BODIPYs **100** bereits bei niedrigen Konzentrationen zeigt somit, dass die Blockierung der Carboxylgruppe an Myristinsäure (**3**) zur Bindung in Sudlow-Site II führt.

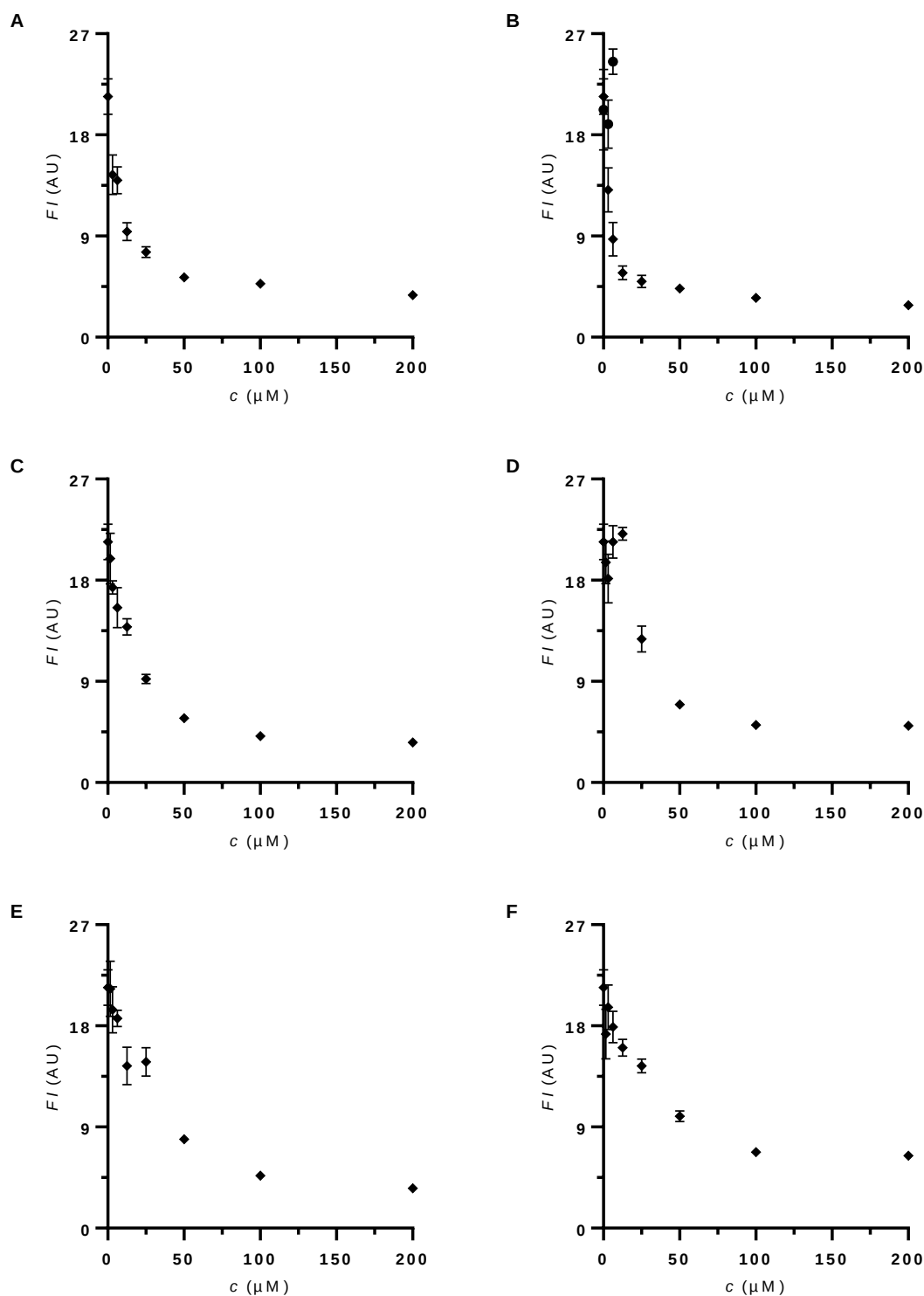


Abbildung 84: Konkurrenzexperimente von BODIPY-100/HSA (je $12.5 \mu\text{M}$) mit: A) Ketoprofen (7). B) Naproxen (95). C) Diclofenac. D) Iophenoxinsäure (5). E) Indometacin. F) Myristinsäuremethylester (9). $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$.

Interessanterweise ist Myristinsäure (**3**) ab einer Konzentration von ca. $12.5 \mu\text{M}$ kompetitiv zu dem spezifischen Sudlow-Site II-Binder **100** ($K_{\text{I}} = 6.2 \pm 1.3 \mu\text{M}$) (Abbildung 85). Bereits im trichromatischen Konkurrenzexperiment (Vergleich

Abbildung 73B) verdrängte die Fettsäure **3** das 4-Propyloxy-BODIPY **23**. Diesen Daten nach könnte Sudlow-Site II eine hochaffine Bindestelle von Myristinsäure (**3**) darstellen.

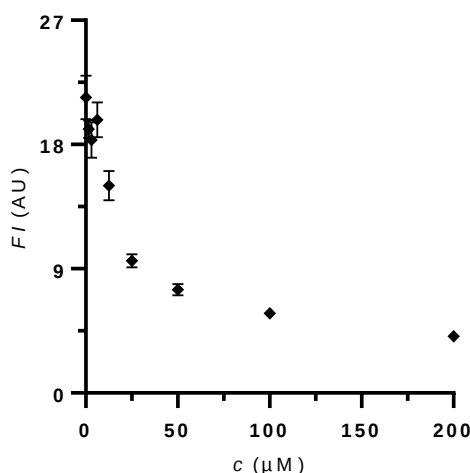
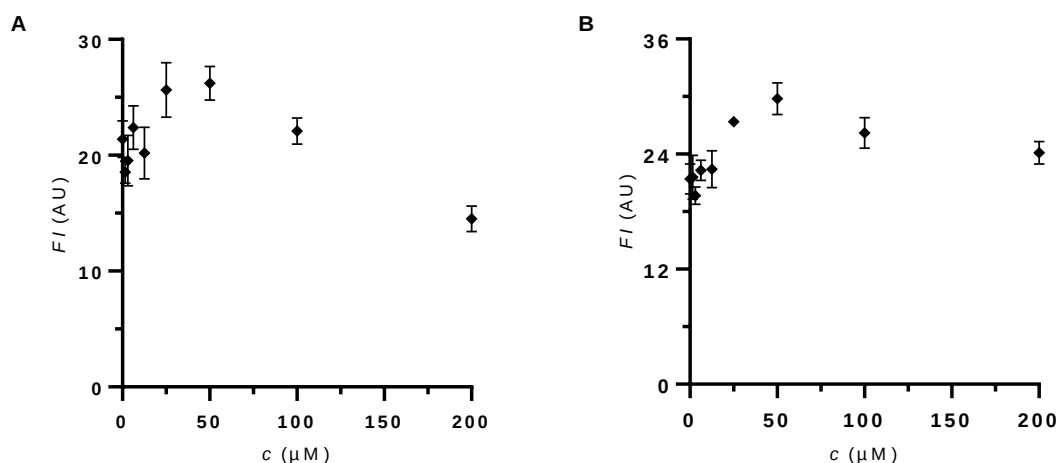


Abbildung 85: Konkurrenzexperiment von BODIPY-100/HSA (je $12.5 \mu\text{M}$) mit Myristinsäure (**3**). $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$.

Die Konkurrenzkurve mit Warfarin (**2**) zeigt wie erwartet keine Verdrängung des Sudlow-Site II-Markers **100** (Abbildung 86A). Auch Meloxicam, Celecoxib und Paracetamol sind nicht kompetitiv zum Dimethylamino-BODIPY **100** (Abbildung 86B–C). Somit binden diese drei Wirkstoffe nicht an HSA oder in einer anderen, nicht untersuchten Bindestelle. Dass die Wirkstoffbindung dieser Verbindungen zu schwach ist, um den BODIPY-Farbstoff **100** aus Sudlow-Site II zu verdrängen, ist ebenfalls möglich. Sulfasalazin (**6**) und Balsalazid (**22**) sind eindeutig nicht kompetitiv zum Sudlow-Site II-Marker **100** ebenso wie Cholesterin (Abbildung 86C–D).



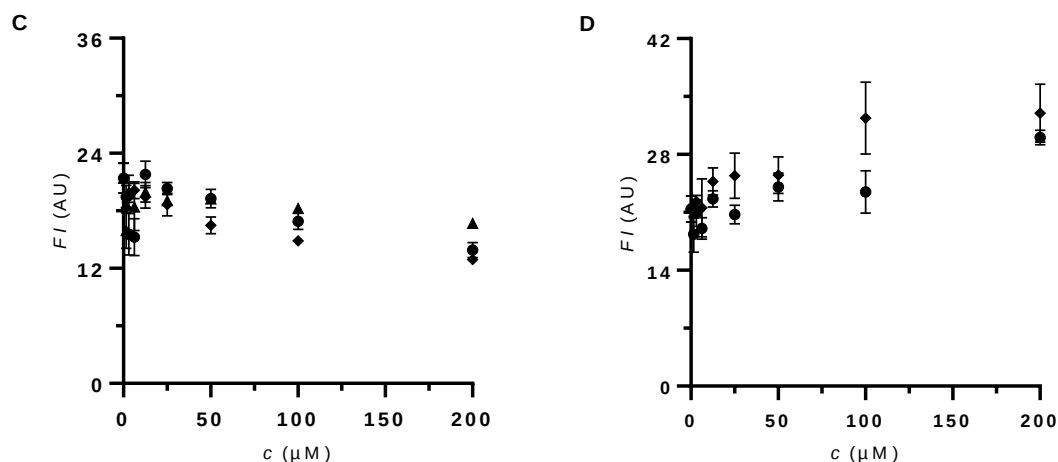
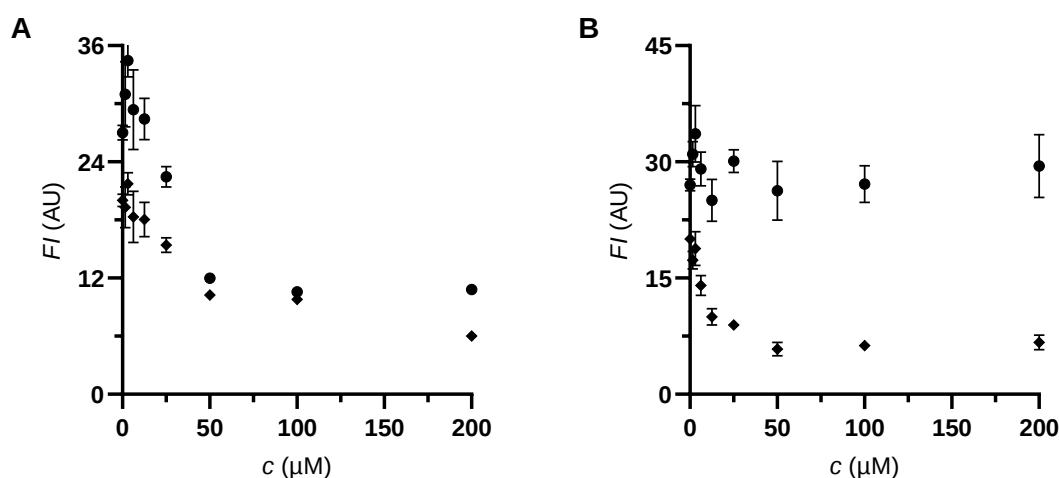


Abbildung 86: Konkurrenzexperimente von BODIPY-100/HSA (je 12.5 μM) mit: A) Warfarin (2). B) Meloxicam. C) ◆ Celecoxib, ▲ Cholesterin, ● Paracetamol. D) ◆ Sulfasalazin (6), ● Balsalazid (22). $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$.

Das Dimethylamino-BODIPY **100** erfüllt nicht nur die Voraussetzungen als spezifischer Marker für Sudlow-Site II, die Ergebnisse aus den Konkurrenzexperimenten mit bekannten HSA-Bindern stimmen auch mit der Literatur überein. Um die Eignung des BODIPY-Farbstoffes **100** als spezifischen Sudlow-Site II-Binder im bichromatischen Assay mit der NBD-markierten Fettsäure **8** zu prüfen, wurde das Fluoreszenzspektrum des BODIPY-Farbstoffes **100** bei der Anregungswellenlänge von NBD-C₁₂ **8** ($\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$) aufgenommen. Bei dieser Anregungswellenlänge wurde weder bei der Emissionswellenlänge von NBD-C₁₂ **8** ($\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$), noch im übrigen Spektralbereich oder nach Zugabe von HSA (HSA: 25 μM, BODIPY **100**: 8 μM) eine nennenswerte Fluoreszenz (Maximum: 0.24 AU) detektiert. Daher könnte der Sudlow-Site II-Binder mit der NBD-markierten Fettsäure **8** in einem Assay kombiniert werden. Um eine Fluoreszenz von NBD-C₁₂ **8** bei der Anregungswellenlänge des BODIPY-Farbstoffes **100** ($\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$) ausschließen zu können, wurde das Fluoreszenzspektrum der NBD-markierten Fettsäure **8** in Anwesenheit von HSA aufgenommen. Die Fluoreszenz von NBD-C₁₂ **8** erreicht bei der Emissionswellenlänge des BODIPYs **100** einen gemittelten Wert von ca. 0.32. Somit kann eine nennenswerte Fluoreszenz von NBD-C₁₂ **8** bei der untersuchten Anregungswellenlänge ausgeschlossen und die beiden Farbstoffe **8** und **100** kombiniert werden. Für den bichromatischen Assay wurden die gleichen Konzentrationen wie zuvor für das trichromatische Testsystem gewählt (je 8 μM Farbstoff, 25 μM HSA). Zunächst wurden Warfarin (2), Ibuprofen (4) und Myristinsäure (3) in den Konkurrenzexperimenten eingesetzt, da diese Verbindungen klassische Binder für Sudlow-Site I und II sowie die Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** darstellen. Myristinsäure (3)

verdrängt wie erwartet die NBD-markierte Fettsäure **8** ab einer Konzentration von ca. 25 μM aus der Bindestelle (Abbildung 87A). Gleichzeitig ist auch die Konkurrenz der Fettsäure **3** mit dem Dimethylamino-BODIPY **100** zu beobachten (Vergleich Abbildung 85). Auch Ibuprofen (**4**) verdrängt wie gewünscht das Sudlow-Site II Label **100** aus der Bindestelle, während die Bindung von NBD- C_{12} **8** unbeeinflusst bleibt, was anhand der fluktuierenden FI-Werte zu erkennen ist (Abbildung 87B). Warfarin (**2**) bindet zwar ebenso wie NBD- C_{12} **8** in Subdomäne IIA, die vorliegenden Daten weisen jedoch auf eine Coexistenz der beiden Verbindungen hin, da in den durchgeführten Kompetitions- und Titrationsexperimenten (Vergleich Abbildung 26, Abbildung 27) die Bindung der NBD-markierten Fettsäure **8** bisher unbeeinflusst von der Zugabe von Warfarin (**2**) blieb. Auch in dem bichromatischen Konkurrenzexperiment ist weder die Verdrängung des Dimethylamino-BODIPYs **100** noch die von NBD- C_{12} **8** zu beobachten. Stattdessen sind wie erwartet die Zunahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Konzentration an NBD- C_{12} **8** bzw. fluktuierende Werte bei Betrachtung der Fluoreszenzintensität des BODIPY-Farbstoffes **100** zu beobachten (Abbildung 87C). Dies ist bemerkenswert, da bei der Bindung eines Liganden in Sudlow-Site II eine Konformationsänderung von HSA induziert wird, die sich nach Carter^[45] auf gebundene Liganden in Sudlow-Site I auswirkt. Im bichromatischen Assay ist Sudlow-Site II durch das Dimethylamino-BODIPY **100** besetzt, dennoch scheint den Kompetitionskurven zufolge eine Coexistenz der beiden Sudlow-Site I-Binder NBD- C_{12} **8** und Warfarin (**2**) immer noch möglich zu sein. Dies ist auch ein Hinweis darauf, dass der Aufbau eines Assays mit drei verschiedenen, gleichzeitig gebundenen Liganden (Farbstoffen) realisierbar sein könnte.



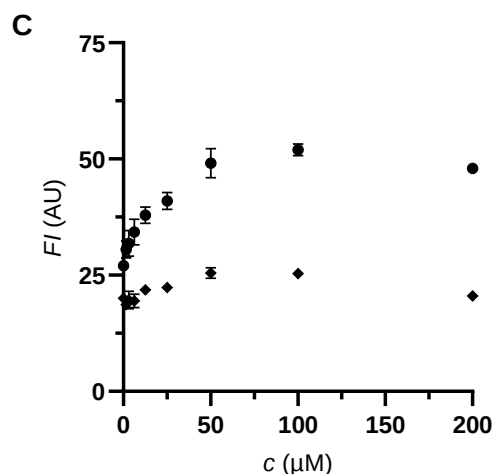


Abbildung 87: Konkurrenzexperimente von NBD-C₁₂-8/HSA (●) ($\lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$) und Dimethylamino-BODIPY-100/HSA (◆) ($\lambda_{exc} = 615 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 690 \text{ nm}$): A) Myristinsäure (3). B) Ibuprofen (4). C) Warfarin (2).

Um sicherzustellen, dass der bichromatische Assay universal anwendbar ist, wurden mit Ketoprofen (7) und Naproxen (95) zwei zusätzliche Sudlow-Site II-Binder getestet. Des Weiteren wurden Iophenoxinsäure (5) und Sulfasalazin (6) in den bichromatischen Konkurrenzexperimenten eingesetzt. Die beiden Analgetika 7 und 95 verdrängen wie gewünscht bei niedrigen Konzentrationen das Dimethylamino-BODIPY 100, während die Bindung der NBD-markierten Fettsäure 8 in einer Sub-Site von Sudlow-Site I bestehen bleibt (Abbildung 88A–B).

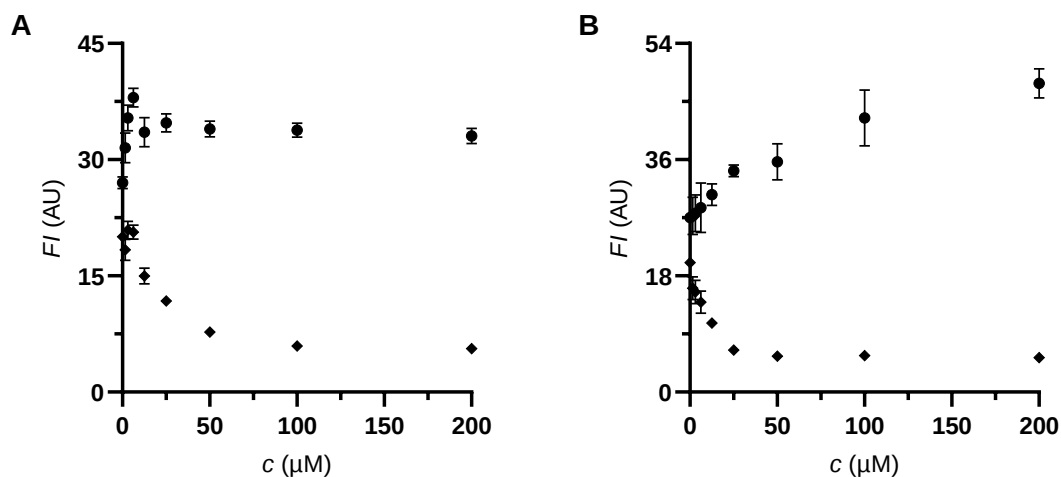


Abbildung 88: Konkurrenzexperimente von NBD-C₁₂-8/HSA (●) ($\lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$) und Dimethylamino-BODIPY-100/HSA (◆) ($\lambda_{exc} = 615 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 690 \text{ nm}$): A) Ketoprofen (7). B) Naproxen (95).

Auch Iophenoxinsäure (**5**) verdrängt NBD- C_{12} **8** nicht, allerdings ist der Wirkstoff **5** ab einer Konzentration von ca. 25 μM kompetitiv zum Sudlow-Site II-Binder **100**. Sulfasalazin (**6**) verdrängt wie zuvor im monochromatischen Konkurrenzexperiment die NBD-markierte Fettsäure **8** bei einer Konzentration von ca. größer 25 μM . Eine Konkurrenz mit dem BODIPY-Farbstoff **100** ist nicht zu beobachten (Abbildung 89B).

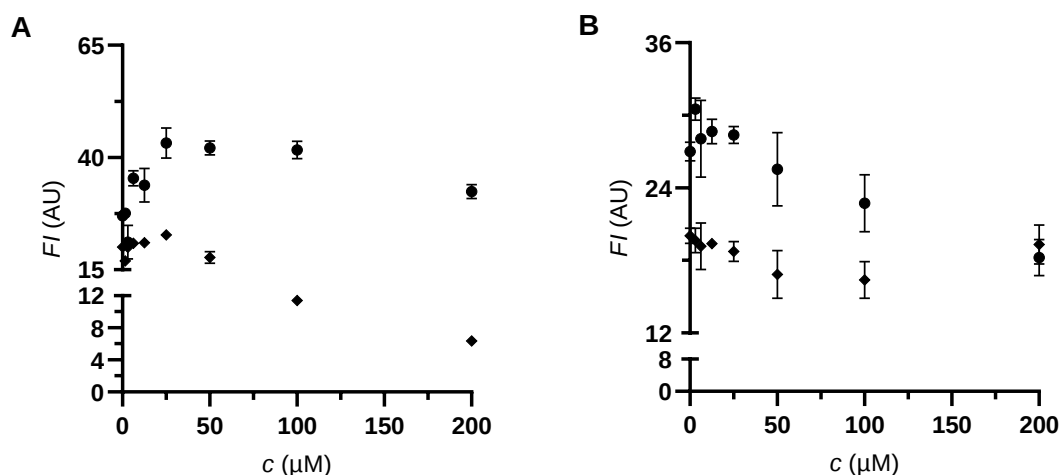


Abbildung 89: Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -**8**/HSA (●) ($\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$) und Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA (♦) ($\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$): A) Iophenoxinsäure (**5**). B) Sulfasalazin (**6**).

Die Daten aus dem bichromatischen Konkurrenzexperiment von NBD- C_{12} **8**/Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA mit Warfarin (**2**) waren nahezu gleich zu den Daten aus Konkurrenzexperimenten mit lediglich einem site-spezifischen Binder (**8** oder **100**) an HSA. Daher war es naheliegend, Warfarin (**2**) erneut als spezifischen Marker für Sudlow-Site I im trichromatischen Assay zu verwenden. Um eine Fluoreszenz von Warfarin (**2**) bei den Anregungswellenlängen der anderen beiden Farbstoffe ausschließen zu können, wurden die entsprechenden Fluoreszenzspektren mit und ohne HSA aufgenommen. Zwar wurde bei der Anregungswellenlänge von NBD- C_{12} **8** ($\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$) keine nennswerte Fluoreszenz detektiert (Maximum: 0.44 AU), die Fluoreszenz von Warfarin (**2**) bei einer Anregungswellenlänge von 615 nm ($\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$) ist jedoch deutlich zu erkennen (ohne HSA: 0.29 AU, mit HSA: 91.4 AU). Somit ist Warfarin (**2**) nicht als site-spezifischer Marker im trichromatischen Assay geeignet. In eigenen Arbeiten^[326] und Studien von Miranda^[204] wurde die NBD-markierte Gallensäure **24** (siehe Abbildung 14) erfolgreich als fluoreszenzierender Binder für Sudlow-Site I verwendet. Da im trichromatischen Assay nicht zwei identische Farbstoffe verwendet werden können, wurde nach einem neuen Farbstoff zur Markierung der Gallensäure gesucht. Ein geeigneter Farbstoff zur Fluoreszenzmarkierung eines Binders sollte klein

sein, um dessen Bindung nicht zu beeinflussen. Zusätzlich muss der Farbstoff für den geplanten Assay solvatochrome Eigenschaften besitzen und im UV-Bereich absorbieren. Dazu wurden die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Fluoreszenzfarbstoffe Marina BlueTM, Pacific BlueTM, Badan, Acrylodan, Dapoxyl[®] succinimidylester und (7-Hydroxy-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)essigsäure aufgenommen.

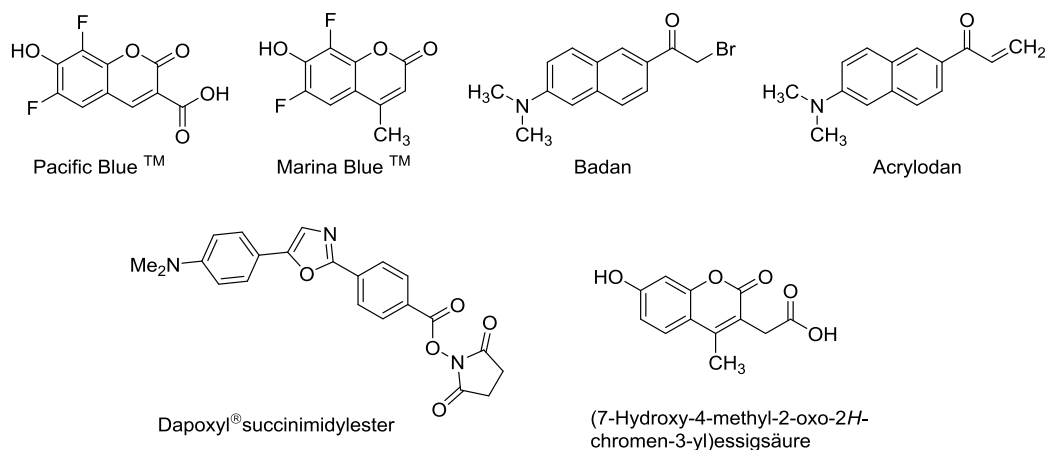


Abbildung 90: Strukturen der zu untersuchenden Fluoreszenzfarbstoffe.

Nach Zugabe von HSA wurde ein weiteres Fluoreszenzspektrum je Farbstoff aufgenommen. Bei Marina BlueTM, Pacific BlueTM und (7-Hydroxy-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)essigsäure war nach der Zugabe von HSA eine Fluoreszenzabnahme zu erkennen (Abbildung 91). Da die Zunahme der Fluoreszenz eine Voraussetzung ist, erwiesen sich diese Farbstoffe als nicht geeignet. In den Fluoreszenzspektren von Badan, Acrylodan und Dapoxyl[®] succinimidylester wurde hingegen der gewünschte Effekt beobachtet, sodass die drei Farbstoffe prinzipiell als Label für die Gallensäure in Frage kommen.

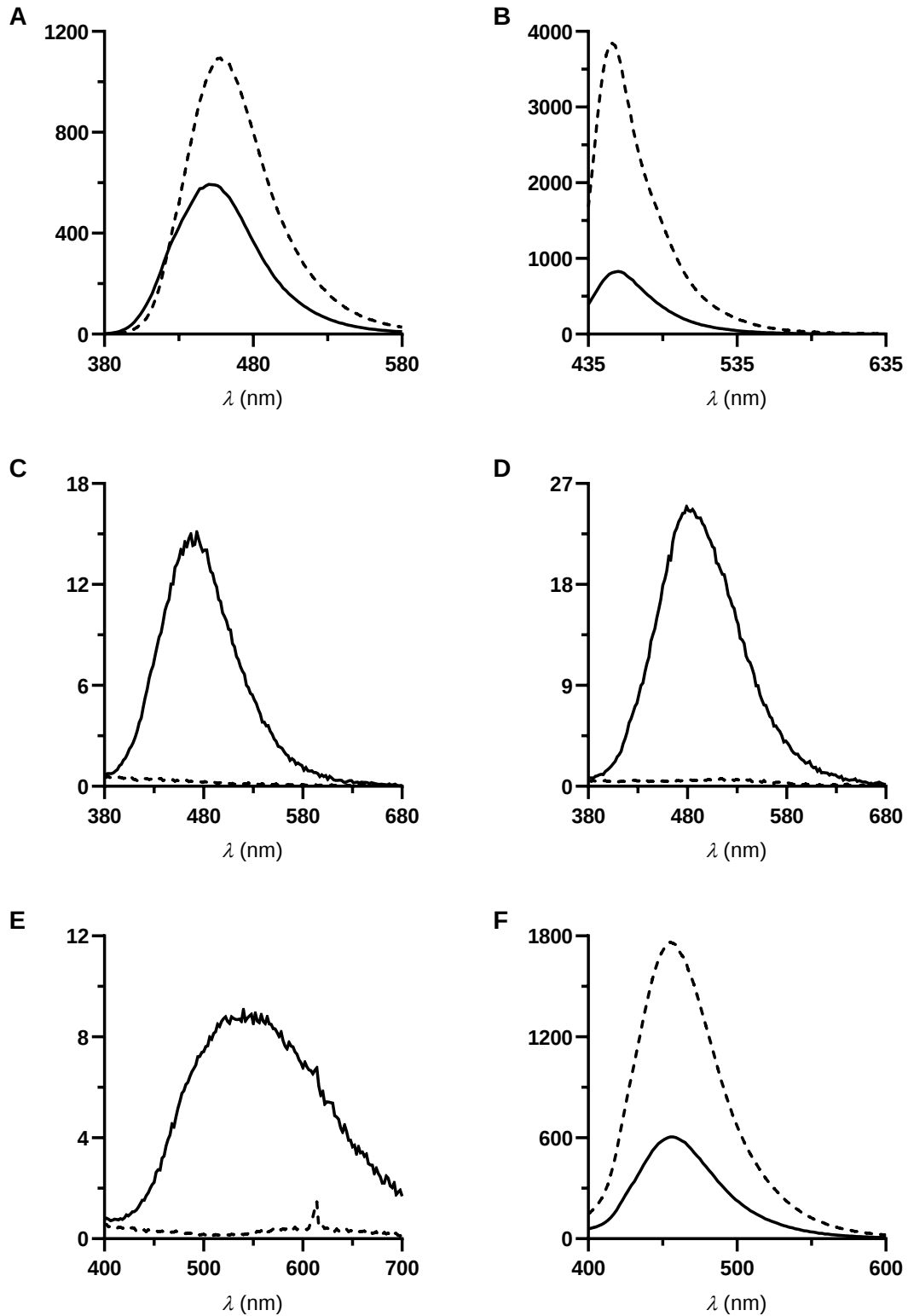


Abbildung 91: Fluoreszenzspektren ohne (gestrichelt) und mit HSA: A) Marina Blue™. B) Pacific Blue™. C) Badan. D) Acrylodan. E) Dapoxyl® succinimidylester. F) (7-Hydroxy-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure.

Da die beiden Gallensäuren **106** und **107** zur Verfügung standen, wurden ausgehend von diesen Verbindungen verschiedene Versuche zur Derivatisierung mit Badan, Acrylodan und (7-Amino-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)essigsäure (AMCA) durchgeführt. Unter den getesteten Reaktionsbedingungen konnte jedoch kein Produkt isoliert werden.

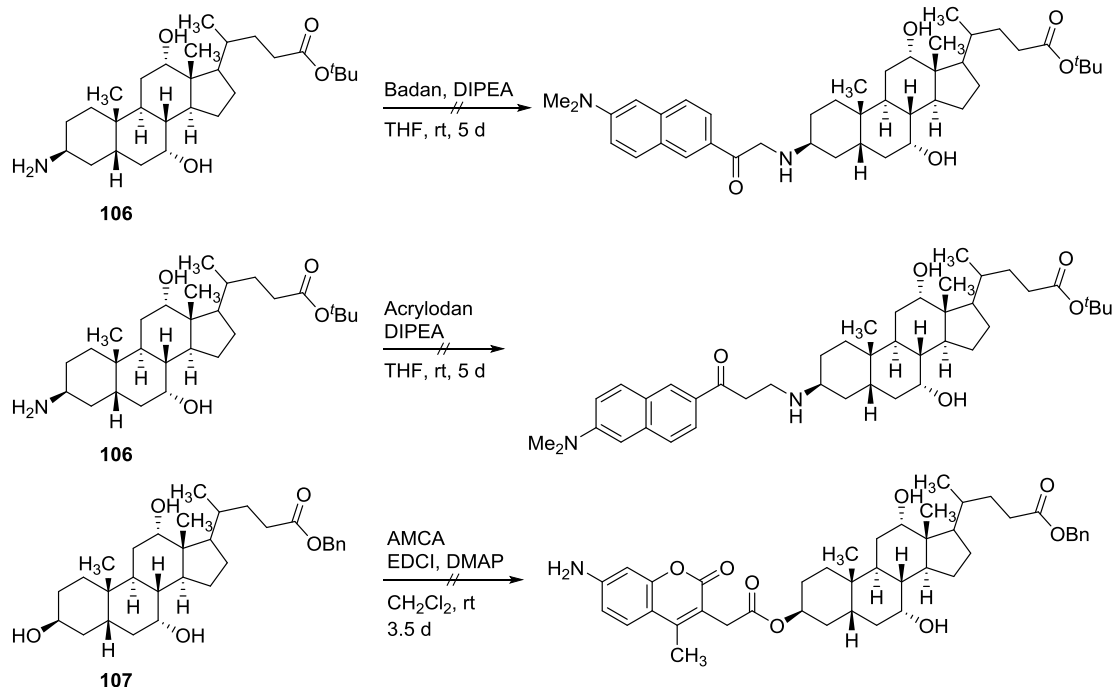


Abbildung 92: Versuche zur Derivatisierung der Gallensäuren **106** und **107** mit Badan, Acrylodan und AMCA.

Gleichzeitig wurde an der Synthese von Warfarin-Derivaten gearbeitet, die durch eine *Michael*-Addition ausgehend von 4-Hydroxycumarin und α,β -ungesättigten Ketonen zugänglich sein sollten. Aceton wurde in wässriger Natriumhydroxid-Lösung mit verschiedenen Benzaldehyden **108a–c** zu den gewünschten Produkten **109–111** in Ausbeuten von 71–83% umgesetzt (Abbildung 93).

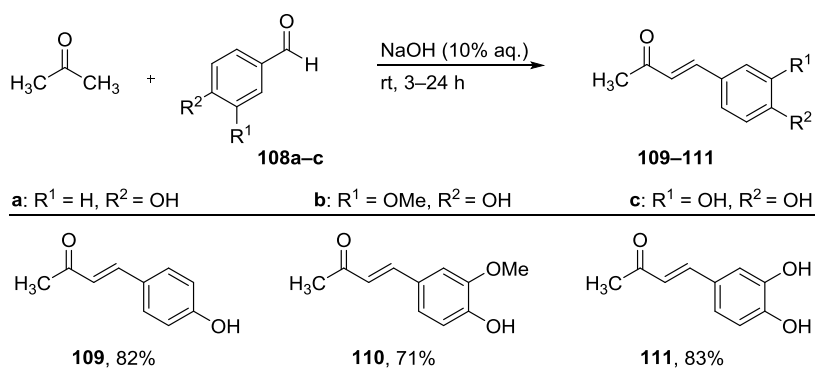


Abbildung 93: Synthese der α,β -ungesättigten Ketone **109–111**.

Die anschließende *Michael*-Addition mit 4-Hydroxycumarin wurde in 1,4-Dioxan mit katalytischen Mengen Triethylamin oder in Tetrahydrofuran mit Essigsäure und Piperidin durchgeführt. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde jedoch kein bzw. nur unvollständiger Umsatz beobachtet. In Dimethylsulfoxid konnten die Warfarin-Derivate **112–114** unter Zugabe von L-Prolin erfolgreich erhalten werden.

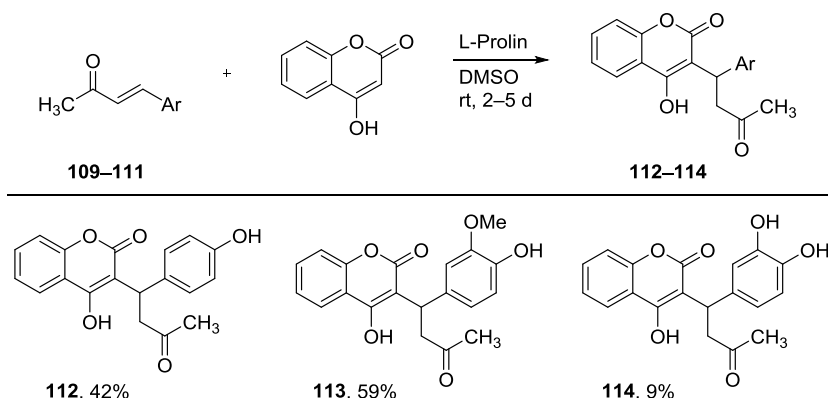


Abbildung 94: Synthese der Warfarin-Derivate **112–114**.

Da die Cumarine **112–114** leicht verfügbar waren, wurde die Synthese der fluoreszenzmarkierten Gallensäure vorerst nicht weiter verfolgt.

Um die Eignung der synthetisierten Warfarin-Derivate **112–114** als Sudlow-Site I-Marker zu prüfen, wurden die Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die spektroskopischen Daten wie Maximum der Absorptions- und Emissionswellenlänge, Stokes-Shift und molarer Extinktionskoeffizient sind in

Tabelle 6 aufgeführt.

In den Fluoreszenzspektren des 4-Hydroxy-3-methoxywarfarins **113** ist der gewünschte Fluoreszenzanstieg nach der Zugabe von HSA zu beobachten (Spektren nicht gezeigt). Mit zunehmender Konzentration an Cumarin **113** in DPBS ist der lineare Anstieg der Fluoreszenzintensität bis zu einer Konzentration von ca. 200 μM zu erkennen (Abbildung 95B). Die Titrationskurve mit HSA zeigt die Sättigung bei einer Konzentration von ca. 100 μM an. Dies entspricht einem 4-Hydroxy-3-methoxywarfarin-**113**/HSA-Verhältnis von ca. 4:1 ($K_D = 26.5 \pm 4.5 \mu\text{M}$). Der Job-Plot^[324-325] zeigt die gewünschte 1:1 Bindungsstöchiometrie im Cumarin-**113**/HSA-Komplex (Abbildung 95D).

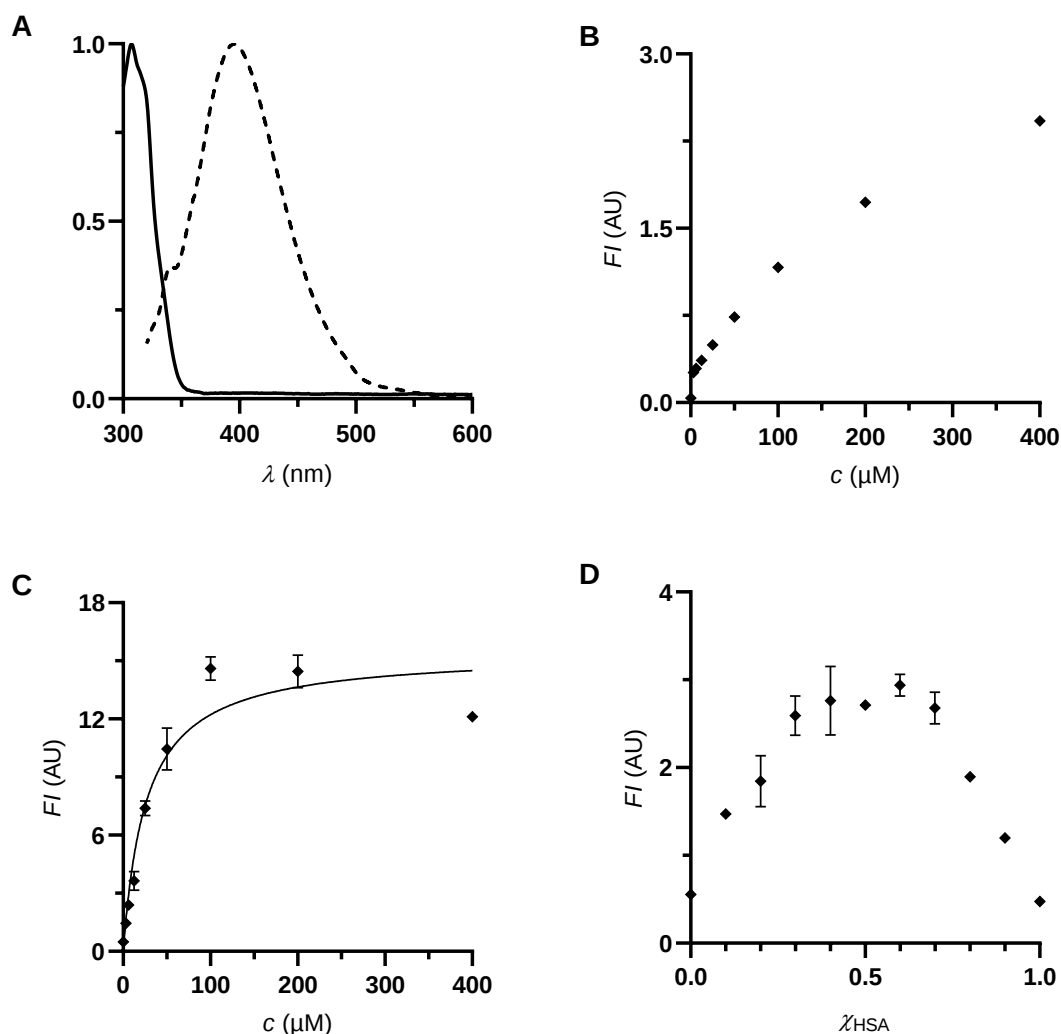


Abbildung 95: A) Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 307 \text{ nm}$, gestrichelt) von Cumarin **113** (normiert in EtOH). B) Titration von Cumarin **113** (0–400 μM) zu DPBS. $\lambda_{\text{exc}} = 326 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$. C) Titrationskurve von Cumarin **113** (0–400 μM) zu HSA (25 μM). $\lambda_{\text{exc}} = 326 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$. D) Job-Plot von Cumarin **113** im Komplex mit HSA (25 μM). $\lambda_{\text{exc}} = 326 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$.

Der Fluoreszenzanstieg nach der Zugabe von HSA ist auch für das 3,4-Dihydroxywarfarin **114** zu beobachten (Spektren nicht gezeigt). In DPBS ist bis zu einer Konzentration von ca. 200 μM ein linearer Anstieg der Fluoreszenzintensität zu erkennen (Abbildung 96B). Die Titrationskurve an HSA erreicht bei einer Konzentration von ca. 100 μM die Sättigung, die einem 3,4-Dihydroxywarfarin-**114**/HSA-Verhältnis von ca. 4:1 entspricht ($K_D = 36.3 \pm 7.2 \text{ } \mu\text{M}$). Die Bindungsstöchiometrie im Cumarin-**114**/HSA-Komplex liegt nach dem Job-Plot^[324–325] bei einem 1:1 3,4-Dihydroxywarfarin-**114**/HSA-Verhältnis (Abbildung 96D).

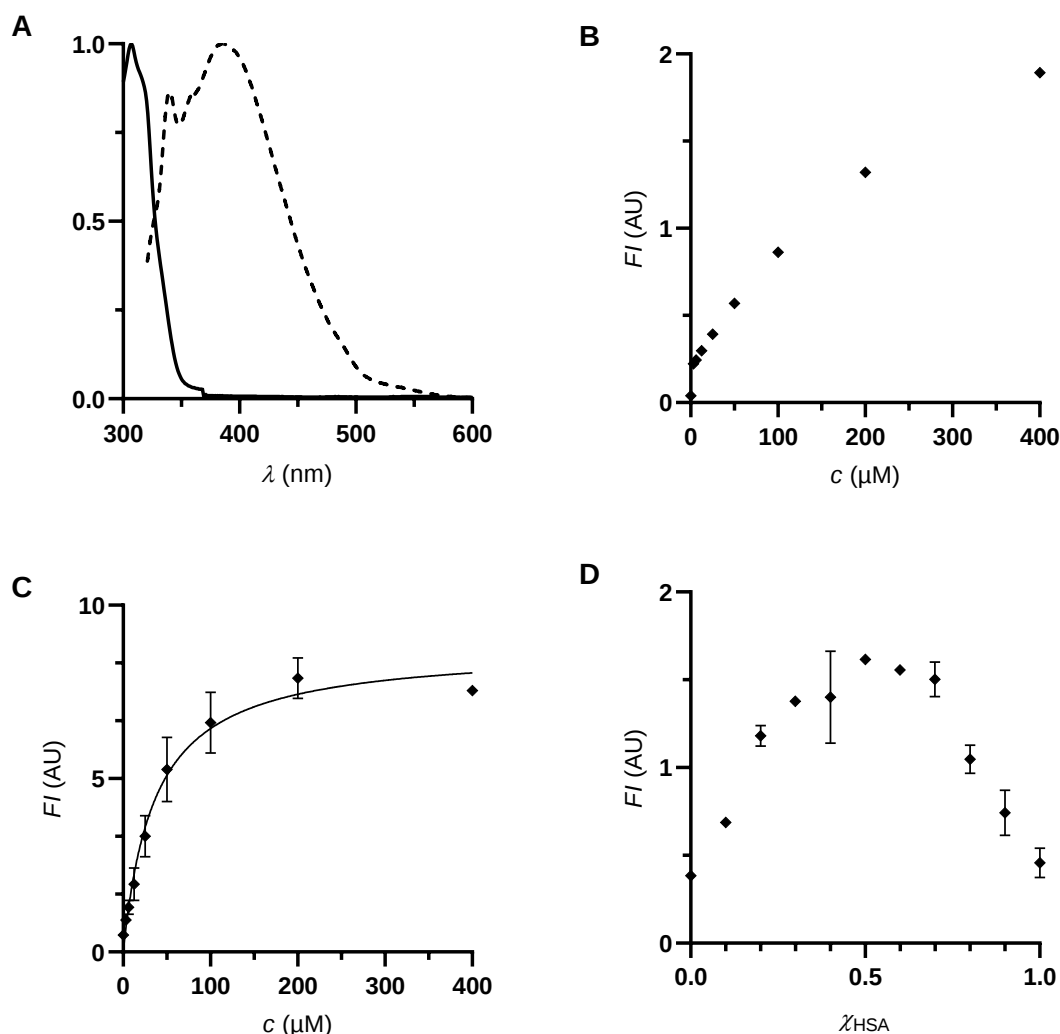


Abbildung 96: A) Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{exc} = 307$ nm, gestrichelt) von Cumarin **114** (normiert in EtOH). B) Titration von Cumarin **114** (0–400 μ M) zu DPBS. $\lambda_{exc} = 330$ nm. $\lambda_{em} = 384$ nm. C) Titrationskurve von Cumarin **114** (0–400 μ M) zu HSA (25 μ M). $\lambda_{exc} = 330$ nm. $\lambda_{em} = 384$ nm. D) Job-Plot von Cumarin **114** im Komplex mit HSA (25 μ M). $\lambda_{exc} = 330$ nm. $\lambda_{em} = 384$ nm.

Als Testverbindung für die Konkurrenzexperimente mit den Warfarin-Derivaten **112**–**114** wurde Iophenoxinsäure (**5**) gewählt, da dieser Wirkstoff 5 primär in Sudlow-Site I bindet und kompetitiv zu Warfarin (**2**) ist (siehe Abbildung 30A). In den Konkurrenzexperimenten mit Iophenoxinsäure (**5**) werden sowohl das 4-Hydroxy-3-methoxywarfarin **113** ($K_I = 18.8 \pm 1.4$ μ M) wie auch das 3,4-Dihydroxywarfarin **114** ($K_I = 18.7 \pm 1.3$ μ M) ab einer Konzentration von ca. 25 μ M aus der Bindestelle verdrängt.

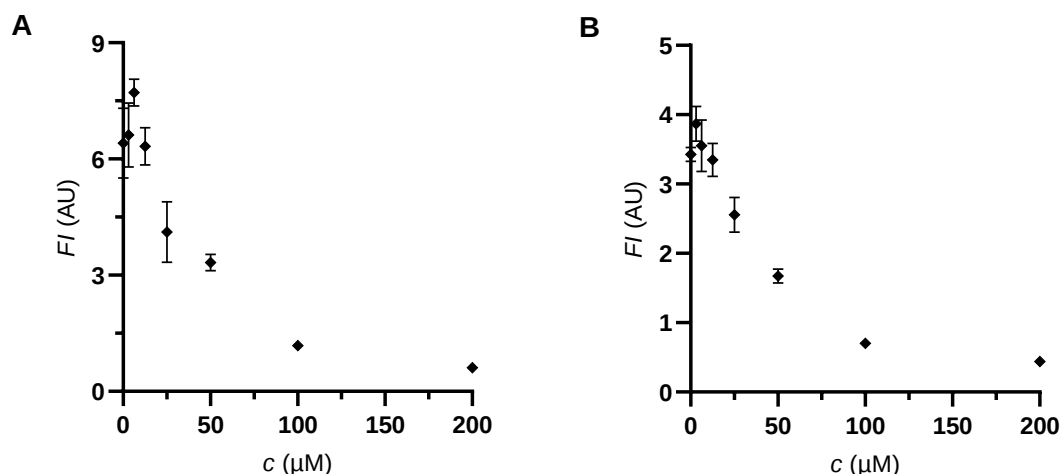


Abbildung 97: Konkurrenzexperiment mit Iphenoxinsäure (**5**) (0–200 µM) mit: A) Cumarin-**113**/HSA (je 25 µM), $\lambda_{exc} = 326$ nm, $\lambda_{em} = 380$ nm. B) Cumarin-**114**/HSA (je 25 µM), $\lambda_{exc} = 330$ nm, $\lambda_{em} = 384$ nm.

Auch das 4-Hydroxywarfarin **112** zeigt im Fluoreszenzspektrum nach der Zugabe von HSA die gewünschte Zunahme der Fluoreszenz (Spektren nicht gezeigt). Mit zunehmender Konzentration an Cumarin **112** in DPBS ist bis zu einer Konzentration von 200 µM der lineare Fluoreszenzanstieg zu erkennen (Abbildung 98B). Die Sättigungskurve an HSA zeigt initial einen linearen Anstieg und geht bei einer Konzentration von ca. 100 µM und einem 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA-Verhältnis von ca. 4:1 in die Sättigung über. Die Dissoziationskonstante wurde mit 26.5 ± 3.0 µM berechnet. Der Job-Plot^[324-325] zeigt im Cumarin-**112**/HSA-Komplex die gewünschte 1:1 Bindungsstöchiometrie (Abbildung 98D). Im Konkurrenzexperiment mit Iphenoxinsäure (**5**) ist die Verdrängung des 4-Hydroxywarfarins **112** bereits bei niedrigen Konzentrationen zu beobachten ($K_I = 12.5 \pm 1.3$ µM).

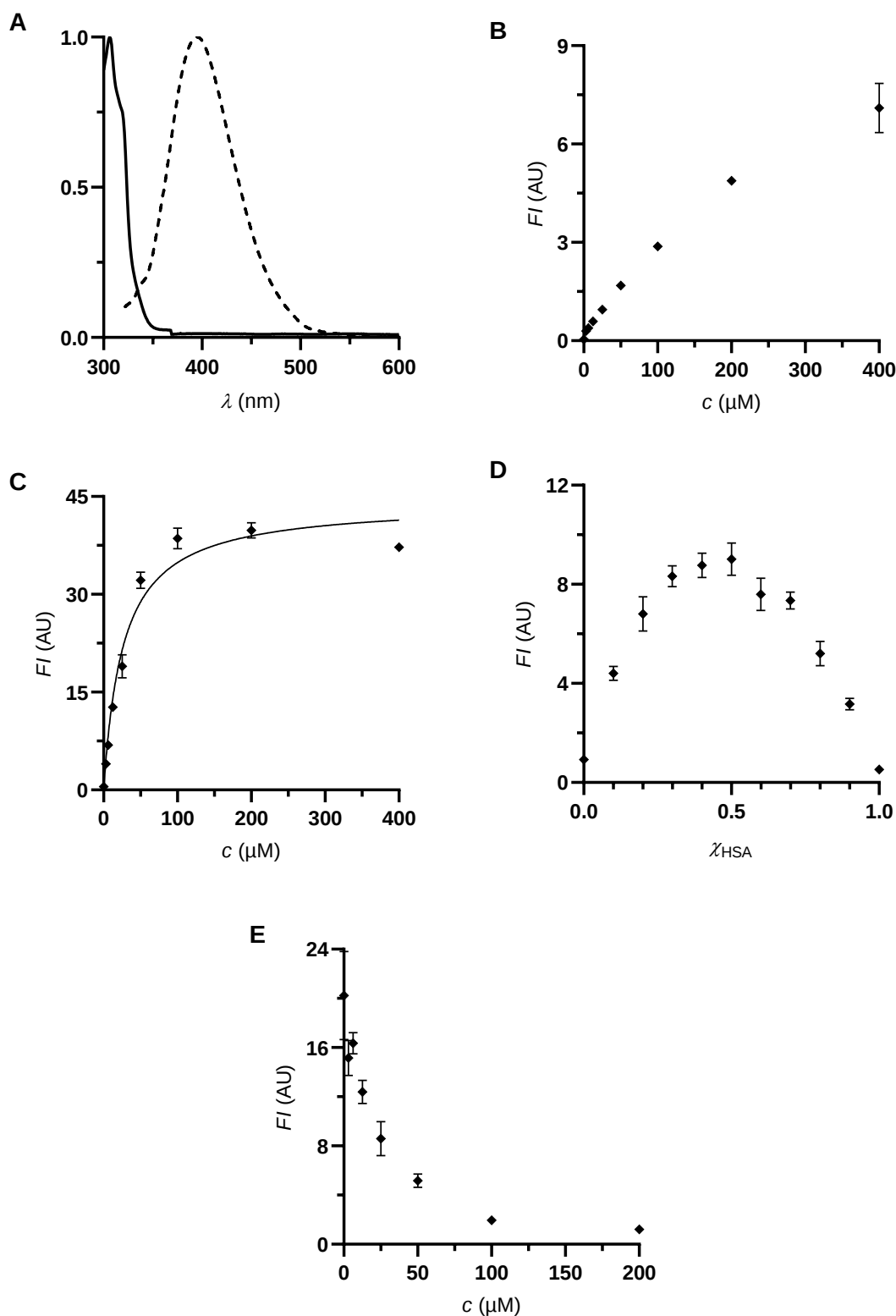


Abbildung 98: A) Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{exc} = 306$ nm, gestrichelt) von Cumarin 112 (normiert in EtOH). B) Titration von Cumarin 112 (0–400 μ M) zu DPBS. $\lambda_{exc} = 330$ nm. $\lambda_{em} = 384$ nm. C) Titrationskurve von Cumarin 112 (0–400 μ M) zu HSA (25 μ M). $\lambda_{exc} = 330$ nm. $\lambda_{em} = 384$ nm. D) Job-Plot von Cumarin 112 im Komplex mit HSA (25 μ M). $\lambda_{exc} = 330$ nm. $\lambda_{em} = 384$ nm. E) Konkurrenzexperiment von Cumarin-112/HSA (je 25 μ M) mit Iophenoxinsäure (5). $\lambda_{exc} = 330$ nm, $\lambda_{em} = 384$ nm.

Tabelle 6: Spektroskopische Daten von Warfarin (2) und Warfarin-Derivaten **112–114**.

	$\lambda_{\text{max, abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max, em}}$ (nm)	Stokes-Shift (nm)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)
Warfarin ^a (2)	308	388	80	8076
4-Hydroxywarfarin 112	306	395 ^c	89	14035
4-Hydroxy-3-methoxywarfarin 113	307	395 ^c	88	12719
3,4-Dihydroxywarfarin 114	307	385 ^c	78	13307

^a Spektren gemessen in 40 μM DPBS (0.4% EtOH). ^b Spektren gemessen in 40 μM EtOH. ^c Spektren gemessen in 1 μM EtOH.

Die synthetisierten Warfarin-Derivate **112–114** sind alle kompetitiv zu Iophenoxinsäure (5) und binden daher vermutlich wie Warfarin (2) in Sudlow-Site I. Somit erfüllen die drei Cumarine **112–114** die Voraussetzungen, um als spezifischer Sudlow-Site I-Marker in Konkurrenzexperimenten eingesetzt zu werden. Um die genaue Bindestelle zu identifizieren, wurden Cokristallisationsansätze von 4-Hydroxywarfarin **112** mit HSA unter Zugabe von Myristinsäure (3) als Stabilisator durchgeführt. Unter den genannten Bedingungen wurden jedoch keine Kristalle erhalten.

Ein Vergleich der Warfarin-Derivate **112–114** untereinander zeigt, dass das 4-Hydroxywarfarin **112** in den Experimenten mit HSA das stärkste FI-Signal liefert. Daher wurde dieses Cumarin **112** als fluoreszierender, spezifischer Marker für Sudlow-Site I in den nachfolgenden Konkurrenzexperimenten verwendet. Zur Validierung des Assays wurden Sulfasalazin (6), Balsalazid (22), Ibuprofen (4) und Cholesterin als Testsubstanzen verwendet. Diese Verbindungen wurden zuvor in eigenen Arbeiten^[326] in Konkurrenzexperimenten mit der NBD-markierten Gallensäure **24** eingesetzt und als Sudlow-Site I-Binder identifiziert. Sulfasalazin (6) und Balsalazid (22) verdrängen bereits ab niedrigen Konzentrationen das 4-Hydroxywarfarin **112** (Abbildung 99A–B). Diese beiden Arzneistoffe zeigten sich auch zur NBD-markierten Fettsäure **8** kompetitiv. Da beide Fluoreszenzmarker **8** und **112** in Subdomäne IIA binden, könnten bspw. zwei Sulfasalazin-Moleküle (6) simultan in dieser Subdomäne von HSA binden. Alternativ wäre ein Bindungsmodus denkbar, bei dem ein Molekül beide Farbstoffe aus der Bindetasche verdrängt. In der Konkurrenzkurve mit Ibuprofen (4) ist die Verdrängung ab einer Konzentration von ca. größer 25 μM zu beobachten (Abbildung 99C). Bereits im Konkurrenzexperiment mit der NBD-markierten Gallensäure **24** zeigte sich der Wirkstoff ab der gleichen Konzentration kompetitiv zum Sudlow-Site I-Marker **24**. Die

Vermutung, dass Sudlow-Site I die sekundäre Bindestelle von Ibuprofen (**4**) ist, wird durch Arbeiten von *Sjöholm*^[245] unterstützt. In *in vitro* Studien wies die Arbeitsgruppe eine Konkurrenz mit Warfarin (**2**) nach, die *in vivo* nicht beobachtet werden konnte. *Sjöholm* begründete dies mit der niedrigeren, physiologisch verabreichten Dosis, weshalb ein signifikanter, klinischer Effekt ausblieb. Meloxicam und Cholesterin sind vermutlich ab hohen Konzentrationen (>100 μM) kompetitiv zum 4-Hydroxywarfarin **112** (Abbildung 99D). Im menschlichen Körper wird Cholesterin primär von HDL und LDL transportiert,^[343] weshalb Humanalbumin als Transporter für Cholesterin eine untergeordnete Rolle spielen sollte.

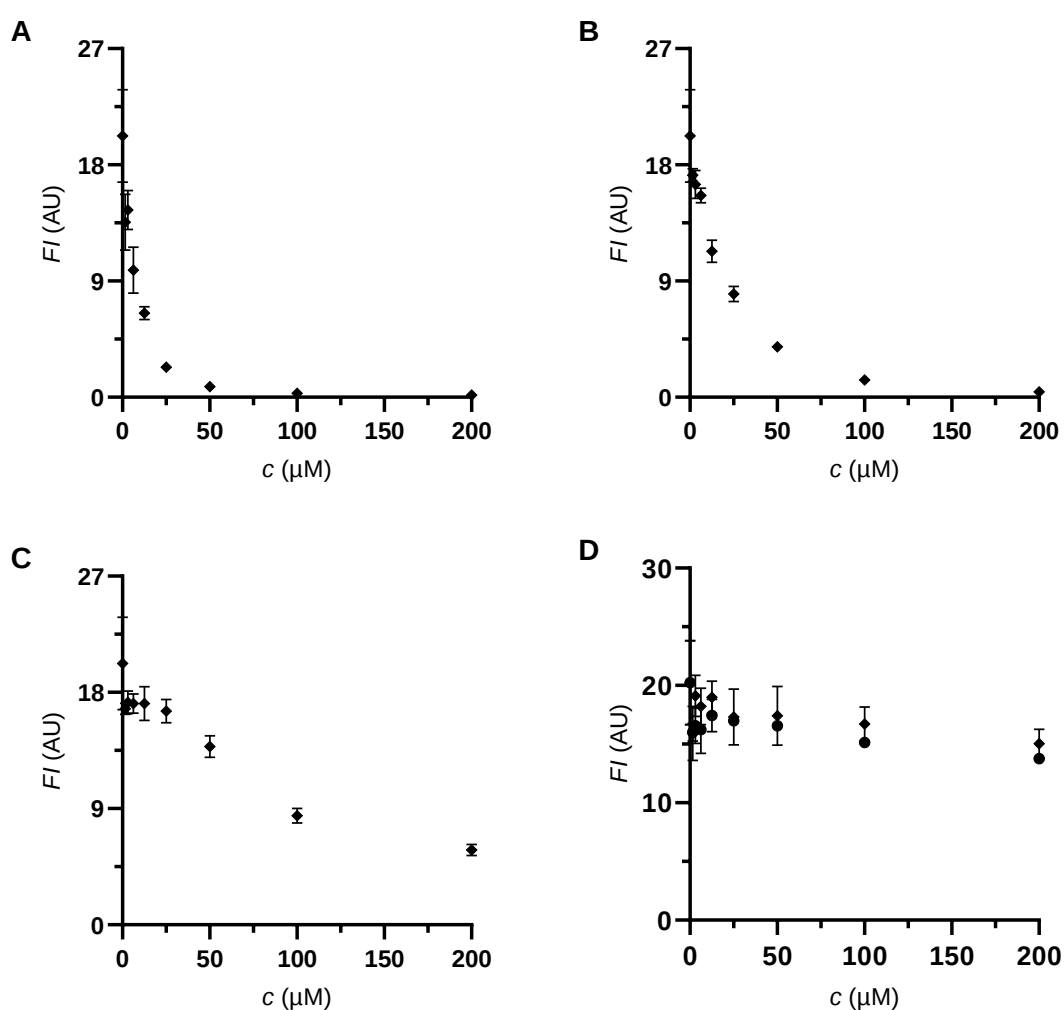


Abbildung 99: Konkurrenzexperimente von Cumarin-112/HSA (je 25 μM) mit: A) Sulfasalazin (**6**). B) Balsalazid (**22**). C) Ibuprofen (**4**). D) ● Cholesterin, ◆ Meloxicam. $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$.

Tabelle 7: Berechnete K_I -Werte und Korrelationskoeffizienten von Sulfasalazin (6), Balsalazid (22), Ibuprofen (4), Cholesterin und Meloxicam.

Verbindung	K_I (μM)	R^2
Sulfasalazin (6)	4.4 ± 1.4	0.863
Balsalazid (22)	11.8 ± 1.2	0.968
Ibuprofen (4)	143.3 ± 1.9	0.867
Cholesterin	$70434 \pm \text{n.b.}$	0.201
Meloxicam	n.b.	n.b.

n.b. nicht bestimmbar

Die Konkurrenzexperimente von 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA mit den Testverbindungen führten zu den gleichen Ergebnissen wie in Untersuchungen mit der NBD-markierten Gallensäure **24**. Daher kann das Warfarin-Derivat **112** in weiteren Konkurrenzexperimenten als spezifischer Marker für Sudlow-Site I verwendet werden. Um zu überprüfen, ob noch weitere Wirkstoffe kompetitiv zum 4-Hydroxywarfarin **112** sind, wurden diverse Verbindungen in Konkurrenzexperimenten von 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA eingesetzt (Abbildung 100–101). Im Folgenden sollten die Ergebnisse aus Konkurrenzexperimenten von NBD- C_{12} -**8**/HSA bzw. Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA bestätigt werden.

In der Konkurrenzkurve mit Diclofenac ist bereits bei niedrigen Konzentrationen die Verdrängung von 4-Hydroxywarfarin **112** zu beobachten (Abbildung 100A). Auch Indometacin ist ab niedrigen Konzentrationen kompetitiv zu dem Sudlow-Site I-Marker **112**. Diese Daten werden durch kristallographische Studien von Curry^[10] unterstützt. Allerdings wurde der Sudlow-Site II-Marker **100** ebenfalls mit hoher Affinität von Indometacin ($K_I = 9.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$) verdrängt. Eine eindeutige Bestimmung der primären Bindestelle ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich. Der bekannte Sudlow-Site II-Binder^[174, 194] Ketoprofen (**7**) verdrängt ab einer Konzentration von ca. größer $25 \mu\text{M}$ das 4-Hydroxywarfarin **112** (Abbildung 100C). Daher ist Sudlow-Site I vermutlich die sekundäre Bindestelle von Ketoprofen (**7**). Diese Vermutung wird durch Arbeiten von Guo^[344] unterstützt. Myristinsäure (**3**) ist ab einer Konzentration von ca. größer $25 \mu\text{M}$ kompetitiv zum Sudlow-Site I-Marker **112**, d.h. dass Myristinsäure (**3**) alle drei Farbstoffe **8**, **100** und **112** verdrängt, allerdings mit unterschiedlichen Affinitäten. Eine Verdrängung von Warfarin (**2**) durch Myristinsäure (**3**) wurde bereits in Arbeiten von Williams^[118] berichtet.

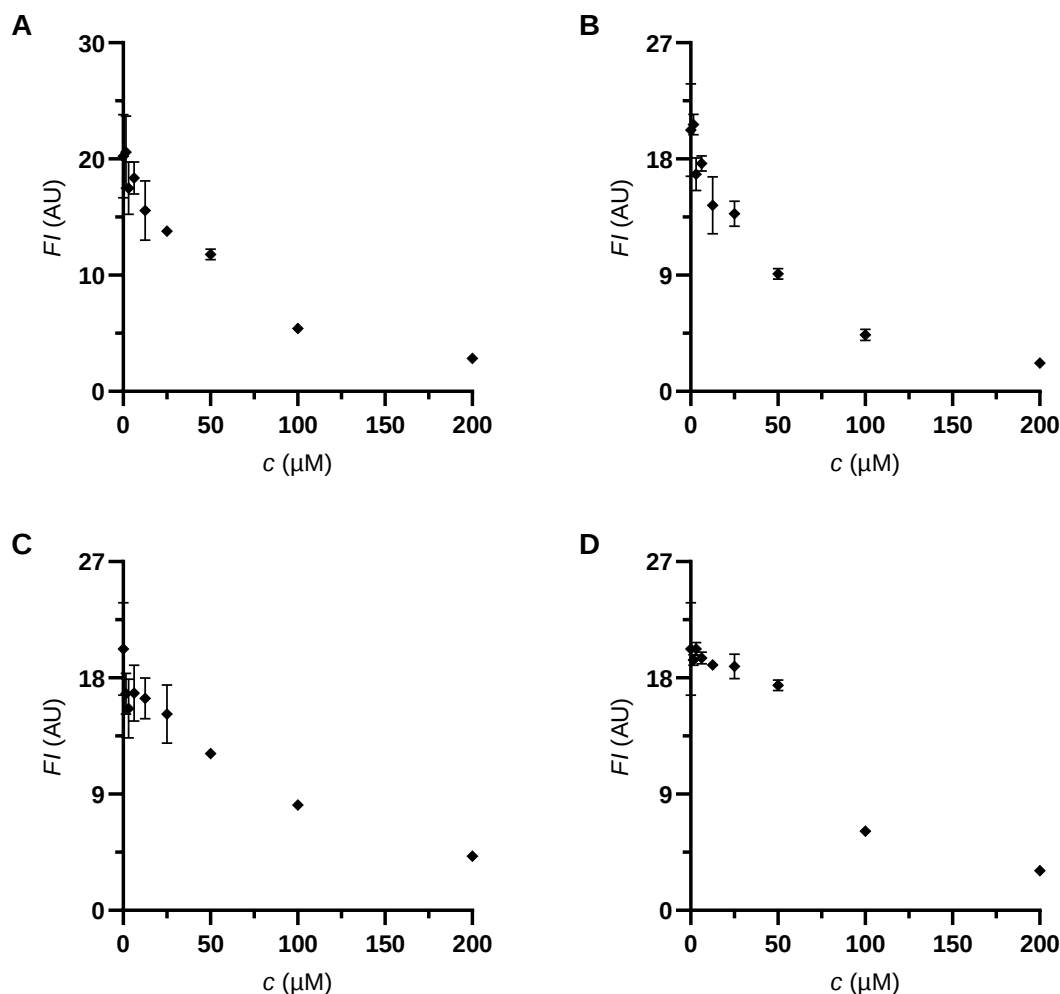


Abbildung 100: Konkurrenzexperimente von Cumarin-**112**/HSA (je 25 µM) mit: A) Diclofenac. B) Indometacin. C) Ketoprofen (**7**). D) Myristinsäure (**3**). $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$.

Tabelle 8: Berechnete K_I -Werte und Korrelationskoeffizienten von Diclofenac, Indometacin, Ketoprofen (**7**) und Myristinsäure (**3**).

Verbindung	K_I (µM)	R^2
Diclofenac	41.1 ± 1.7	0.776
Indometacin	28.4 ± 1.4	0.894
Ketoprofen (7)	137.2 ± 2.8	0.704
Myristinsäure (3)	197.4 ± 1.9	0.908

Paracetamol und Celecoxib waren weder kompetitiv zum Dimethylamino-BODIPY **100** noch zu NBD- C_{12} **8**. Auch in den Konkurrenzexperimenten mit dem 4-Hydroxywarfarin **112** ist keine Verdrängung zu beobachten (Abbildung 101B), sodass eine Bindung an HSA unklar ist. Einer Bindestudie von *Bhatia*^[345] auf Basis von FRET-Experimenten zufolge bindet Celecoxib in Sudlow-Site II. Myristinsäuremethylester (**9**), Naproxen (**95**)

und Salicylsäure (**32**), die alle in Sudlow-Site II binden, sind eindeutig nicht kompetitiv zum 4-Hydroxycumarin **112** und binden daher vermutlich spezifisch in dieser Bindestelle an HSA.

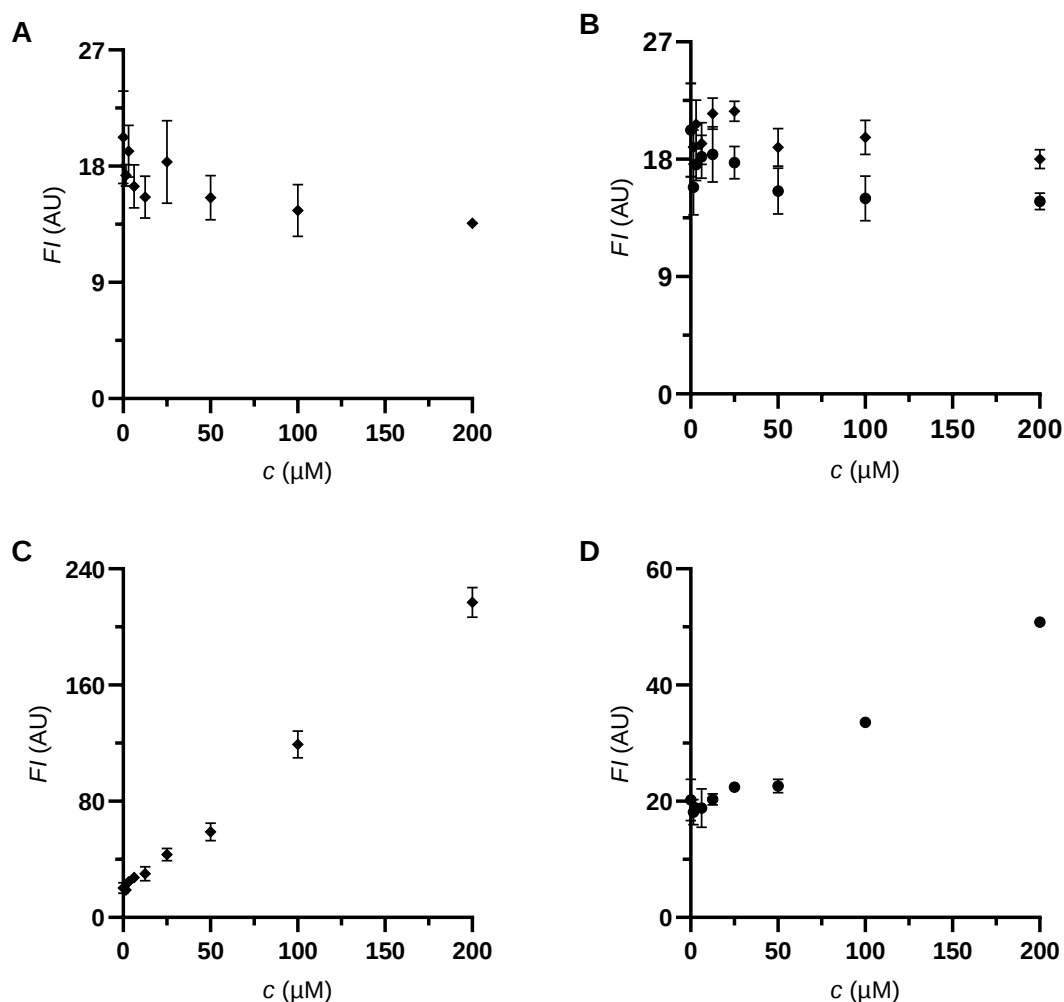


Abbildung 101: Konkurrenzexperimente von Cumarin-**112**/HSA (je 25 µM) mit: A) Myristinsäuremethylester (**9**). B) **•** Paracetamol. **♦** Celecoxib. C) Naproxen (**95**). D) Salicylsäure (**32**). $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$.

Aufgrund der Übereinstimmung der Literaturdaten mit den Ergebnissen aus den Konkurrenzexperimenten von 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA mit verschiedenen Wirkstoffen konnte der Assay validiert werden. Darüberhinaus wurden Hinweise auf sekundäre Bindestellen an HSA erhalten. Die Ergebnisse aus den Konkurrenzexperimenten von NBD-**C₁₂-8**/HSA bzw. Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA konnten bestätigt werden. Um die Eignung des 4-Hydroxywarfarins **112** als spezifischen Marker für Sudlow-Site I im bichromatischen Assay in Kombination mit der NBD-markierten Fettsäure **8** zu prüfen, wurde das Fluoreszenzspektrum des Cumarins **112** bei der Anregungswellenlänge von NBD-**C₁₂ 8** ($\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$) aufgenommen. Bei

dieser Anregungswellenlänge wurde auch nach Zugabe von HSA (HSA: 25 μM , Cumarin **112**: 8 μM) keine nennenswerte Fluoreszenz (Maximum: 0.19 AU) des 4-Hydroxywarfarins **112** detektiert. Im Fluoreszenzspektrum von NBD- C_{12} **8** ist bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm nach Zugabe von HSA (HSA: 25 μM , NBD- C_{12} **8**: 8 μM) deutlich das Fluoreszenzmaximum bei 536 nm (Fluoreszenz: 7.80 AU) zu erkennen. Bei der für den Assay verwendeten Emissionswellenlänge ($\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$) liegt der Wert bei 0.50 AU. Diesen Daten zufolge wird NBD- C_{12} **8** bei einer Wellenlänge von 330 nm angeregt, eine Fluoreszenzüberlagerung beider Farbstoffe, die zu fehlerhaften Daten in den Konkurrenzexperimenten führen würde, kann bei der verwendeten Emissionswellenlänge ausgeschlossen werden, sodass ein bichromatischer Konkurrenzassay bestehend aus NBD- C_{12} **8**, 4-Hydroxywarfarin **112** und HSA (je 8 μM Farbstoff, 25 μM HSA) getestet wurde. Als klassische Binder für die Fettsäurebindestelle sowie für Sudlow-Site I und Sudlow-Site II wurden Myristinsäure (**3**), Iophenoxinsäure (**5**) und Ibuprofen (**4**) in Konkurrenzexperimenten zur Validierung des Assays eingesetzt. Myristinsäure (**3**) verdrängt wie erwartet die NBD-markierte Fettsäure **8** ab einer Konzentration von ca. 25 μM aus der Bindestelle (Abbildung 102A). Zu 4-Hydroxycumarin-**112**/HSA ist Myristinsäure (**3**) nicht kompetitiv, obwohl dies im vorherigen, monochromatischen Konkurrenzexperiment mit niedriger Affinität beobachtet wurde (Vgl. Abbildung 100D). Die Konkurrenzkurve mit Iophenoxinsäure (**5**) zeigt bereits bei niedrigen Konzentrationen die Verdrängung des Sudlow-Site I-Markers **112** (Abbildung 102B), wohingegen deutlich keine Konkurrenz mit NBD- C_{12} **8** zu erkennen ist. Ibuprofen (**4**) ist eindeutig nicht kompetitiv zur NBD-markierten Fettsäure **8**. Bei Konzentrationen ca. größer 25 μM wird das 4-Hydroxywarfarin **112** allerdings wie erwartet aus Sudlow-Site I verdrängt (Abbildung 102C).

Die Auswahl an Testsubstanzen zur Validierung des bichromatischen Assays wurde um Cholesterin und Sulfasalazin (**6**), das sich in den monochromatischen Konkurrenzexperimenten zu beiden Farbstoffen kompetitiv erwies, erweitert. Sulfasalazin (**6**) verdrängt direkt das 4-Hydroxywarfarin **112** aus Sudlow-Site I und ist auch wie erwartet ab einer Konzentration von ca. größer 50 μM kompetitiv zur NBD-markierten Fettsäure **8** (Abbildung 103A). Die Konkurrenzkurve mit Cholesterin zeigt eindeutig keine Konkurrenz mit NBD- C_{12} **8**, wohingegen das 4-Hydroxywarfarin **112** mit niedriger Affinität ab einer Konzentration von größer 50 μM verdrängt wird (Abbildung 103B).

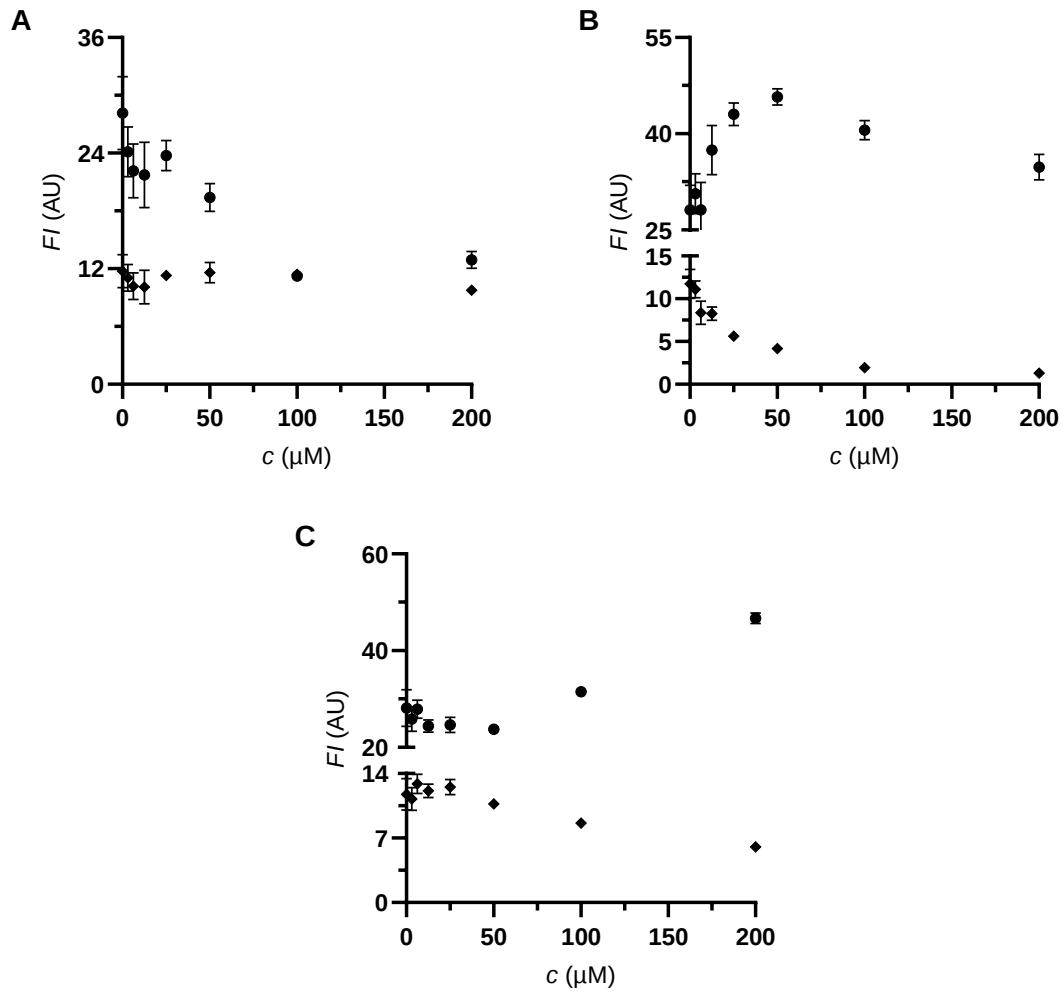


Abbildung 102: Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -8/HSA (●) ($\lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$) und Cumarin-112/HSA (◆) ($\lambda_{exc} = 308 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 373 \text{ nm}$): A) Myristinsäure (3). B) Iophenoxinsäure (5). C) Ibuprofen (4).

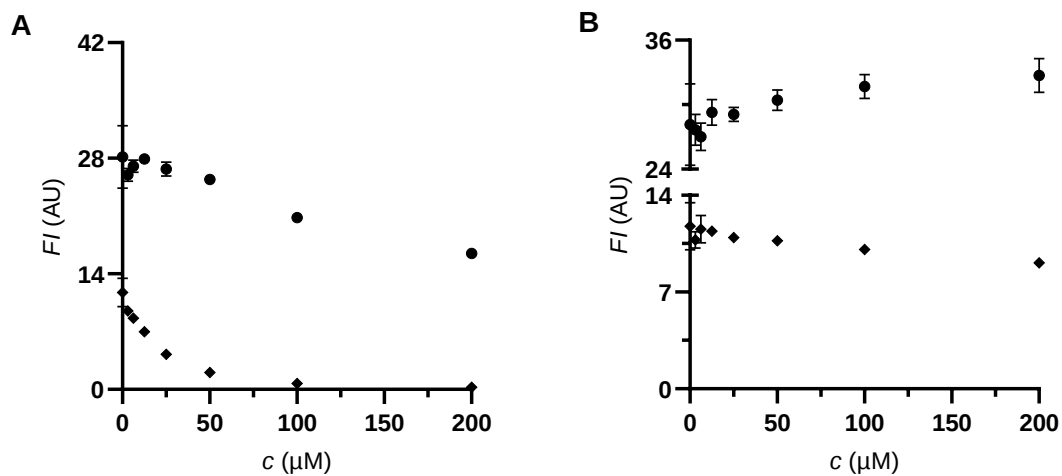


Abbildung 103: Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -8/HSA (●) ($\lambda_{exc} = 435 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$) und Cumarin-112/HSA (◆) ($\lambda_{exc} = 308 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 373 \text{ nm}$): A) Sulfasalazin (6). B) Cholesterin.

Die Ergebnisse aus den monochromatischen Konkurrenzexperimenten konnten im bichromatischen Assay reproduziert werden. Lediglich im Experiment mit Myristinsäure (**3**) war die erwartete Verdrängung des 4-Hydroxywarfarins **112** nicht zu beobachten. Um zu prüfen, ob das 4-Hydroxywarfarin **112** auch mit dem Dimethylamino-BODIPY **100** kombiniert werden kann, wurde das Fluoreszenzspektrum des Cumarins **112** bei der Anregungswellenlänge des Dimethylamino-BODIPYs **100** ($\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$) aufgenommen. Im Bereich bis 700 nm wurde nach Zugabe von HSA keine nennenswerte Fluoreszenz detektiert (Maximum: 0.69 AU). Im Fluoreszenzspektrum des Dimethylamino-BODIPYs **100** wurde bei der Anregungswellenlänge des 4-Hydroxywarfarins **112** ($\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$) ebenfalls keine nennenswerte Fluoreszenz beobachtet (Maximum: 1.88 AU). Bei der im Assay verwendeten Emissionswellenlänge ($\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$) liegt die Fluoreszenz bei einem Wert von 0.54 AU, d.h. dass eine Fluoreszenzüberlagerung zwischen dem 4-Hydroxywarfarin **112** und dem Dimethylamino-BODIPY **100** ausgeschlossen werden kann. Mögliche Interferenzen mit NBD- C_{12} **8** wurden bereits vor dem Aufbau der bichromatischen Assays mit dem jeweiligen Farbstoff **112** oder **100** ausgeschlossen. Daher sind die Voraussetzungen für einen trichromatischen Assay bestehend aus zwei spezifischen Bindern für Sudlow-Site I (4-Hydroxywarfarin **112**) und Sudlow-Site II (Dimethylamino-BODIPY **100**) sowie NBD- C_{12} **8** als Marker für die neu identifizierte Sub-Site innerhalb von Sudlow-Site I erfüllt. Um die unterschiedlichen Absorptionsbereiche der drei Farbstoffe zu verdeutlichen, wurden die Absorptionsspektren gemeinsam in Abbildung 104A dargestellt und die ausgewählten Anregungswellenlängen für den trichromatischen Assay eingezeichnet. Abbildung 104B zeigt die normierten Fluoreszenzspektren der drei Farbstoffe, um die unterschiedlichen Spektralbereiche hervorzuheben, die der einzelne Farbstoff jeweils abdeckt sowie die ausgewählten Emissionswellenlängen für den Assay. Weiterhin sind in Abbildung 104C die Fluoreszenzspektren - normiert auf die jeweilige Konzentration - gezeigt, um die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Farbstoffe zu veranschaulichen.

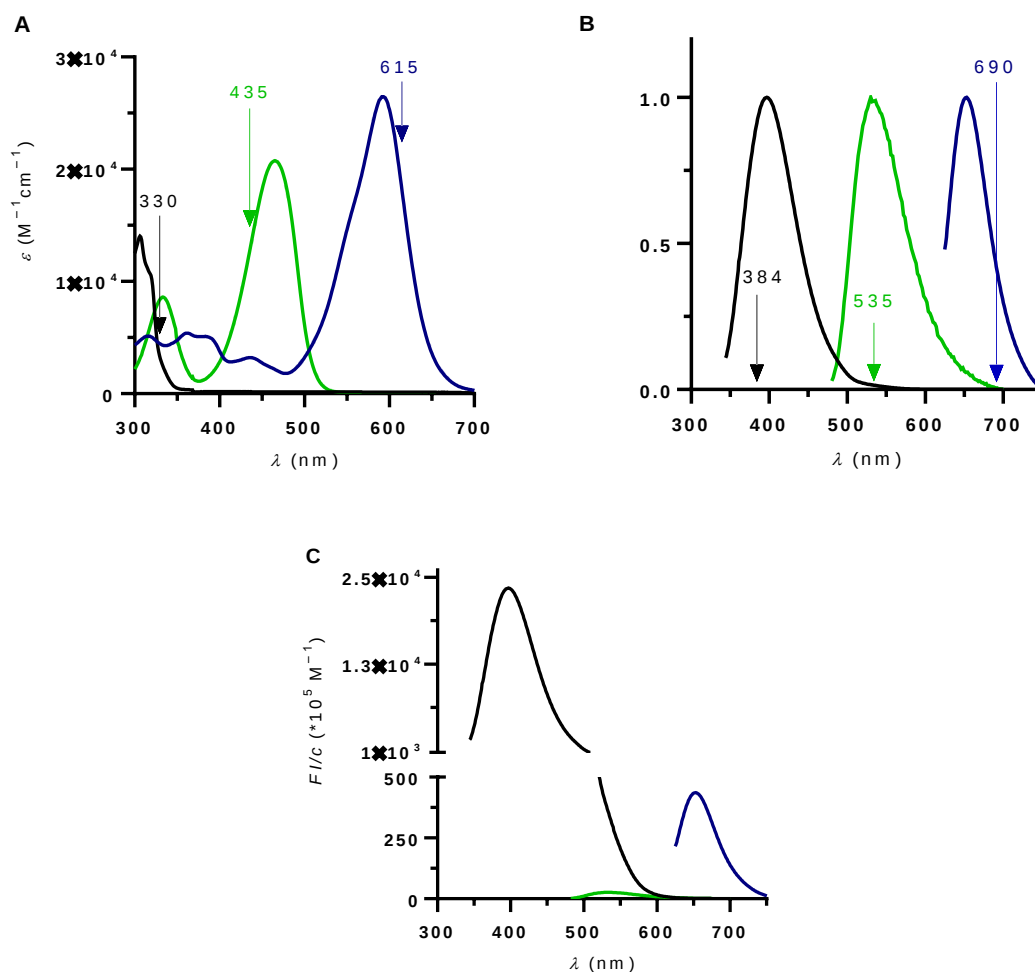


Abbildung 104: A) Absorptionsspektren von 4-Hydroxywarfarin **112** (schwarz), NBD- C_{12} **8** (grün) und Dimethylamino-BODIPY **100** (blau). Die eingezeichneten Anregungswellenlängen sind in nm angegeben. B) Fluoreszenzspektren von 4-Hydroxywarfarin **112** (schwarz, $\lambda_{exc} = 330$ nm), NBD- C_{12} **8** (grün, $\lambda_{exc} = 435$ nm) und Dimethylamino-BODIPY **100** (blau, $\lambda_{exc} = 615$ nm) (normiert in EtOH). Die eingezeichneten Emissionswellenlängen sind in nm angegeben. C) Fluoreszenzspektren von 4-Hydroxywarfarin **112** (schwarz, $\lambda_{exc} = 330$ nm), NBD- C_{12} **8** (grün, $\lambda_{exc} = 435$ nm) und Dimethylamino-BODIPY **100** (blau, $\lambda_{exc} = 615$ nm) normiert auf die Konzentration.

Die drei Farbstoffe wurden jeweils mit einer Konzentration von 8 μM mit HSA (25 μM) kombiniert, um eine maximale Empfindlichkeit zu erzielen. Zur Validierung des Assays wurden Iophenoxinsäure (**5**), Warfarin (**2**), Ibuprofen (**4**) und Myristinsäure (**3**) als bekannte Binder für je eine dieser Bindestellen eingesetzt. In Konkurrenzexperimenten von 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA und Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA zeigte sich Iophenoxinsäure (**5**) jeweils kompetitiv zu den Farbstoffen, während keine Verdrängung von NBD- C_{12} **8** beobachtet wurde. Auch im trichromatischen Konkurrenzexperiment ist keine Konkurrenz mit der NBD-markierten Fettsäure **8** zu erkennen, allerdings werden das 4-Hydroxywarfarin **112** und das Dimethylamino-BODIPY **100** bei ungefähr den gleichen Konzentrationen wie zuvor verdrängt (Abbildung 105A). Ibuprofen (**4**)

verdrängt wie erwartet das Dimethylamino-BODIPY **100** bereits bei niedrigen Konzentrationen, während 4-Hydroxywarfarin **112** im Vergleich zum monochromatischen Assay erst bei deutlich höheren Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) aus Sudlow-Site I verdrängt wird (Abbildung 105B). Die NBD-markierte Fettsäure **8** ist wie erwartet nicht kompetitiv zu Ibuprofen (**4**). In Konkurrenzexperimenten von 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA, NBD- C_{12} -**8**/HSA und Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA zeigte sich Myristinsäure (**3**) kompetitiv zu dem jeweiligen Farbstoff. Im trichromatischen Konkurrenzexperiment sind die Konkurrenz von NBD- C_{12} **8** und die des BODIPYs **100** deutlich zu erkennen (Abbildung 105C), während das 4-Hydroxywarfarin **112** im Vergleich zum monochromatischen Assay erst bei deutlich höheren Konzentrationen ($>100 \mu\text{M}$) von Myristinsäure (**3**) verdrängt wird.

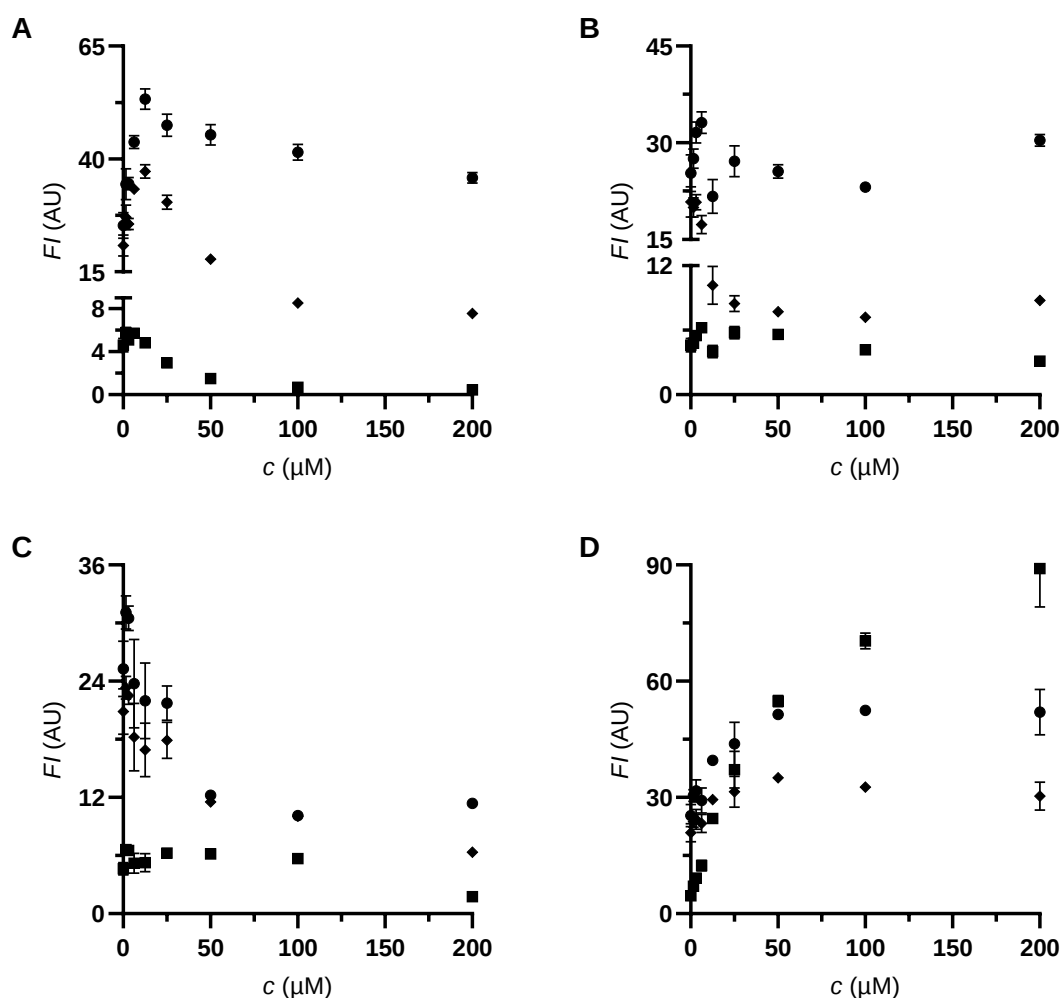


Abbildung 105: Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -**8**/4-Hydroxywarfarin-**112**/Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA. ● NBD- C_{12} **8**. ♦ 4-Hydroxycumarin **112**. ■ Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA: A) Iphenoxinsäure (**5**). B) Ibuprofen (**4**). C) Myristinsäure (**3**). D) Warfarin (**2**).

Bereits im bichromatischen Konkurrenzexperiment von NBD- C_{12} -**8**/4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA war keine Verdrängung von 4-Hydroxywarfarin **112** durch Myristinsäure (**3**) zu beobachten. Da Sudlow-Site I womöglich die tertiäre Bindestelle der Fettsäure darstellt, könnte dies an der geringen Affinität liegen. Warfarin (**2**) ist wie erwartet weder kompetitiv zum Dimethylamino-BODIPY **100** noch zur NBD-markierten Fettsäure **8**. Der deutliche Anstieg der Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 330 nm ist wahrscheinlich auf die Autofluoreszenz von Warfarin (**2**) zurückzuführen (Abbildung 105D). Ketoprofen (**7**) und Naproxen (**95**) verdrängen im trichromatischen Konkurrenzexperiment beide wie erwartet den Sudlow-Site II-Binder **100** bereits bei niedrigen Konzentrationen (Abbildung 106A–B). Das 4-Hydroxywarfarin **112** wird zusätzlich bei hohen Konzentrationen ($>100\ \mu\text{M}$) durch Ketoprofen (**7**) verdrängt, allerdings stellt dies einen deutlichen Unterschied zu den Daten ($>12.5\ \mu\text{M}$) aus dem monochromatischen Assay dar (Vgl. Abbildung 100C).

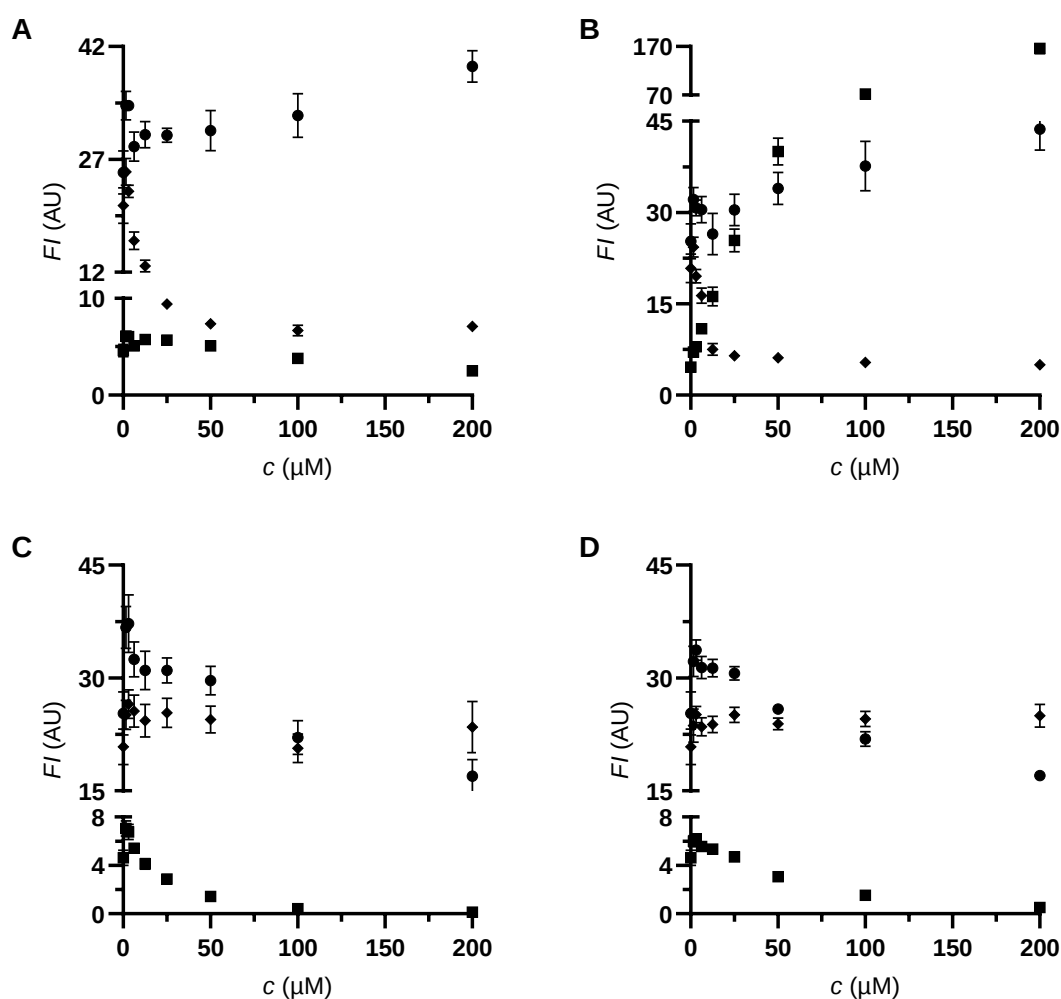


Abbildung 106: Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -**8**/4-Hydroxywarfarin-**112**/Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA. $\bullet$ NBD- C_{12} **8**. $\blacklozenge$ 4-Hydroxycumarin **112**. $\blacksquare$ Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA: A) Ketoprofen (**7**). B) Naproxen (**95**). C) Sulfasalazin (**6**). D) Balsalazid (**22**).

Die Konkurrenzkurven mit Sulfasalazin (**6**) und Balsalazid (**22**) zeigen wie erwartet die Verdrängung der NBD-markierten Fettsäure **8** und des 4-Hydroxywarfarins **112**, wobei die Konkurrenz des 4-Hydroxywarfarins **112** in beiden Fällen bei vergleichsweise höheren Konzentrationen (>12.5 – $25\ \mu\text{M}$) und mit niedrigerer Affinität als in den monochromatischen Experimenten erfolgt (Abbildung 106C–D). Das BODIPY **100** wird von beiden Wirkstoffen **6** und **22** eindeutig nicht verdrängt. In Konkurrenzsexperimenten von 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA und Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA war Diclofenac bei niedrigen Konzentrationen kompetitiv zu den Farbstoffen, eine Verdrängung von NBD- C_{12} **8** wurde nicht beobachtet. Im trichromatischen Konkurrenzsexperiment ist keine Konkurrenz von NBD- C_{12} **8** zu erkennen, allerdings werden das Dimethylamino-BODIPY **100** und das 4-Hydroxywarfarin **112** bei teilweise deutlich höheren Konzentrationen ($12.5\ \mu\text{M}$ bzw. $100\ \mu\text{M}$) als zuvor verdrängt (Abbildung 107A1–A2).

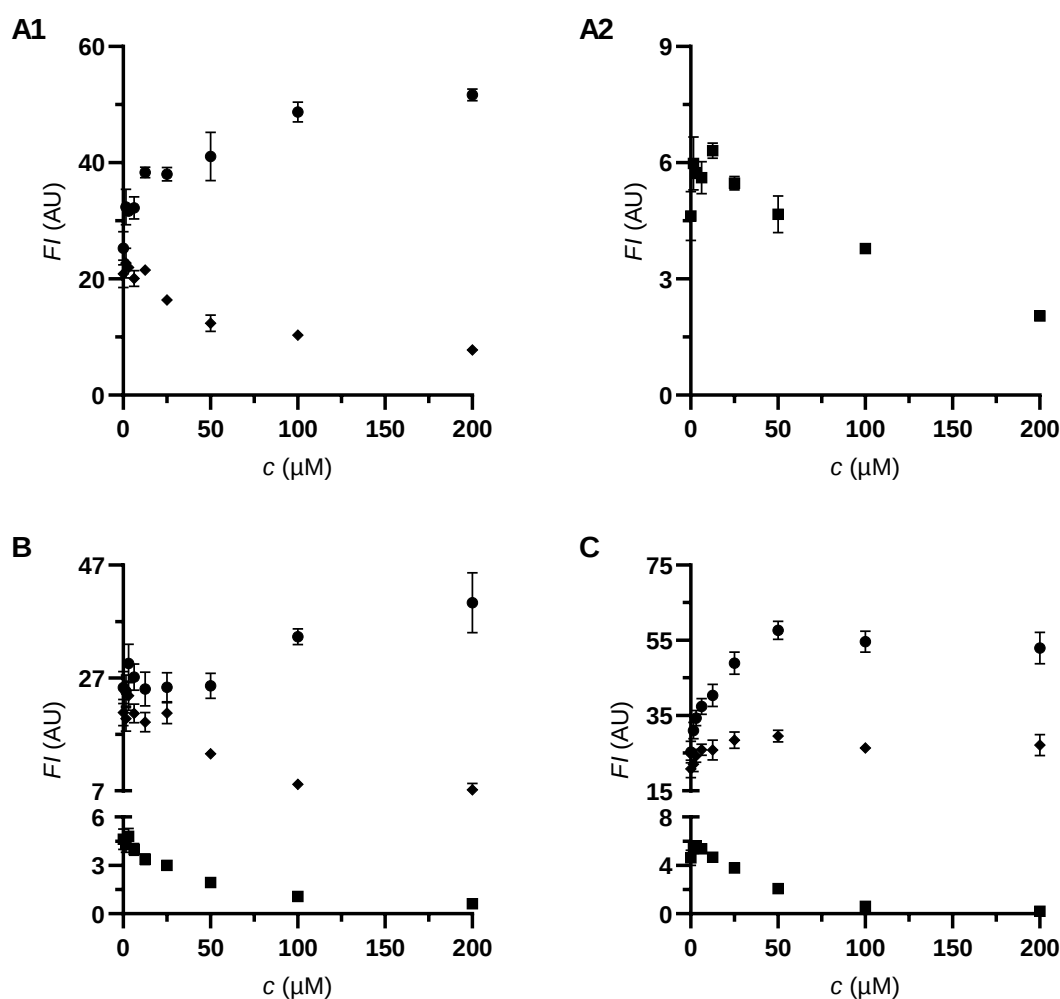


Abbildung 107: Konkurrenzsexperimente von NBD- C_{12} -**8**/4-Hydroxywarfarin-**112**/Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA. ● NBD- C_{12} **8**, ◆ 4-Hydroxycumarin **112**, ■ Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA: A1) Diclofenac (●, ◆), A2) Diclofenac (■), B) Indometacin, C) Meloxicam.

Indometacin ist wie erwartet nicht kompetitiv zur NBD-markierten Fettsäure **8** und verdrängt das Dimethylamino-BODIPY **100** bei einer niedrigen Konzentration (Abbildung 107B). Eine Kompetition mit dem 4-Hydroxywarfarin **112** ist ebenso zu erkennen, allerdings erst bei einer höheren Konzentration ($>25\ \mu\text{M}$) als im monochromatischen Assay (Vgl. Abbildung 100B). Meloxicam war im monochromatischen Kompetitionsexperiment weder kompetitiv zum Dimethylamino-BODIPY **100** noch zur NBD-markierten Fettsäure **8**. Im Kompetitionsexperiment von 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA war eine Verdrängung des Sudlow-Site I-Binders durch Meloxicam bei einer Konzentration von ca. größer $50\ \mu\text{M}$ zu beobachten. Im trichromatischen Assay konnten die Ergebnisse bestätigt werden (Abbildung 107C), wenn auch die Verdrängung des 4-Hydroxywarfarins **112** bereits bei einer Konzentration größer $25\ \mu\text{M}$ zu erkennen ist.

Paracetamol und Celecoxib sind wie erwartet zu keinem der eingesetzten Farbstoffe kompetitiv (Abbildung 108A–B). In den trichromatischen Kompetitionsexperimenten mit Cholesterin und Myristinsäuremethylester (**9**) sind ebenfalls mit allen drei Farbstoffen keine Kompetitionen zu beobachten (Abbildung 108C–D), auch wenn Cholesterin im Kompetitionsexperiment von 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA schwach kompetitiv zu sein schien. Daher könnte die fehlende Kompetition im trichromatischen Assay auf die niedrige Bindungsaffinität von Cholesterin zurückzuführen sein. Erstaunlicherweise ist aber auch keine Verdrängung des Dimethylamino-BODIPYs **100** durch Myristinsäuremethylester (**9**) zu erkennen, obwohl die Kompetition im monochromatischen Assay deutlich ab einer Konzentration von $25\ \mu\text{M}$ zu erkennen war (Vgl. Abbildung 84F). Die Ursache hierfür ist unklar.

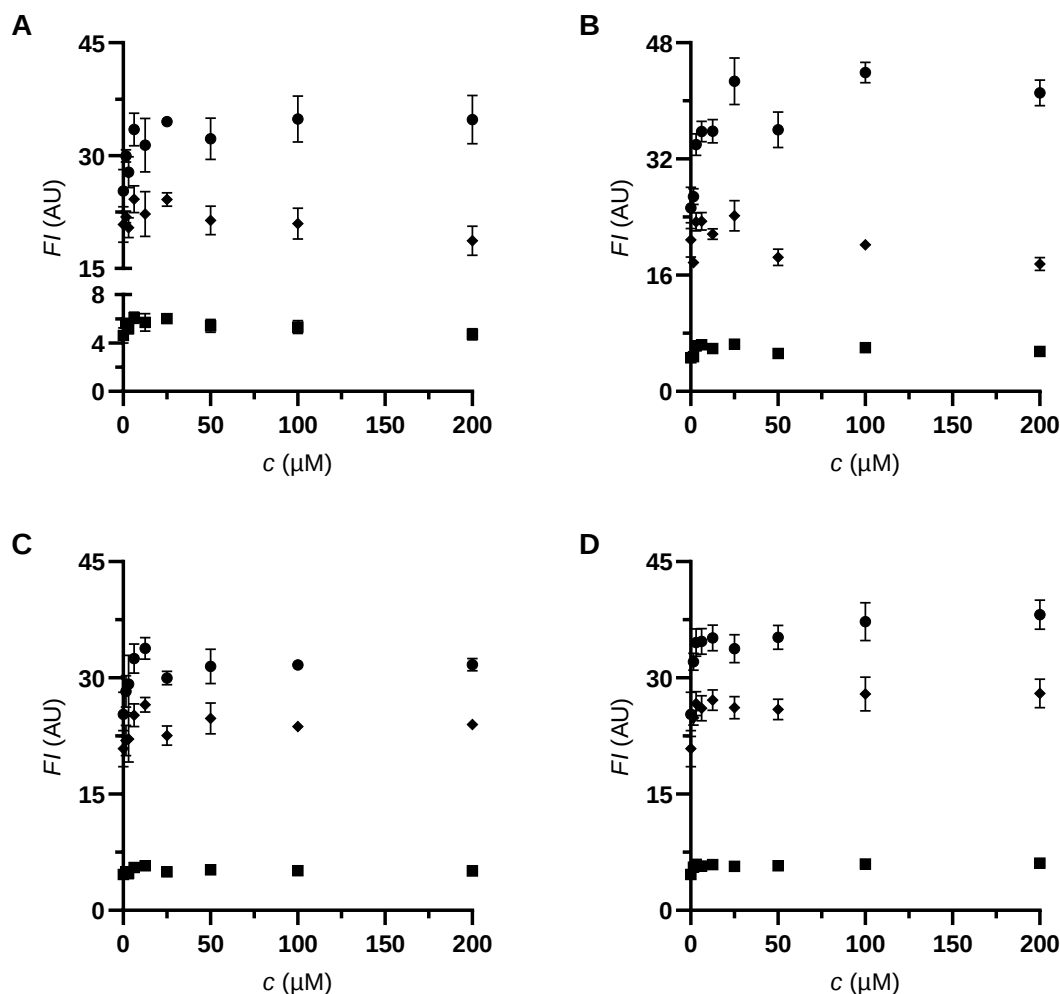


Abbildung 108: Konkurrenzexperimente von NBD-C₁₂-8/4-Hydroxywarfarin-112/Dimethylamino-BODIPY-100/HSA. • NBD-C₁₂ 8. ♦ 4-Hydroxycumarin 112. ■ Dimethylamino-BODIPY-100/HSA: A) Paracetamol. B) Celecoxib. C) Cholesterin. D) Myristinsäuremethylester (9).

Die Ergebnisse aus den monochromatischen Konkurrenzexperimenten konnten bis auf zwei Ausnahmen (Myristinsäure (3), Myristinsäuremethylester (9)) mit Hilfe des trichromatischen Assays reproduziert werden. Bei Ketoprofen (7), Naproxen (95) und Meloxicam waren die erwarteten Kompetitionen bei den gleichen Konzentrationen zu erkennen wie in den monochromatischen Konkurrenzexperimenten. Allerdings traten bei allen anderen Testverbindungen die Kompetitionen bei (deutlich) höheren Konzentrationen auf. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der neue, trichromatische Assay als Werkzeug für eine erste Einschätzung zur Bindestelle einer Verbindung dient. Zur genauen Bestimmung der Bindungsaffinität für eine spezifische Bindestelle muss der monochromatische Assay als Sekundärassay genutzt werden.

3.4 Anwendung spezifischer, fluoreszierender Binder zur Untersuchung der Albuminbindung in Sudlow-Site I und II

3.4.1 Sulfasalazin-Derivate

Die Sulfasalazin-Derivate **36**, **38**, **47**, **71**, **73–76**, **79–86** und **89** binden ersten Konkurrenzexperimenten nach in der Bindestelle der NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8** (siehe Abbildung 61–62). Um diese Daten zu bestätigen, möglicherweise sekundäre Bindestellen zu identifizieren oder eine hierarchische Besetzung zu beobachten, wurden Konkurrenzexperimente mit den neu entwickelten, spezifischen Markern für Sudlow-Site I (4-Hydroxywarfarin **112**) und Sudlow-Site II (Dimethylamino-BODIPY **100**) durchgeführt. Zusätzlich wurden Konkurrenzexperimente mit den übrigen Sulfasalazin-Derivaten **33–35**, **40**, **41**, **77** und **78** durchgeführt, um erste Hinweise auf deren primären Bindungsort zu erlangen. Die berechneten Inhibitionskonstanten und die Korrelationskoeffizienten sind jeweils unterhalb der Abbildungen aufgeführt.

Zuerst wurden Konkurrenzexperimente von Dimethylamino-BODIPY-**100**/HSA durchgeführt. In den Konkurrenzexperimenten mit den Sulfasalazin-Derivaten **33**, **38**, **41** und **82** ist deutlich zu erkennen, dass diese Verbindungen bereits bei niedrigen Konzentrationen (3.13 µM) den Sudlow-Site II-Marker **100** aus der Bindetasche verdrängen (Abbildung 109A–D). Die Konkurrenzkurve mit dem *N*-(4-Acetylphenyl) substituierten Azofarbstoff **82** (Abbildung 109D) nimmt auffällig schnell ab und bleibt dann auf einem relativ konstanten Wert. Dies spiegelt sich in der K_I (K_I = 318 pM) wieder, scheint aber eher unrealistisch zu sein. Eine Wiederholung bzw. Bestätigung dieser Daten steht noch aus.

3.4 ANWENDUNG SPEZIFISCHER, FLUORESZIERENDER BINDER ZUR UNTERSUCHUNG DER ALBUMINBINDUNG IN SUDLOW-SITE I UND II

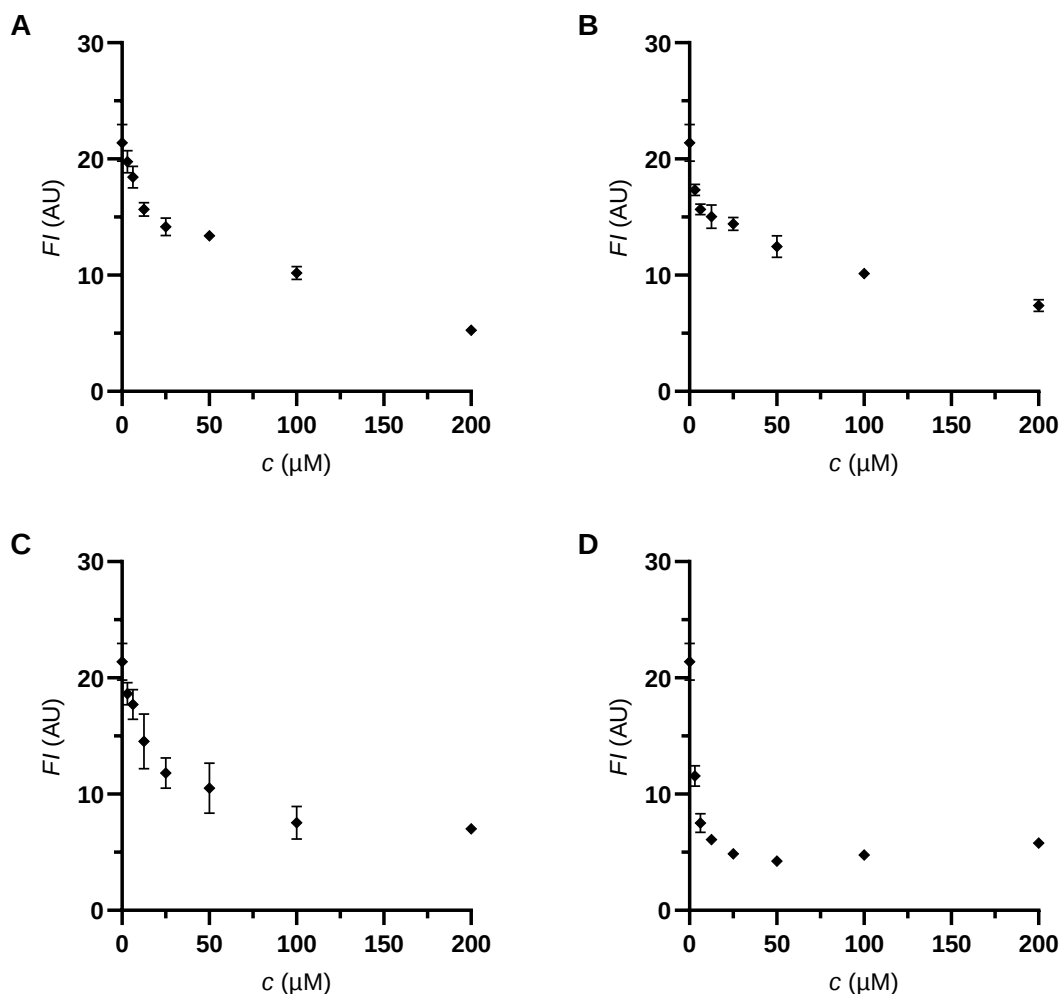


Abbildung 109: Konkurrenzexperimente von Dimethylamino-BODIPY-100/HSA (je 12.5 µM) mit: A) Salicylsäure **33**. B) veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **38**. C) chlorierter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **41**. D) N-(4-Acetylphenyl) subst. Azofarbstoff **82**. $\lambda_{exc} = 615$ nm. $\lambda_{em} = 690$ nm.

Tabelle 9: Berechnete K_I -Werte und Korrelationskoeffizienten der Azofarbstoffe **33**, **38**, **41** und **82**.

Verbindung	K_I (µM)	R^2
Salicylsäure-Derivat 33	28.5 ± 1.3	0.940
veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 38	28.1 ± 1.3	0.922
chlorierter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 41	6.0 ± 1.6	0.771
N-(4-Acetylphenyl) subst. Azofarbstoff 82	0.000318	0.715

Die Sulfasalazin-Derivate **34**, **40**, **47**, **77**, **80** und **84** sind auch kompetitiv zum Dimethylamino-BODIPY **100**, allerdings erst ab einer Konzentration von ca. größer 25 µM (Abbildung 110A–F).

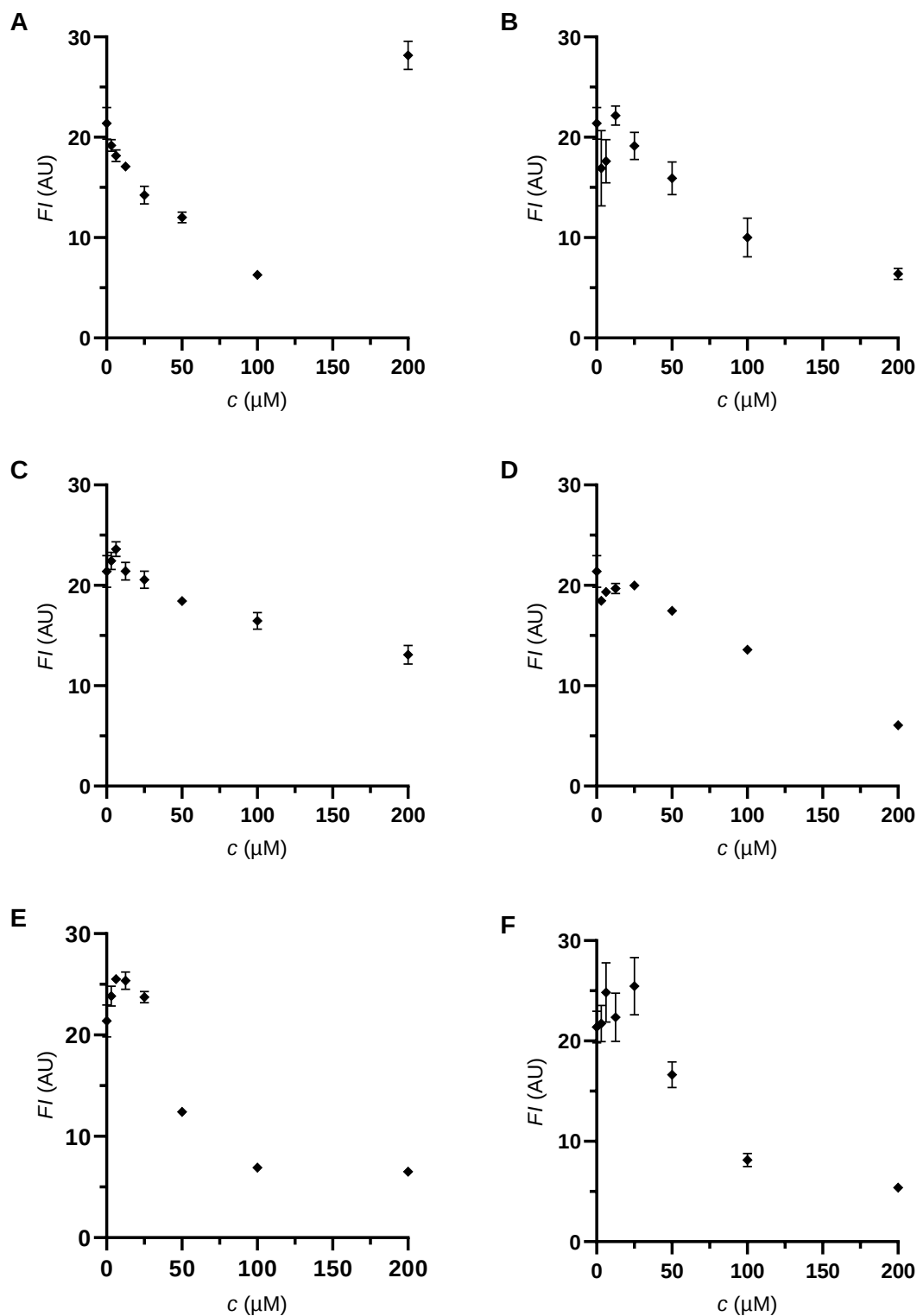


Abbildung 110: Konkurrenzexperimente von Dimethylamino-BODIPY-100/HSA (je 12.5 μM) mit: A) Salicylsäuremethylester 34. B) chlorierter, veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 40. C) Benzolsulfonsäureamid 47. D) N-Phenyl subst. Azofarbstoff 77. E) N-(3-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 80. F) N-(4-Nitronaphth-1-yl) subst. Azofarbstoff 84. $\lambda_{exc} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{em} = 690 \text{ nm}$.

3.4 ANWENDUNG SPEZIFISCHER, FLUORESZIERENDER BINDER ZUR UNTERSUCHUNG DER ALBUMINBINDUNG IN SUDLOW-SITE I UND II

Der Anstieg der Fluoreszenzintensität in der Kompetitionskurve mit dem Salicylsäuremethylester **34** (Abbildung 110A) ab hohen Konzentrationen ($>100\ \mu\text{M}$) könnte auf die Bindung in einer anderen Bindestelle zurückzuführen sein. Möglich wären aber auch fluktuierende FI-Werte über den ganzen Konzentrationsbereich, die zufällig eine leicht abnehmende Tendenz bei niedrigen Konzentrationen zeigen. Im Kontrollexperiment war ein ähnlicher Kurvenverlauf zu beobachten, weshalb die Interpretation dieser Daten schwierig bleibt und zu keinem eindeutigen Ergebnis führt.

Tabelle 10: Berechnete K_I -Werte und Korrelationskoeffizienten der Azofarbstoffe **34**, **40**, **47**, **77**, **80** und **84**.

Verbindung	$K_I\ (\mu\text{M})$	R^2
Salicylsäuremethylester-Derivat 34	$(41.8^a \pm 1.3)$	0.944
chlorierter, veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 40	55.0 ± 2.1	0.693
Benzolsulfonsäureamid-Derivat 47	63.0 ± 1.4	0.920
N-Phenyl subst. Azofarbstoff 77	116.1 ± 1.4	0.956
N-(3-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 80	9.0 ± 1.6	0.775
N-(4-Nitronaphth-1-yl) subst. Azofarbstoff 84	28.8 ± 1.6	0.785

^a Die Berechnung erfolgte unter Ausschluss der FI bei $200\ \mu\text{M}$.

In den Kompetitionskurven der Sulfasalazin-Derivate **35**, **73**, **76**, **78**, **79** und **89** sind bis zu einer Konzentration von ca. $50\ \mu\text{M}$ (Abbildung 111A–C) bzw. $100\ \mu\text{M}$ (Abbildung 111D–F) keine Kompetitionen zu beobachten. Daher binden diese Substanzen primär in einer anderen Bindestelle von HSA und weichen erst ab hohen Konzentrationen auf Sudlow-Site II als sekundäre Bindestelle aus. Die berechnete K_I (Annahme für den Fit: one site – specific binding) des N-Benzyl substituierten Azofarbstoffes **78** ($K_I = 46.1 \pm 1.8\ \mu\text{M}$) ist unter Berücksichtigung des Kurvenverlaufes (Abbildung 111B) mit Vorsicht zu betrachten.

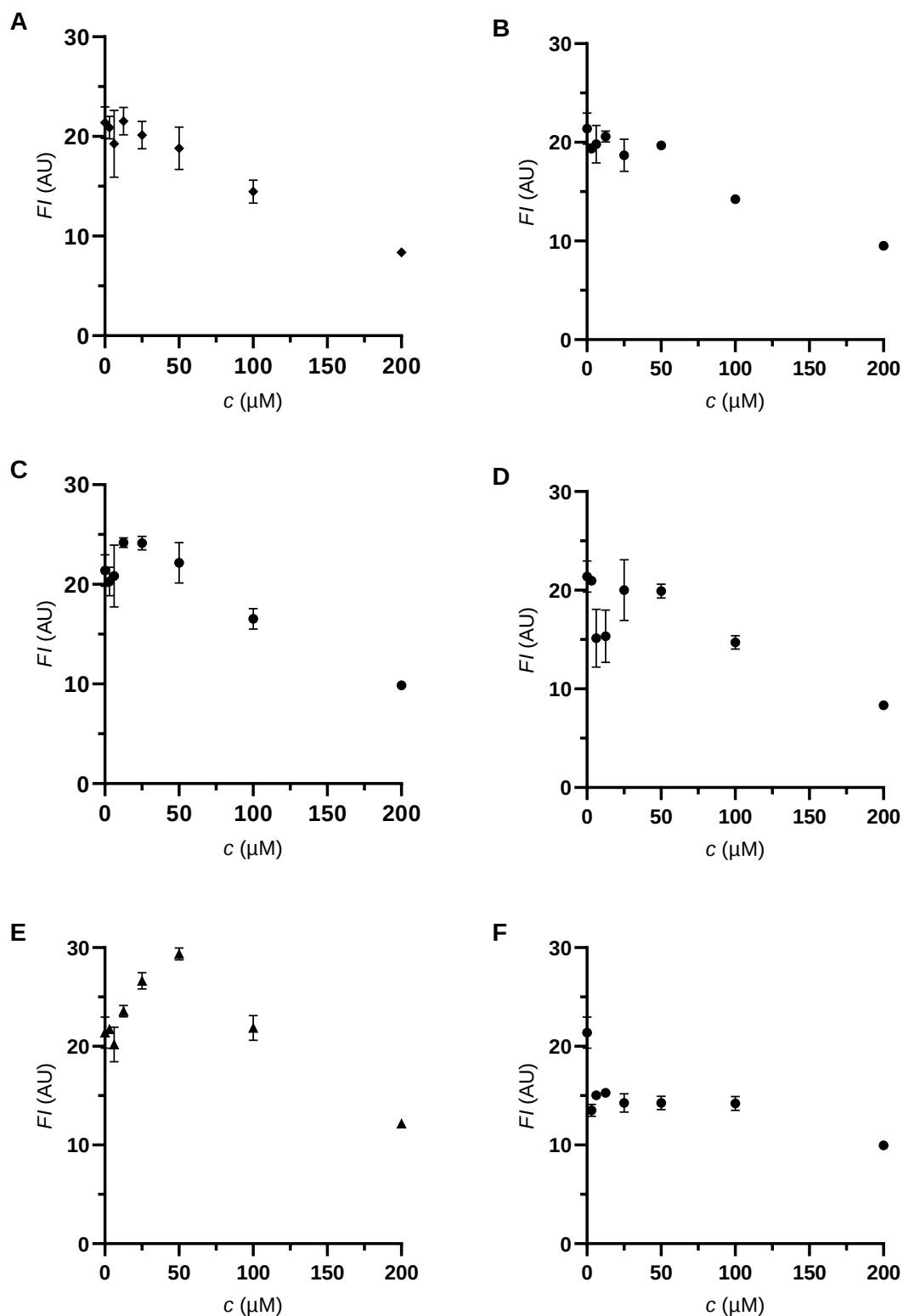


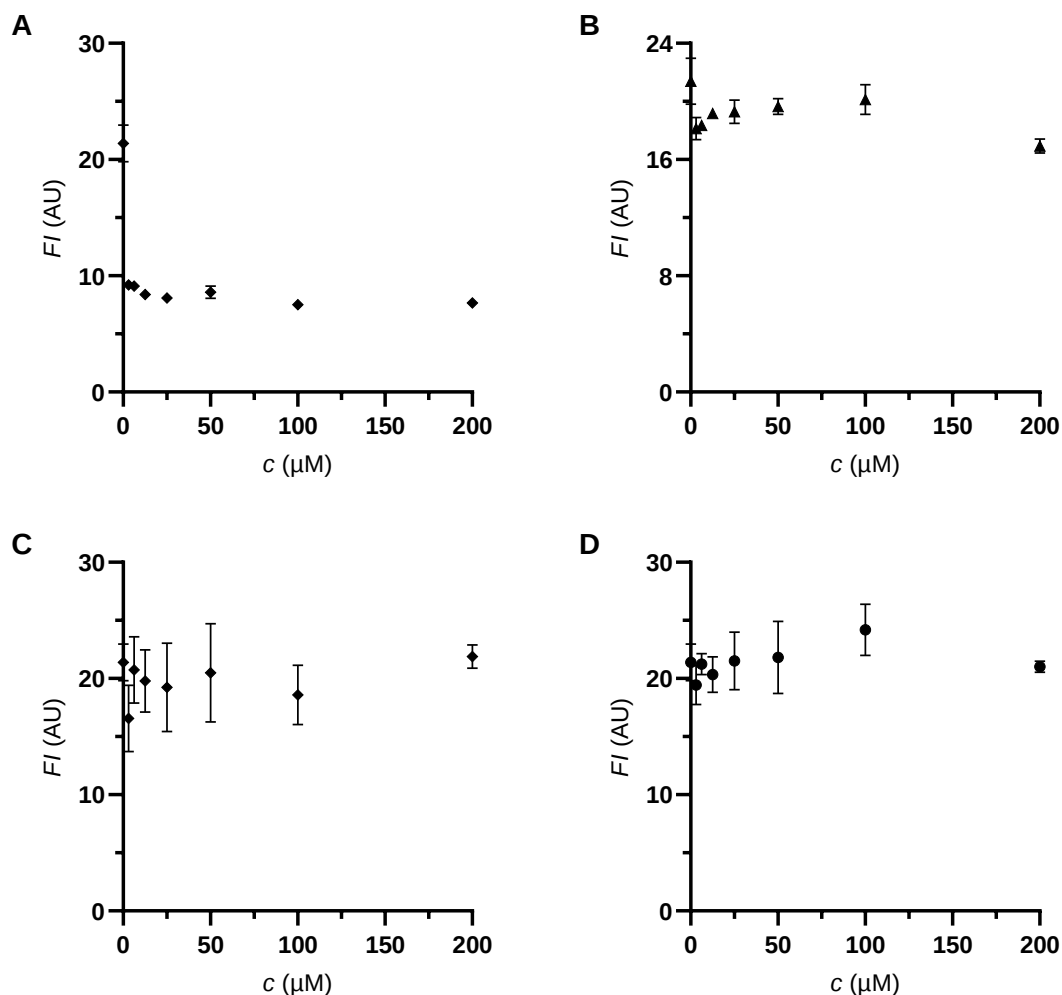
Abbildung 111: Konkurrenzexperimente von Dimethylamino-BODIPY-100/HSA (je 12.5 μM) mit: A) N-Piperidinyl subst. Azofarbstoff 76. B) N-Benzyl subst. Azofarbstoff 78. C) N-(2-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 79. D) 2-Chlorsalicylsäuremethylester-Derivat 35. E) N-Butyl subst. Azofarbstoff 73. F) N-(4-Hydroxyphenyl) subst. Azofarbstoff 89. $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$.

3.4 ANWENDUNG SPEZIFISCHER, FLUORESZIERENDER BINDER ZUR UNTERSUCHUNG DER ALBUMINBINDUNG IN SUDLOW-SITE I UND II

Tabelle 11: Berechnete K_I -Werte und Korrelationskoeffizienten der Azofarbstoffe 35, 73, 76, 78, 79 und 89.

Verbindung	K_I (μM)	R^2
N-Piperidinyl subst. Azofarbstoff 76	73.7 ± 2.0	0.751
N-Benzyl subst. Azofarbstoff 78	46.1 ± 1.8	0.764
N-(2-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 79	105.1 ± 2.4	0.714
2-Chlorsalicylsäuremethylester-Derivat 35	175.9 ± 5.5	0.536
N-Butyl subst. Azofarbstoff 73	4041	0.650
N-(4-Hydroxyphenyl) subst. Azofarbstoff 89	70046	0.822

In den Kompetitionskurven der Sulfasalazin-Derivate 36, 71, 74, 75, 81, 83, 85 und 86 sind eindeutig keine Kompetitionen zu erkennen (Abbildung 112A–F und Abbildung 113A–B). Dass diese Verbindungen 36, 71, 74, 75, 81, 83, 85 und 86 in Sudlow-Site II binden, ist daher äußerst unwahrscheinlich.



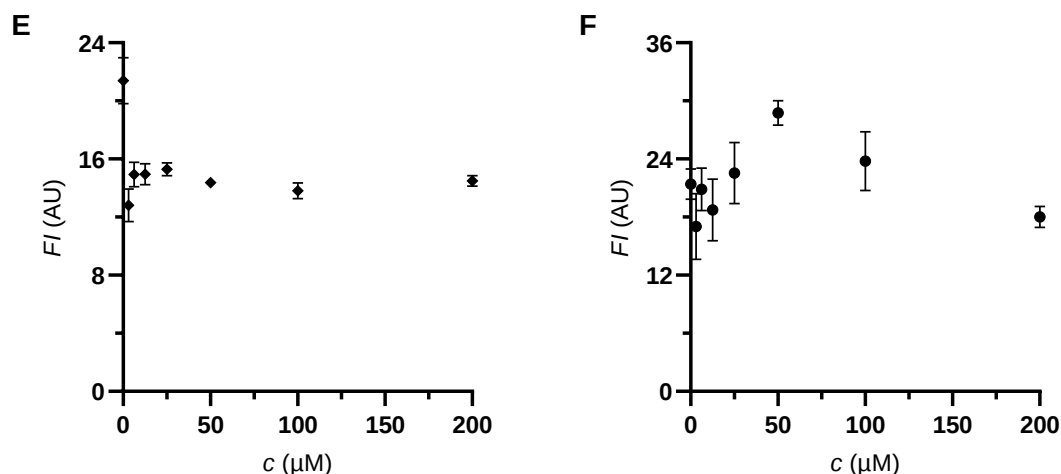


Abbildung 112: Konkurrenzexperimente von Dimethylamino-BODIPY-100/HSA (je 12.5 µM) mit: A) Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 36. B) N-Methyl subst. Azofarbstoff 71. C) N-Isopropyl subst. Azofarbstoff 74. D) N-Cyclopropyl subst. Azofarbstoff 75. E) N-(4-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 81. F) N-(4-Methoxyphenyl) subst. Azofarbstoff 83. $\lambda_{exc} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{em} = 690 \text{ nm}$.

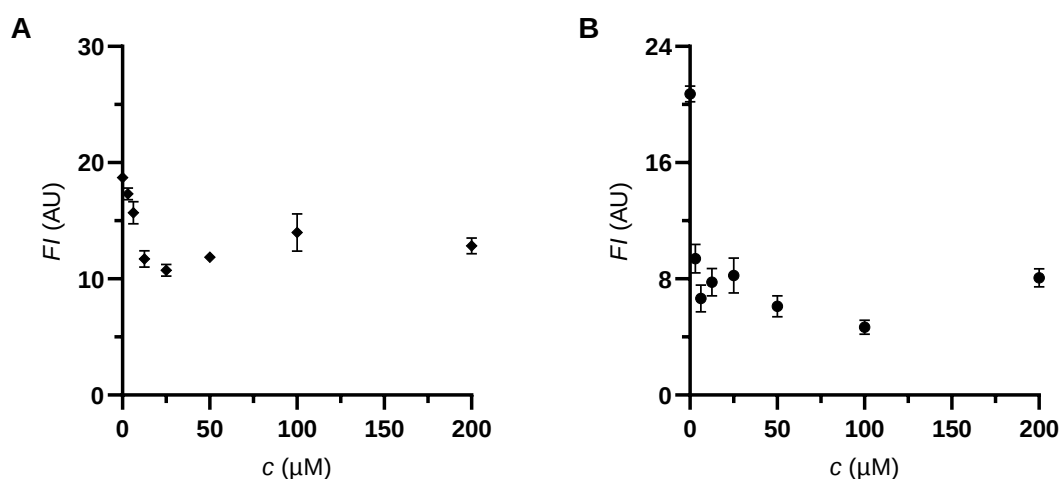


Abbildung 113: Konkurrenzexperimente von Dimethylamino-BODIPY-100/HSA (je 12.5 µM) mit: A) N-(Indazol-6-yl) subst. Azofarbstoff 85. B) N-(2-Benzoyloxy)phenyl Verbindung 86. $\lambda_{exc} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{em} = 690 \text{ nm}$.

Anschließend wurden die Konkurrenzexperimente mit 4-Hydroxywarfarin **112** als spezifischer Sudlow-Site I-Binder an HSA durchgeführt. Die Sulfasalazin-Derivate **47**, **76**, **79**, **81–86** und **89** verdrängen bereits ab einer Konzentration von ca. 3.13 µM das Sudlow-Site I Label **112** aus der Bindetasche (Abbildung 114–115).

3.4 ANWENDUNG SPEZIFISCHER, FLUORESZIERENDER BINDER ZUR UNTERSUCHUNG DER ALBUMINBINDUNG IN SUDLOW-SITE I UND II

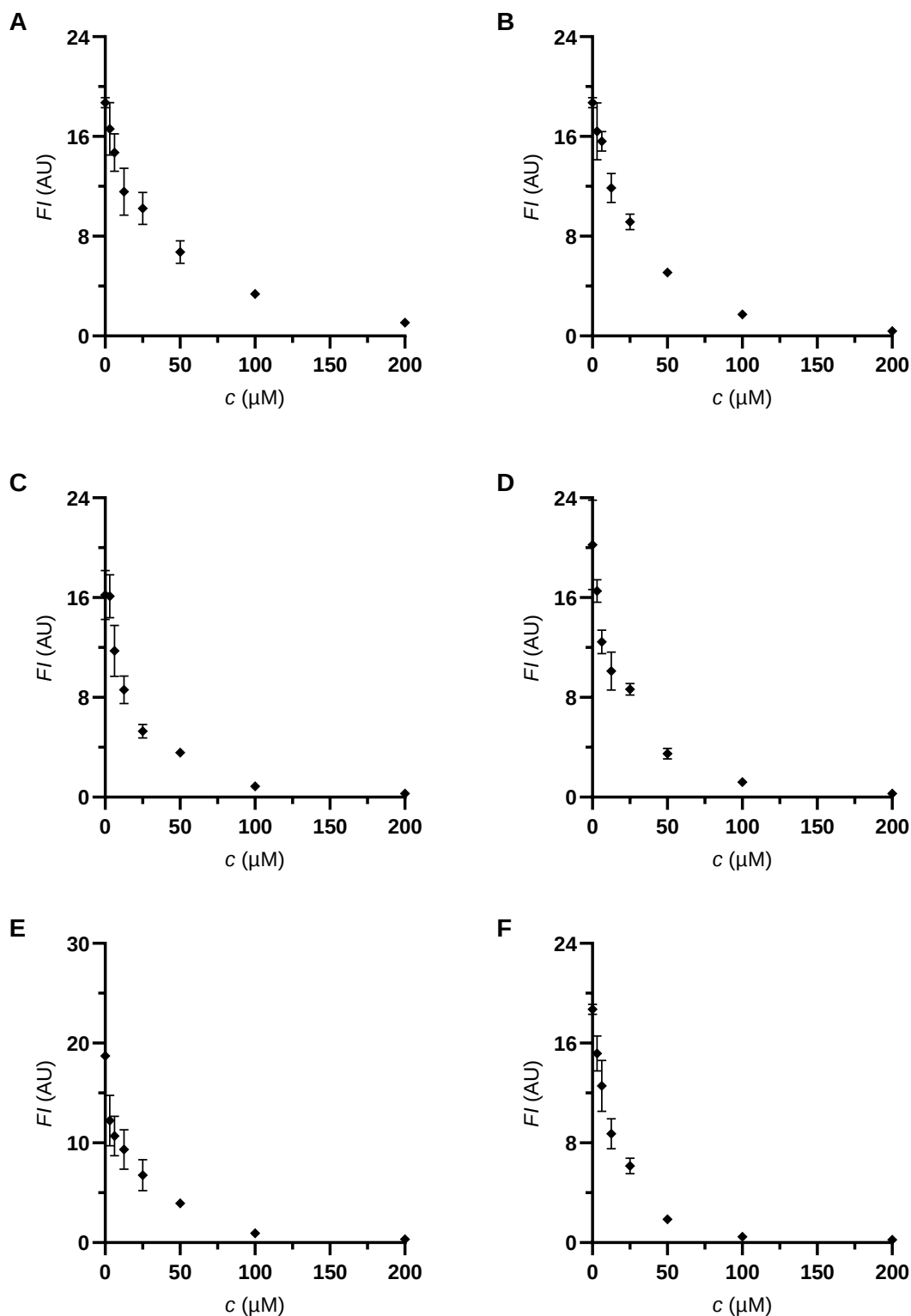


Abbildung 114: Konkurrenzexperimente von 4-Hydroxywarfarin-112/HSA (je 25 μM) mit: A) Benzolsulfonsäureamid 47. B) N-Piperidinyl subst. Azofarbstoff 76. C) N-(2-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 79. D) N-(4-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 81. E) N-(4-Methoxyphenyl) subst. Azofarbstoff 83. F) N-(4-Acetylphenyl) subst. Azofarbstoff 82. $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 384 \text{ nm}$.

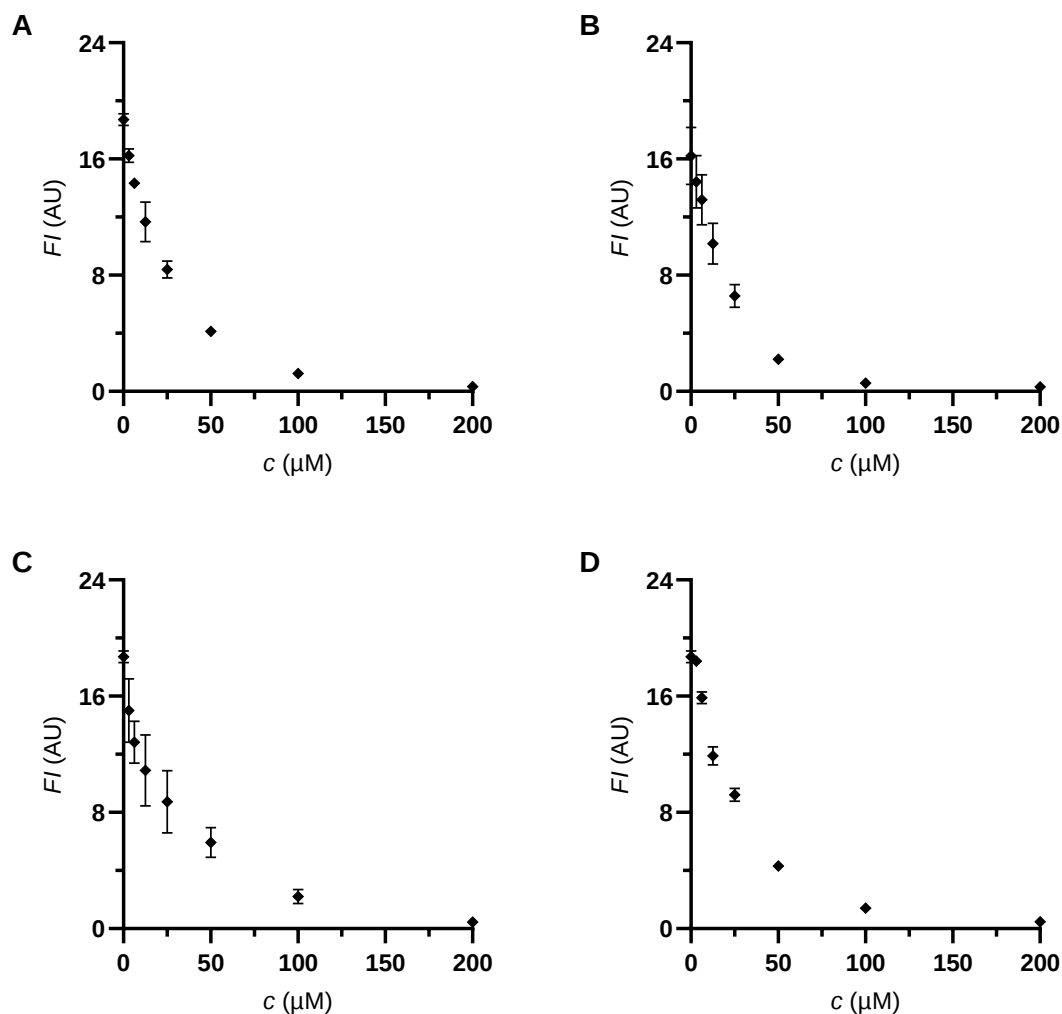


Abbildung 115: Konkurrenzexperimente von 4-Hydroxywarfarin-112/HSA (je 25 μM) mit: A) N-(4-Hydroxyphenyl) subst. Azofarbstoff **89**. B) N-(4-Nitronaphth-1-yl) subst. Azofarbstoff **84**. C) N-(Indazol-6-yl) subst. Azofarbstoff **85**. D) N-(2-Benzoyloxy)phenyl Verbindung **86**. $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$.

Tabelle 12: Berechnete K_I -Werte und Korrelationskoeffizienten der Azofarbstoffe **47**, **76**, **79**, **81–86** und **89**.

Verbindung	K_I (μM)	R^2
Benzolsulfonsäureamid 47	16.7 ± 1.4	0.866
N-Piperidinyll subst. Azofarbstoff 76	12.6 ± 1.3	0.926
N-(2-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 79	4.3 ± 1.4	0.897
N-(4-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 81	9.0 ± 1.3	0.934
N-(4-Methoxyphenyl) subst. Azofarbstoff 83	13.5 ± 1.6	0.760
N-(4-Acetylphenyl) subst. Azofarbstoff 82	5.7 ± 1.4	0.904
N-(4-Hydroxyphenyl) subst. Azofarbstoff 89	10.8 ± 1.2	0.969
N-(4-Nitronaphth-1-yl) subst. Azofarbstoff 84	8.1 ± 1.4	0.890
N-(Indazol-6-yl) subst. Azofarbstoff 85	16.5 ± 1.6	0.797
N-((2-Benzoyloxy)phenyl) subst. Azofarbstoff 86	9.0 ± 1.1	0.986

3.4 ANWENDUNG SPEZIFISCHER, FLUORESZIERENDER BINDER ZUR UNTERSUCHUNG DER ALBUMINBINDUNG IN SUDLOW-SITE I UND II

Auch alle anderen getesteten Sulfasalazin-Derivate **33–36**, **38**, **40**, **41**, **71**, **73–75**, **77**, **78** und **80** sind kompetitiv zu 4-Hydroxywarfarin **112**, allerdings erst ab einer Konzentration von ca. 6.25 μM (Abbildung 116), 12.5 μM (Abbildung 117) oder 25 μM (Abbildung 118).

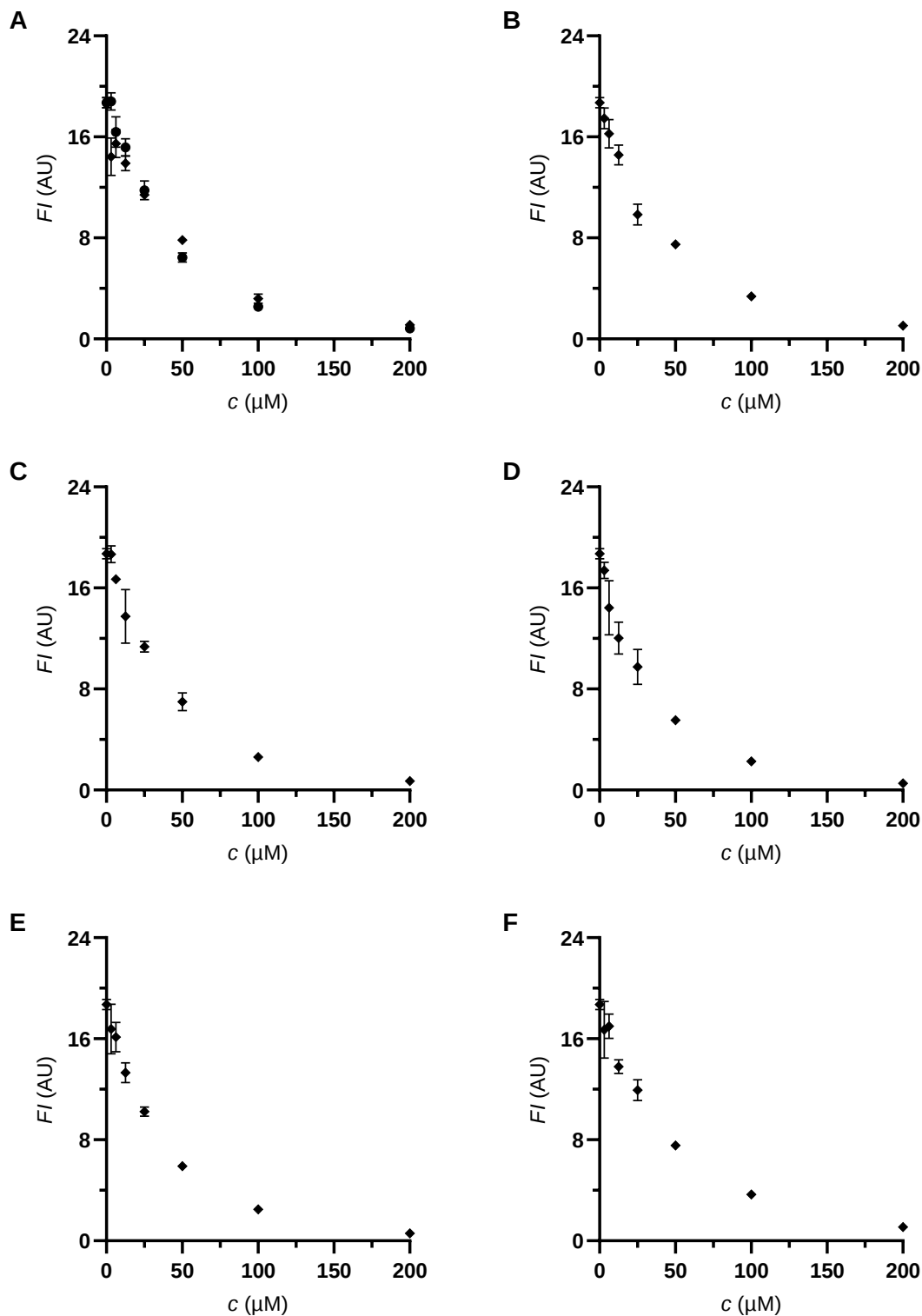


Abbildung 116: Konkurrenzexperimente von 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA (je 25 μM) mit: A) ● Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **36**. ♦ veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **38**. B) N-Methyl subst. Azofarbstoff **71**. C) N-Isopropyl subst. Azofarbstoff **74**. D) N-Cyclopropyl subst. Azofarbstoff **75**. E) N-Benzyl subst. Azofarbstoff **78**. F) N-Phenyl subst. Azofarbstoff **77**. $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$.

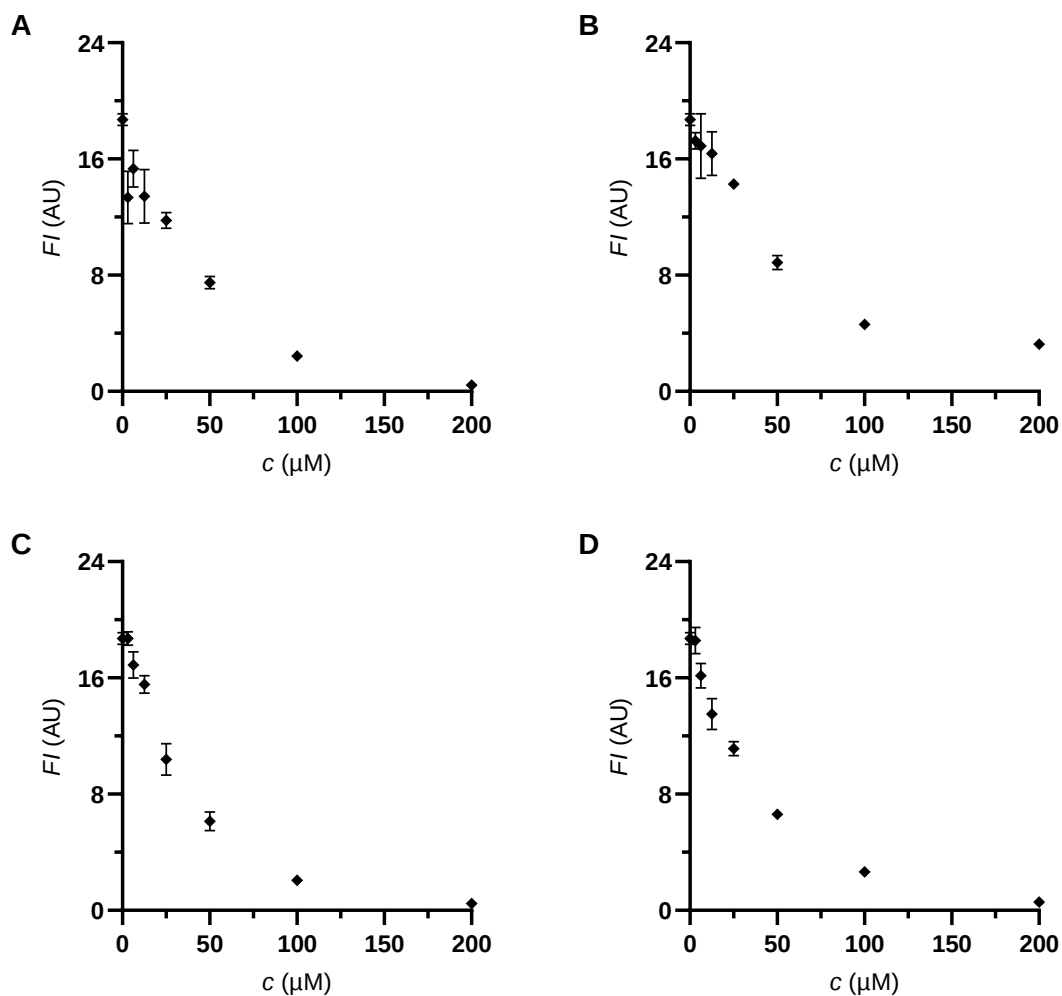
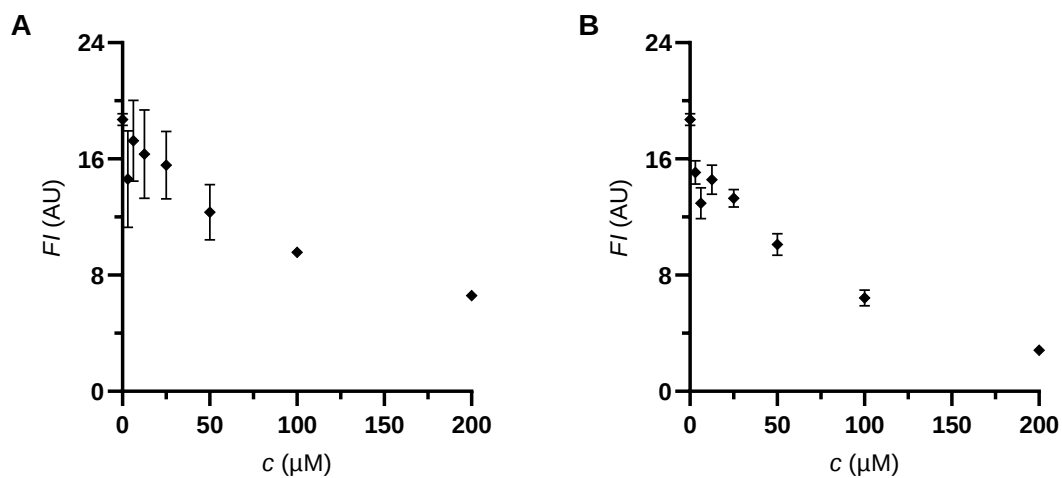


Abbildung 117: Konkurrenzexperimente von 4-Hydroxywarfarin-112/HSA (je 25 μM) mit: A) Salicylsäure-Derivat 33. B) Salicylsäuremethylester-Derivat 34. C) N-Butyl subst. Azofarbstoff 73. D) N-(3-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 80. $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$.



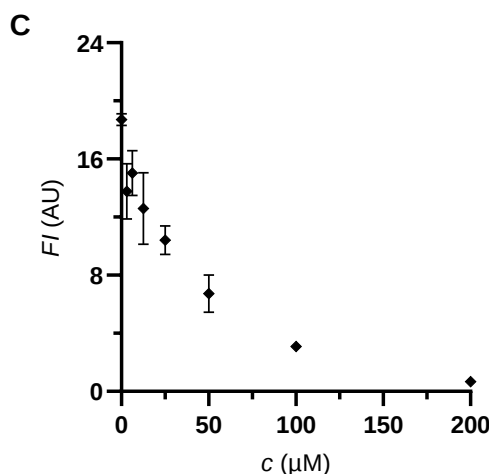


Abbildung 118: Konkurrenzexperimente von 4-Hydroxywarfarin-112/HSA (je 25 µM) mit: A) 2-Chlorsalicylsäuremethylester-Derivat 35. B) chlorierter, veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 40. C) chlorierter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 41. $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$. $\lambda_{em} = 384 \text{ nm}$.

Tabelle 13: Berechnete K_I -Werte und Korrelationskoeffizienten der Azofarbstoffe 33–36, 38, 40, 41, 71, 73–75, 77, 78 und 80.

Verbindung	K_I (µM)	R^2
Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 36	17.0 ± 1.2	0.967
veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 38	30.1 ± 1.3	0.939
N-Methyl subst. Azofarbstoff 71	17.9 ± 1.2	0.966
N-Isopropyl subst. Azofarbstoff 74	16.4 ± 1.2	0.951
N-Cyclopropyl subst. Azofarbstoff 75	13.2 ± 1.3	0.915
N-Benzyl subst. Azofarbstoff 78	16.0 ± 1.2	0.943
N-Phenyl subst. Azofarbstoff 77	23.3 ± 1.3	0.932
Salicylsäure-Derivat 33	32.5 ± 1.4	0.877
Salicylsäuremethylester-Derivat 34	27.1 ± 1.3	0.902
N-Butyl subst. Azofarbstoff 73	14.8 ± 1.2	0.969
N-(3-Methylphenyl) subst. Azofarbstoff 80	16.0 ± 1.2	0.971
2-Chlorsalicylsäuremethylester-Derivat 35	89.6 ± 2.4	0.574
chlorierter, veresterter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 40	68.2 ± 1.3	0.922
chlorierter Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff 41	26.2 ± 1.5	0.834

Unter Berücksichtigung aller durchgeführten Konkurrenzexperimente mit den site-spezifischen Markern NBD- C_{12} **8** (siehe Abschnitt 3.2), Dimethylamino-BODIPY **100** sowie dem 4-Hydroxywarfarin **112** kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass keines der synthetisierten Sulfasalazin-Derivate **33–36**, **38**, **40**, **41**, **47**, **71**, **73–86** und **89** spezifisch in der neu identifizierten Bindestelle von NBD- C_{12} **8** bindet. Es wurde ebenfalls keine Verbindung identifiziert, die nur in Sudlow-Site I oder nur in Sudlow-Site

II bindet. Stattdessen wurden zwei Derivate (**38** und **82**) identifiziert, die in allen drei Bindestellen mit hoher Affinität binden. Des Weiteren scheinen acht Verbindungen (**71**, **74**, **75**, **81**, **83**, **85**, **86** und **89**) ähnlich wie Sulfasalazin (**6**) in Sudlow-Site I sowie in der Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** zu binden.

In der nachfolgenden Tabelle ist eine Übersicht über die getesteten Sulfasalazin-Derivate **33–36**, **38**, **40**, **41**, **47**, **71**, **73–86**, **89** und die Bindestelle(n), in der sie jeweils binden, gezeigt.

Tabelle 14: Übersicht der Bindestellen der untersuchten Sulfasalazin-Derivate.

Verbindung	Sudlow-Site I	Sudlow-Site II	NBD-C ₁₂ 8
33	++	++	–
47	++	++	+
38	++	++	++
36	++	–	++
76	++	++	+
74	++	–	+
71	++	–	++
73	++	–	+
75	++	–	++
89	++	(+)	+
84	++	++	++
85	++	–	++
82	++	++	++
83	++	–	(+)
79	++	+	+
80	++	++	+
35	++	+	–
34	++	++	–
41	++	++	–
40	++	++	–
78	++	++	(+)
77	++	+	(+)
86	++	–	+
81	++	–	+

++ starke Bindung ($K_I < 80 \mu\text{M}$). + schwache Bindung ($K_I < 300 \mu\text{M}$).

(+) sehr schwache Bindung ($K_I \geq 300 \mu\text{M}$). – keine Bindung.

3.4.2 Modifizierte Fettsäuren

In eigenen Arbeiten^[326] wurden modifizierte Fettsäuren **10–21** synthetisiert, um die Bindungsaffinität von Myristinsäure (**3**) durch eine Fixierung der Konformation zu erhöhen (siehe Abschnitt 1.5). Keine dieser Fettsäuren war kompetitiv zur NBD-markierten C₁₂-Fettsäure **8**.

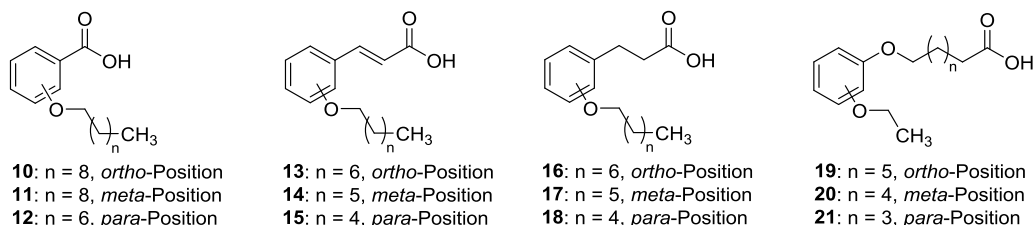
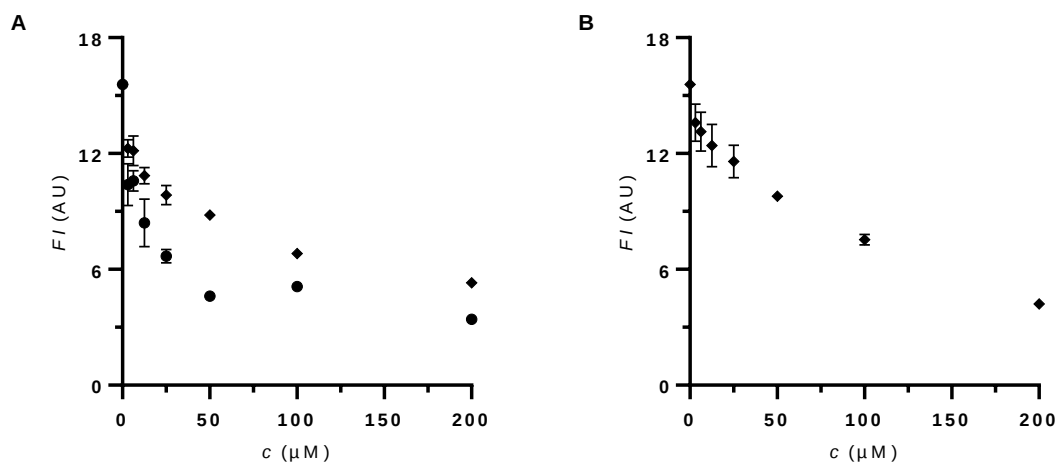


Abbildung 119: Strukturen der modifizierten Fettsäuren **10–21**.

Da die Bindestelle dieser Fettsäuren **10–21** nach wie vor unbekannt ist, wurden Konkurrenzexperimente mit den neu entwickelten, spezifischen Sudlow-Site I und Sudlow-Site II-Bindern **100** und **112** durchgeführt.

Die Propansäure-Derivate **16–18**, die (Ethyloxy)phenylalkylether **19** und **20**, die *meta*-substituierte Zimtsäure **14** wie auch die beiden getesteten Benzoessäuren 4-(Octyloxy)benzoessäure (**12**) und 2-(Decyloxy)benzoessäure (**10**) verdrängen bereits bei niedrigen Konzentrationen das Dimethylamino-BODIPY **100** aus der Bindetasche (Abbildung 120).



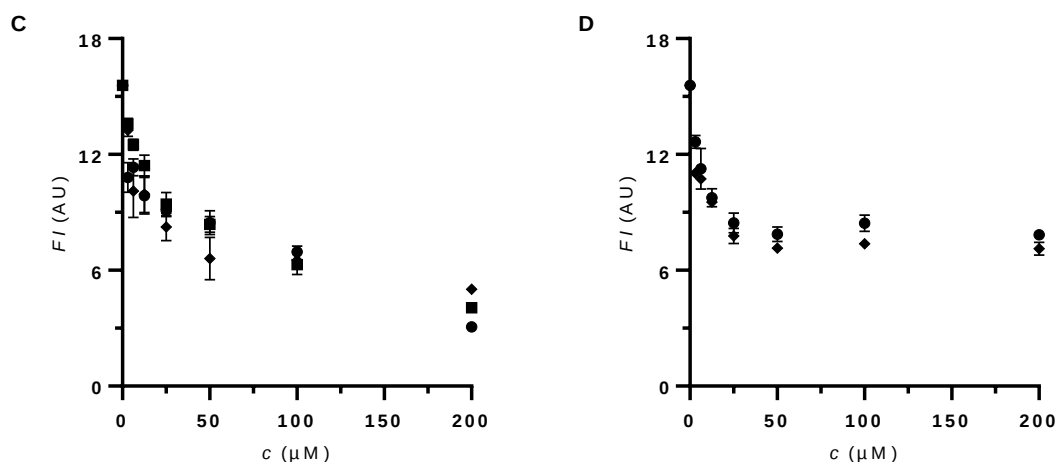


Abbildung 120: Konkurrenzexperimente von BODIPY-100/HSA (je $12.5 \mu\text{M}$) mit: A) ● subst. Benzoesäure 10. ♦ 4-(Octyloxy)benzoesäure (12). B) subst. Zimtsäure 14. C) ● ortho-subst. Propansäure 16. ■ meta-subst. Propansäure 17. ♦ para-subst. Propansäure 18 D) ● subst. Octansäure 19. ♦ subst. Heptansäure 20. $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$.

Die beiden *para*-substituierten Fettsäure-Derivate 15 und 21 sind zwar auch kompetitiv zum Dimethylamino-BODIPY 100, allerdings erst ab einer Konzentration von ca. $25 \mu\text{M}$ (Abbildung 121).

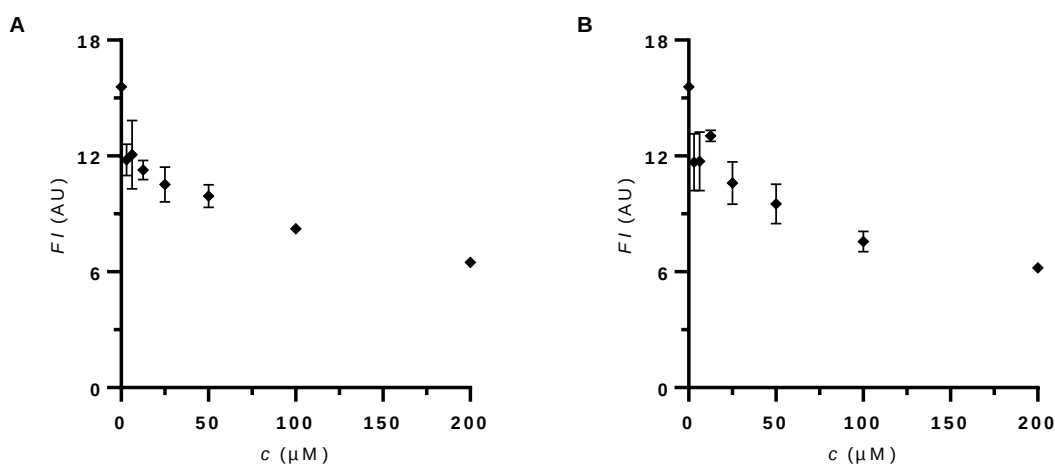


Abbildung 121: Konkurrenzexperimente von BODIPY-100/HSA (je $12.5 \mu\text{M}$) mit: A) subst. Zimtsäure 15. B) subst. Hexansäure 21. $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$.

Interessant ist, dass (*E*)-2-(Octyloxy)zimtsäure 13 als einzige, modifizierte Fettsäure nicht kompetitiv zum spezifischen Sudlow-Site II-Binder 100 ist (Abbildung 122). Erst ab einer hohen Konzentration (ca. $100 \mu\text{M}$) nimmt die Fluoreszenzintensität ab. Um zu klären, ob die Zimtsäure 13 spezifisch in Sudlow-Site I bindet, wurde ein Konkurrenzexperiment mit dem 4-Hydroxywarfarin 112 durchgeführt (Abbildung 123).

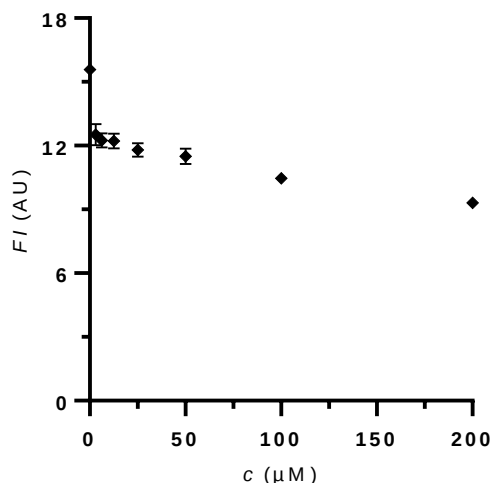


Abbildung 122: Konkurrenzexperiment von BODIPY-**100**/HSA (je 12.5 μM) mit (*E*)-2-(Octyloxy)zimtsäure (**13**). $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$.

Allerdings ist auch in diesem Konkurrenzexperiment mit der *ortho*-substituierten Zimtsäure **13** keine Konkurrenz mit dem Site-Label **112** zu erkennen. Daher ist unklar, ob die Bindungsaffinität für Sudlow-Site II zu gering ist, um das Dimethylamino-BODIPY **100** aus der Bindetasche zu verdrängen oder ob (*E*)-2-(Octyloxy)zimtsäure (**13**) an einer Stelle von HSA bindet, die von keinem der drei Farbstoffe NBD-C₁₂ **8**, Dimethylamino-BODIPY **100** und 4-Hydroxywarfarin **112** spezifisch besetzt wird.

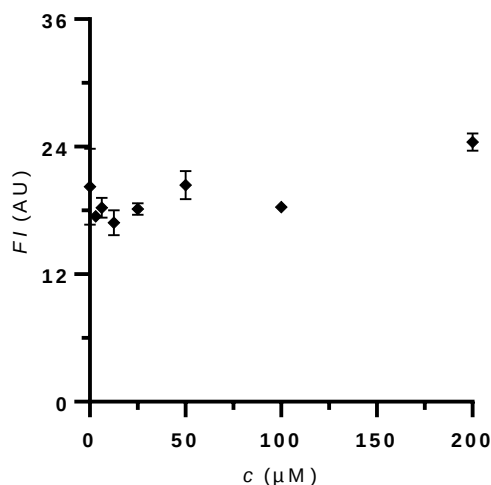


Abbildung 123: Konkurrenzexperiment von 4-Hydroxywarfarin-**112**/HSA (25 μM) mit (*E*)-2-(Octyloxy)zimtsäure (**13**). $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$.

In den Konkurrenzexperimenten mit 4-Hydroxywarfarin **112** ist keines der Fettsäure-Derivate **10**, **12** und **14–21** bei niedrigen Konzentrationen kompetitiv zum Sudlow-Site I Label **112**. Erst ab einer Konzentration von ca. größer 25 μM verdrängen die *ortho*-substituierten Fettsäure-Derivate **10**, **16** und **19** sowie die *meta*-substituierte Propansäure

17 und der *meta*-substituierte (Ethyloxy)phenylalkylether **20** das 4-Hydroxywarfarin **112** aus der Bindetasche (Abbildung 124). Da auch das Dimethylamino-BODIPY **100** durch diese Fettsäure-Derivate **10**, **16**, **17**, **19** und **20** aus Sudlow-Site II verdrängt wurde, allerdings mit höherer Affinität, ist Sudlow-Site I vermutlich die sekundäre Bindestelle dieser lipophilen Verbindungen.

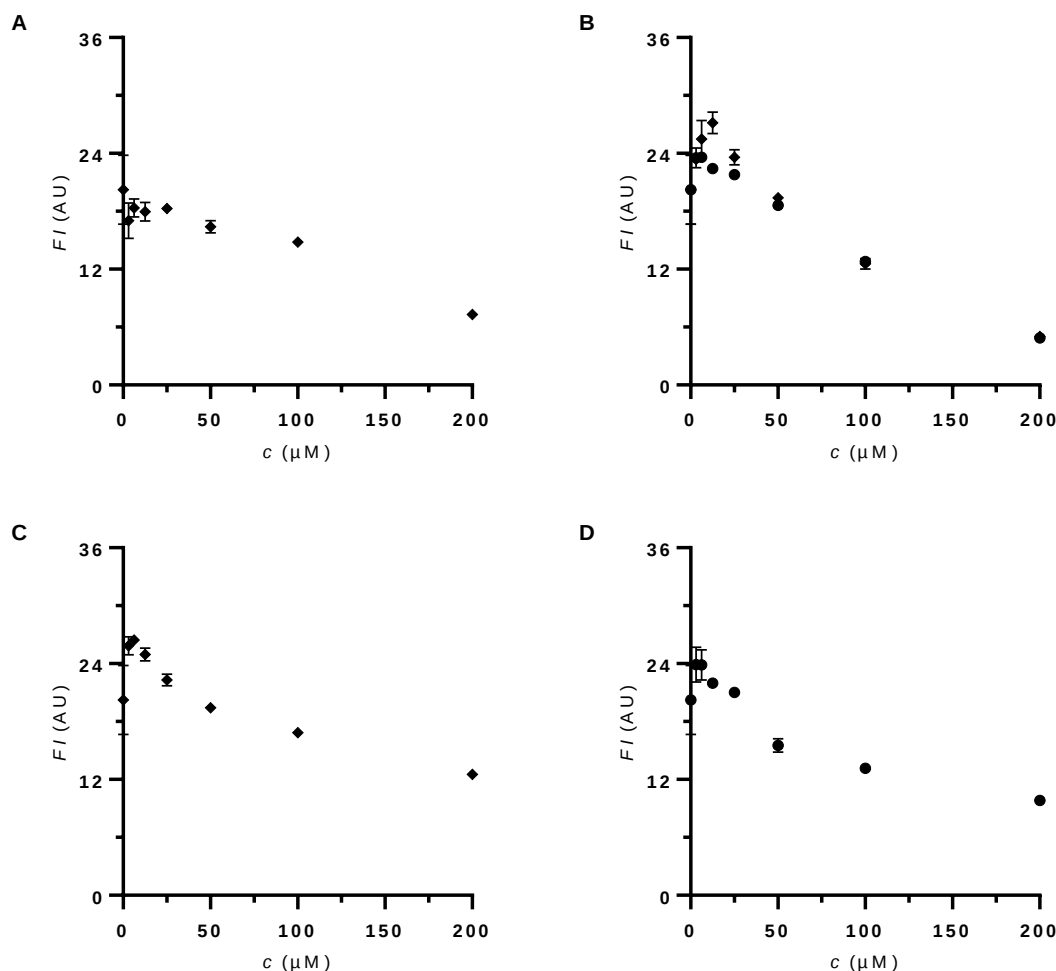


Abbildung 124: Konkurrenzexperimente von 4-Hydroxywarfarin-112/HSA (je 25 µM) mit: A) *ortho*-subst. Benzoessäure **10**. B) ● *ortho*-subst. Propansäure **16**. ♦ *meta*-subst. Propansäure **17**. C) subst. Octansäure **19**. D) subst. Heptansäure **20**. $\lambda_{exc} = 330$ nm. $\lambda_{em} = 384$ nm.

Alle *para*-substituierten Fettsäure-Derivate **12**, **15**, **18** und **21** sind erst ab hohen Konzentrationen von ca. größer 50 µM (**15** und **18**) bzw. 100 µM (**12** und **21**) kompetitiv zum Sudlow-Site I-Binder **112** (Abbildung 125A–B). Die Hexansäure **21** bindet daher wahrscheinlich spezifisch in der Sudlow-Site II, während die *para*-substituierte Zimtsäure **15** und die Propansäure **18** eine primäre (Sudlow-Site II) sowie eine sekundäre Bindestelle (Sudlow-Site I) besitzen. 4-(Octyloxy)benzoessäure **12** war in eigenen Arbeiten^[326] ab einer Konzentration von ca. größer 100 µM kompetitiv zur NBD-markierten Fettsäure **8**.

3.4 ANWENDUNG SPEZIFISCHER, FLUORESZIERENDER BINDER ZUR UNTERSUCHUNG DER ALBUMINBINDUNG IN SUDLOW-SITE I UND II

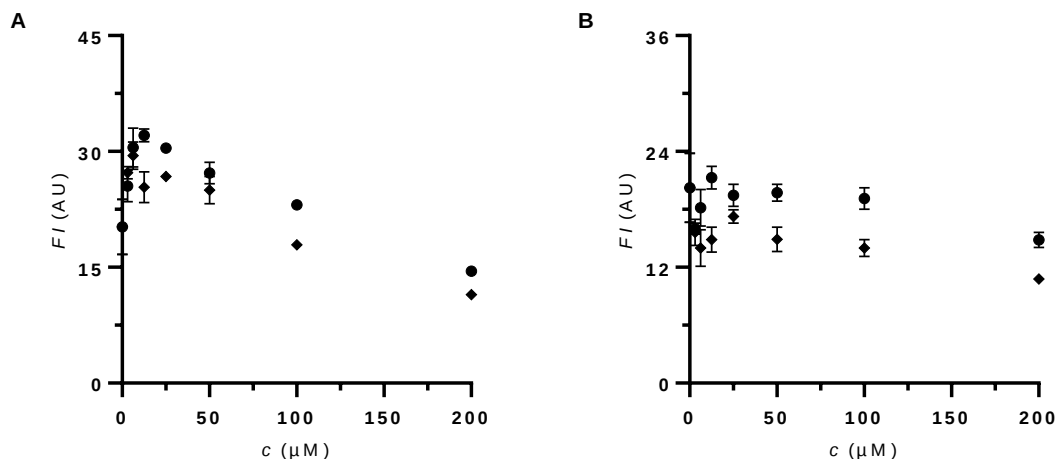


Abbildung 125: Konkurrenzexperimente von 4-Hydroxywarfarin-112/HSA (je 25 μM) mit: A) ● *para*-subst. Zimtsäure 15. ◆ *para*-subst. Propansäure 18. B) ● 4-(Octyloxy)benzoesäure (12). ◆ subst. Hexansäure 21. $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$.

Die *meta*-substituierte Zimtsäure 14 ist eindeutig nicht kompetitiv zu 4-Hydroxywarfarin 112 (Abbildung 126) und bindet daher spezifisch in Sudlow-Site II.

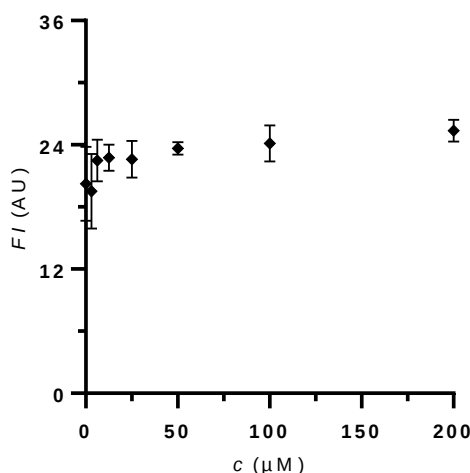


Abbildung 126: Konkurrenzexperiment von 4-Hydroxywarfarin-112/HSA (25 μM) mit *meta*-subst. Zimtsäure 14. $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$.

Die Inhibitionskonstanten der modifizierten Fettsäure-Derivate 10 und 12–21 und die dazugehörigen Korrelationskoeffizienten R^2 sind nachfolgend angegeben. Gleichzeitig ist auch die vermutliche Bindestelle an HSA genannt.

Tabelle 15: Berechnete K_I -Werte und Korrelationskoeffizienten der Fettsäure-Derivate **10**, **12–21**.

Verbindung	Sudlow-Site I		Sudlow-Site II		Bindestelle
	K_I (μM)	R^2	K_I (μM)	R^2	
<i>ortho</i> -subst. Benzoessäure 10	227 ± 1.9	0.849	11.2 ± 1.5	0.843	Site II (Site I)
<i>para</i> -subst. Benzoessäure 12	-	-	29.4 ± 1.3	0.933	Site II (NBD- C_{12} 8)
<i>ortho</i> -subst. Zimtsäure 13	-	-	-	-	unbekannt
<i>meta</i> -subst. Zimtsäure 14	-	-	53.5 ± 1.4	0.892	Site II
<i>para</i> -subst. Zimtsäure 15	426 ± 2.3	0.864	62.6 ± 1.8	0.714	Site II (Site I)
<i>ortho</i> -subst. Propansäure 16	96.3 ± 1.2	0.977	82.4 ± 1.4	0.893	Site II (Site I)
<i>meta</i> -subst. Propansäure 17	84.9 ± 1.3	0.934	27.7 ± 1.2	0.963	Site II (Site I)
<i>para</i> -subst. Propansäure 18	152 ± 1.5	0.910	8.66 ± 1.7	0.766	Site II (Site I)
subst. Octansäure 19	66.0 ± 1.2	0.971	1.74 ± 2.1	0.767	Site II (Site I)
subst. Heptansäure 20	44.6 ± 1.3	0.930	8.29 ± 1.4	0.871	Site II (Site I)
subst. Hexansäure 21	1627 ± 210.9	0.567	67.1 ± 1.9	0.714	Site II

Die sekundäre Bindestelle ist in Klammern () angegeben.

3.5 Versuche zur Entwicklung eines Site-spezifischen Sensors für glykierte HSA

In der neuen Cokristallstruktur der NBD-markierten Fettsäure **8** kokristallisiert mit HSA ist eine Salzbrücke zwischen der Aminosäure Lys-199 und der Carboxylgruppe der Fettsäure **8** zu erkennen. Somit ist diese Aminosäure maßgeblich an der Bindung des Liganden beteiligt. Auch bei der Bindung von Sulfasalazin (**6**) spielt Lys-199 durch die Wechselwirkung mit der Sulfonylgruppe eine wichtige Rolle.

Lys-199 gehört neben Lys-281 (beide Sudlow-Site I), Lys-439 (Sudlow-Site II) und Lys-525^[346-348] zu den wenigen Lysinen, die unter physiologischen Bedingungen glykiert werden können.

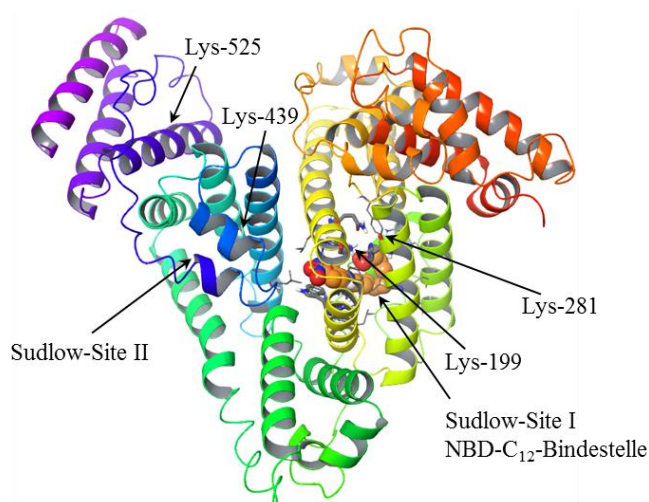


Abbildung 127: Cokristallstruktur von HSA mit NBD- C_{12} **8** und den wichtigsten Lysinen (Lys-525, Lys-439, Lys-281, Lys-199) zur Glykierung.

Glykierte HSA ist nicht direkt als pathologisch einzustufen. Der Anteil glykierter HSA liegt bei gesunden Menschen (Plasmaglukose ≤ 5.4 mM)^[349] bei 1–10%^[1, 8, 23, 132, 350-351] und steigt bei Diabetes-Patienten bedingt durch die deutlich erhöhte Nüchtern-Plasmaglukose (≥ 7 mM)^[352] um den Faktor 2–30^[1, 126, 132, 350-351, 353-356] an. Infolge der Glykierung werden abhängig vom Glykierungsgrad strukturelle Veränderungen des Plasmaproteins verursacht.^[1, 132, 346, 357-358] Bei sehr hohen Glukosekonzentrationen (>7 mM) wurde von Moosavi-Movahedi^[358] die Entfaltung des Proteins beobachtet. In einer Studie von Khan^[353] mit glykierter HSA (Inkubationszeit 20 Wochen, Glukosekonzentration 500 mM) wurde u.a. eine deutliche Abnahme der α -Helices bei gleichzeitigem Auftreten von β -Faltblattstrukturen (16%) beobachtet. Die Fluoreszenz der Aminosäure Trp-214 erlosch nahezu komplett.^[353] Von einer veränderten intrinsischen Fluoreszenz von HSA, die auf physikochemische Veränderungen der Umgebung von

Trp-214 zurückzuführen sind, wurde auch in anderen Studien^[132, 359] berichtet (Glucosekonzentration 150 mM). Dass die durch die Glykierung induzierte Strukturveränderung von HSA sich auf die Bindekapazität des Proteins auswirkt, wird von mehreren Arbeitsgruppen^[1, 126, 346, 357, 360-362] berichtet. Die Bindung von Fettsäuren in den beiden Wirkstoffbindestellen (FABS 3–4, 7) wird als vermindert oder als nicht mehr vorhanden beschrieben,^[126, 363] wohingegen die Wirkstoffbindung, wie z.B. von Warfarin (**2**) oder Glibenclamid, erhöht scheint.^[1, 8, 361] Bei Glibenclamid wird jedoch auch eine um 50% reduzierte Wirkstoffbindung beschrieben,^[364] was im Widerspruch zu anderen Literaturdaten steht. Die Arbeitsgruppe um *Shaklai* berichtet im Vergleich zu normaler HSA von einer um 50% reduzierten Bindung von Bilirubin. Bei Diabetes-Patienten^[360] könnte die reduzierte Bindung von Arzneistoffen auf die strukturellen Veränderungen von glykierter HSA zurückzuführen sein. Gleichzeitig kommt aber auch eine erhöhte Konzentration an Fettsäuren im Blut in Betracht, die mit den Substanzen um die Bindestelle kompetitieren.

Als Biomarker zur glykemischen Langzeitkontrolle (2–3 Monate) ist die Bestimmung von glykiertem Hämoglobin (HbA1c) die Methode der Wahl.^[1, 365-366] Bei Patienten mit instabilen Blutzuckerwerten, kürzlichen Bluttransfusionen, hämolytischer Anämie oder Niereninsuffizienz stellt der Biomarker jedoch keinen sichereren Parameter dar, weil die Produktion bzw. Halbwertszeit der Erythrozyten bei den beiden zuletzt genannten beeinträchtigt werden kann.^[1, 346, 367] In der Literatur^[1, 23, 368] wird glykierte HSA bereits lange als alternativer Biomarker, der auch für die kurzzeitige Kontrolle des glykemischen Status geeignet ist, diskutiert. Um den Gehalt an glykierter HSA zu bestimmen, wurden u.a. Immunassays und colorimetrische sowie enzymatische Verfahren entwickelt. Auch die Hochleistungsaffinitätschromatographie^[346] fand Anwendung. Eine Methode zur direkten Bestimmung von glykiertem Lys-199 ist bisher allerdings nicht beschrieben.

Um die Hypothese, dass Lys-199 maßgeblich an der Bindung der NBD-markierten Fettsäure **8** beteiligt ist, zu überprüfen, sollten Sättigungsexperimente mit NBD-C₁₂ **8** an glykierter HSA durchgeführt werden. Dazu wurde HSA in einer 166 mM Glucoselösung bei einer konstanten Temperatur von 37 °C inkubiert und nach drei verschiedenen Glykierungszeiten (1 Tag, 1 Woche, 1 Monat) in Sättigungsexperimenten eingesetzt. Die verschiedenen Zeitpunkte wurden gewählt, um eine Strukturveränderung von HSA infolge der Glykierung erkennen zu können, die durch den Vergleich der einzelnen K_D-Werte untereinander möglich sein sollte. Neben NBD-C₁₂ **8** wurden auch Titrationsexperimente mit Warfarin (**2**) und dem Dimethylamino-BODIPY **100** an

3.5 VERSUCHE ZUR ENTWICKLUNG EINES SITE-SPEZIFISCHEN SENSORS FÜR GLYKIERTE HSA

glykierter HSA durchgeführt, um etwaige Veränderungen in den Bindestellen dieser beiden spezifischen Marker (Sudlow-Site I und Sudlow-Site II) sichtbar zu machen.

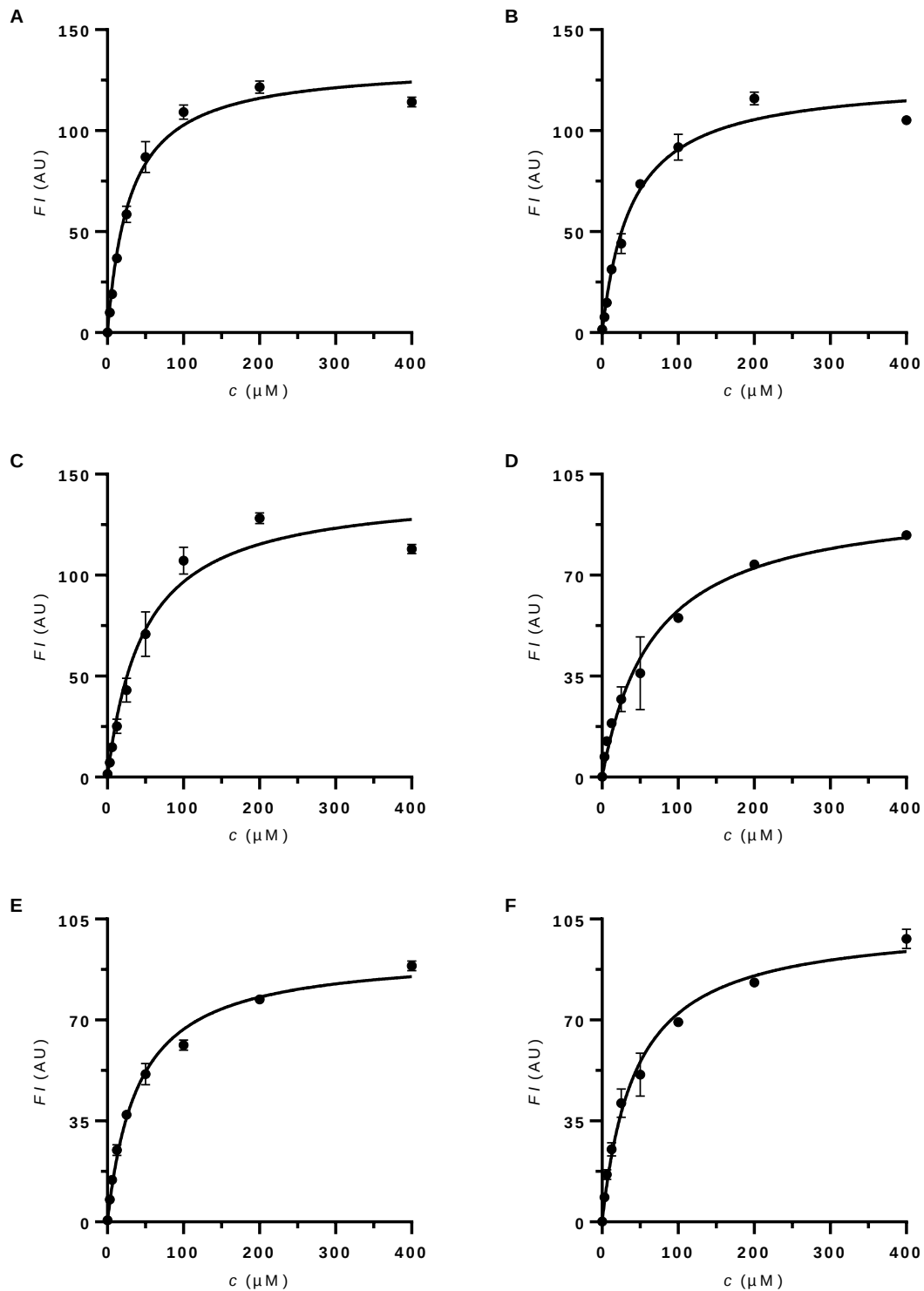


Abbildung 128: Titrationskurven an glykierter HSA (25 μM): A) NBD- C_{12} NDBC, 1 Tag. B) NBD- C_{12} NDBC, 1 Woche. C) NBD- C_{12} NDBC, 1 Monat. D) Warfarin (2), 1 Tag. E) Warfarin (2), 1 Woche. F) Warfarin (2), 1 Monat.

Die Fluoreszenztitrationskurven bei verschiedenen Glykierungszeiten zeigen sowohl bei der NBD-markierten Fettsäure **8** als auch bei Warfarin (**2**) den erwarteten Anstieg der Fluoreszenzintensität. Mit zunehmender Konzentration an Ligand kann bei NBD- C_{12} **8** auch eine Sättigung bei einem Ligand/HSA-Verhältnis von ca. 4:1 beobachtet werden (Abbildung 128A–C), wohingegen bei Warfarin (**2**) die Sättigung noch nicht ganz erreicht zu sein scheint (Abbildung 128D–F). Erwartungsgemäß ist auch bei den Titrationskurven des Dimethylamino-BODIPY **100** an glykierter HSA der initiale Anstieg der Fluoreszenzintensitäten zu erkennen, allerdings nehmen die FI-Werte dann ab einer Konzentration von 12.5 μM bzw. 25 μM signifikant ab (Abbildung 129A–C). Zum Vergleich ist die Titrationskurve des BODIPYs **100** an HSA gezeigt (Abbildung 129D), die unter den gleichen Bedingungen aufgenommen wurde.

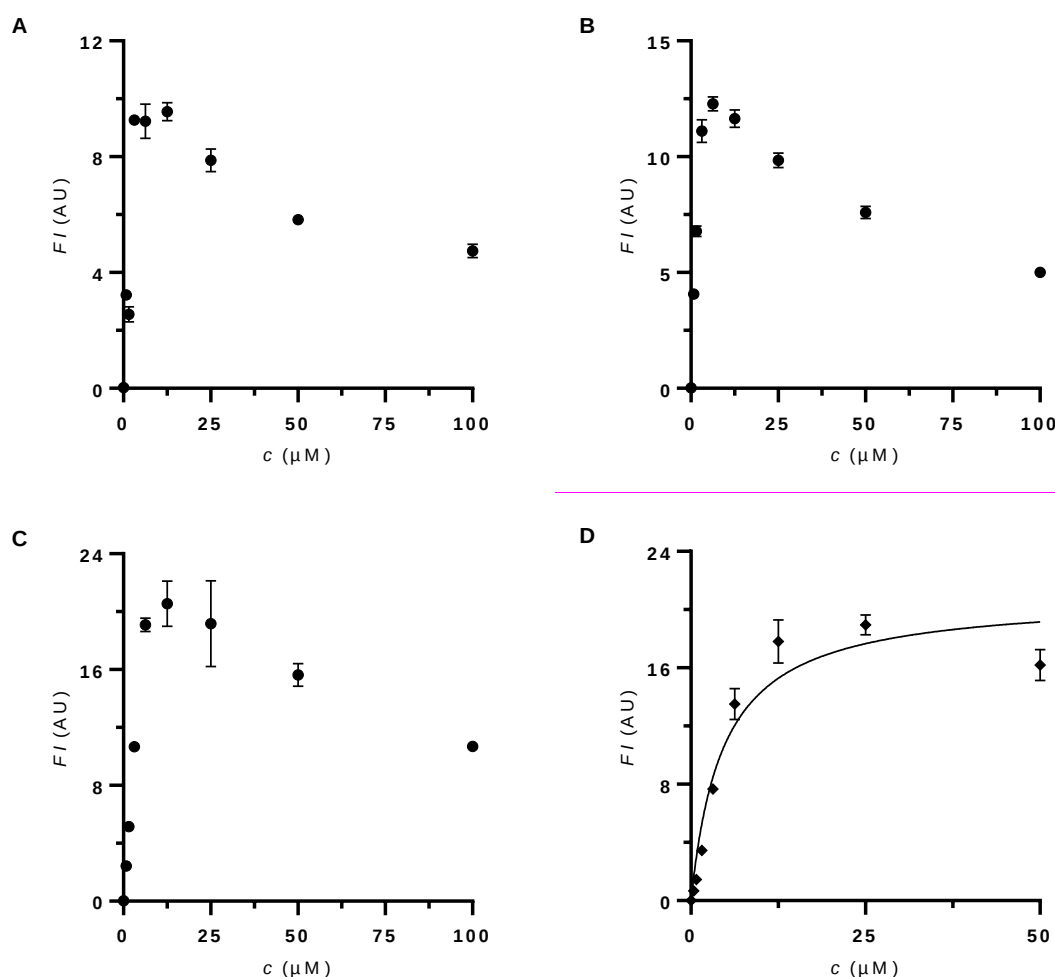


Abbildung 129: Titrationskurven von Dimethylamino-BODIPY **100** (0–100 μM) an HSA (12.5 μM): A) Glykierungsdauer: 1 Tag. B) Glykierungsdauer: 1 Woche. C) Glykierungsdauer: 1 Monat. D) nicht-glykierte HSA. $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$.

Aufgrund der Kontrollexperimente und der Reproduzierbarkeit der erhaltenen Daten wurde ein Fehler bei der Versuchsdurchführung ausgeschlossen. Somit könnten die Beobachtungen auf die Glykierung von Lys-439 zurückzuführen sein. Da die Fluoreszenzintensität in einem proportionalen Zusammenhang mit der Hydrophobizität der Umgebung steht, wäre eine deutliche Konformationsänderung infolge der Glykierung ebenfalls denkbar. Diese könnte zu einer verringerten Farbstoffbindung des Dimethylamino-BODIPYs **100** führen.

Für Warfarin (**2**) und die NBD-markierte Fettsäure **8** sind die Dissoziationskonstanten an glykierter HSA in Tabelle 16 gezeigt. Die K_D -Werte für das Dimethylamino-BODIPY **100** wurden aufgrund der fehlenden Sättigung nicht bestimmt.

Interessanterweise sinkt der K_D -Wert von Warfarin (**2**) nach einer Glykierungsdauer von zwei Wochen um ca. 34% ab, d.h. die Wirkstoffbindung des Cumarin-Derivates **2** steigt bei glykierter HSA an. Eine Beobachtung, die bereits von mehreren Arbeitsgruppen^[1, 8, 361] berichtet wurde. Wie zu erwarten steigt die K_D von NBD- C_{12} **8** im Vergleich zu der mit nicht-glykierter HSA mit zunehmender Glykierungsdauer an. Die Erkennung der Carboxylgruppe der NBD-markierten Fettsäure **8** durch Lys-199 ist wahrscheinlich aufgrund der Glykierung dieser Aminosäure nicht mehr möglich, sodass die Bindungsaffinität abnimmt. Diese Beobachtungen unterstreichen nochmal wie wichtig die Wechselwirkung zwischen Lys-199 und der Carboxylgruppe von NBD- C_{12} **8** zur Bindung in der neu identifizierten Bindestelle ist.

Tabelle 16: Dissoziationskonstanten der einzelnen Farbstoffe an HSA und glykierter HSA.

K_D (Verbindung)	HSA	Glyk. HSA 1 d	Glyk. HSA 7 d	Glyk. HSA 14 d
NBD- C_{12} 8	$21.6 \pm 2.9 \mu M$	$29.8 \pm 2.9 \mu M$	$38.9 \pm 4.1 \mu M$	$47.8 \pm 7.4 \mu M$
Warfarin (2)	$63.6 \pm 10.3 \mu M$	$68.1 \pm 9.0 \mu M$	$41.6 \pm 2.0 \mu M$	$44.0 \pm 5.1 \mu M$
Dimethylamino-BODIPY 100	$4.6 \pm 0.8 \mu M$	-	-	-

Da Lys-199 durch die Interaktion mit der Sulfonylgruppe direkt an der Bindung von Sulfasalazin (**6**) beteiligt ist, sollte ein Sulfasalazin-Derivat entwickelt werden, das bei glykierter HSA den Glucoserest an diesem Lysin erkennen kann. Boronsäuren werden weitreichend als funktionelle Gruppe in Sensoren zur Erkennung von verschiedenen Sacchariden^[369-380] und α -Hydroxycarbonsäuren^[381-382] eingebaut. Dabei wurde auf das Strukturmotiv der 2-Aminomethylphenylboronsäure zurückgegriffen, das u.a. in der

Arbeitsgruppe von Anslyn^[370-371, 382] erfolgreich zur Glucoseerkennung eingesetzt wird. Um die optimale Interaktion zwischen der Boronsäure und dem Glucoseresst zu gewährleisten, sollten die folgenden Boronsäure-funktionalisierten Sulfasalazin-Derivate mit verschiedenen Spacern zwischen dem Sulfonamid und der Phenylboronsäure synthetisiert werden (Abbildung 130).

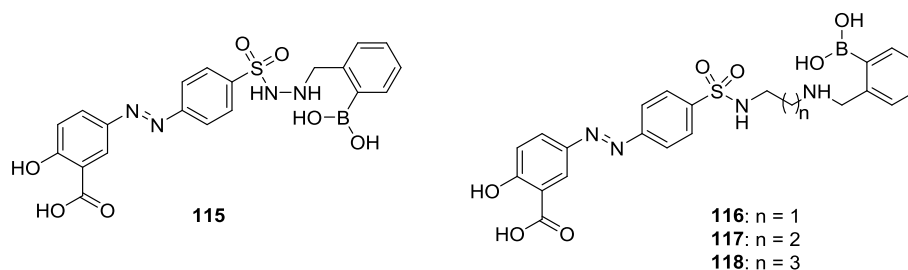


Abbildung 130: Strukturen der geplanten Boronsäure-funktionalisierten Sulfasalazin-Derivate **115–118**.

Abbildung 131 zeigt das Retrosyntheschema für die Sulfasalazin-Derivate **116–118** nach der zuvor verwendeten Methode über die Synthese des *N*-Alkylsulfonamids mit anschließender Diazotierung und Azokupplung.

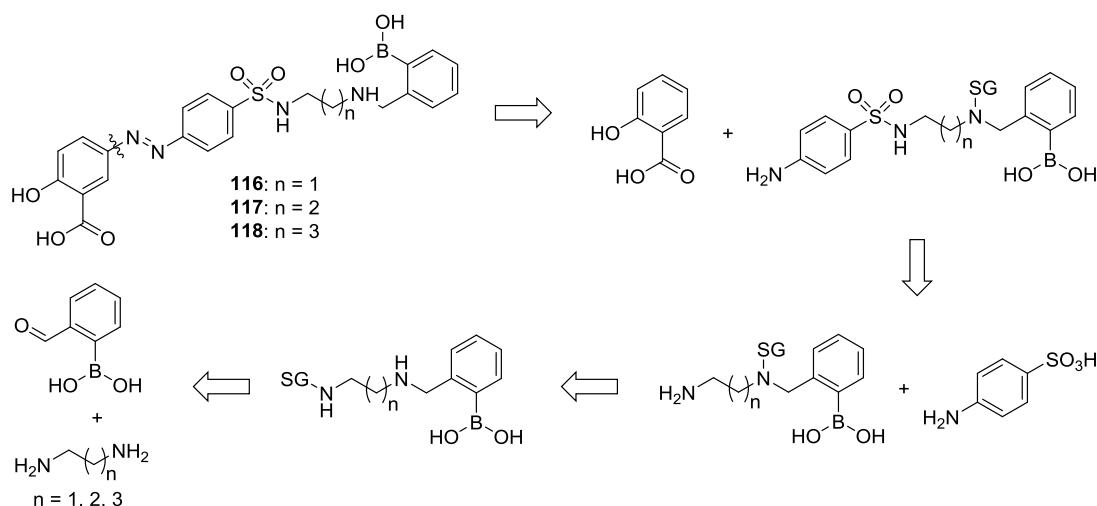


Abbildung 131: Retrosynthese zu den Boronsäure-funktionalisierten Sulfasalazin-Derivaten **116–118** über das *N*-Alkylsulfonamid mit anschließender Azokupplung.

Die Synthese der 2-Aminomethylphenylboronsäure-Derivate **119** und **120** sollte durch eine reduktive Aminierung mit 2-Formylphenylboronsäure erfolgen. Dafür wurden die Diamine zunächst mit einer Boc-Schutzgruppe versehen. *N*-Boc-geschütztes Ethylendiamin **121**, Propylen-1,3-diamin **122** und Putrescin **123** wurden in hohen bis sehr hohen Ausbeuten von 72–98% erhalten (Abbildung 132).

3.5 VERSUCHE ZUR ENTWICKLUNG EINES SITE-SPEZIFISCHEN SENSORS FÜR GLYKIERTE HSA

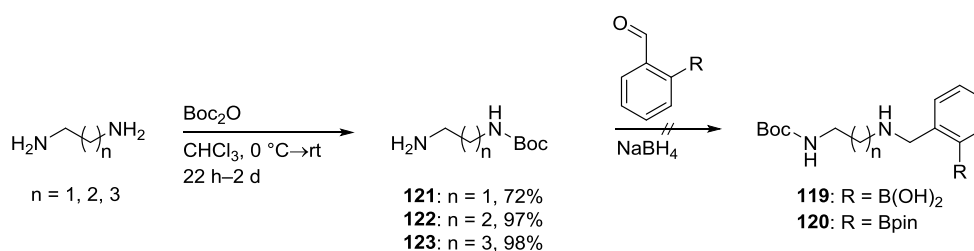


Abbildung 132: Versuche zur Synthese der 2-Aminomethylphenylboronsäure-Derivate **119** und **120**.

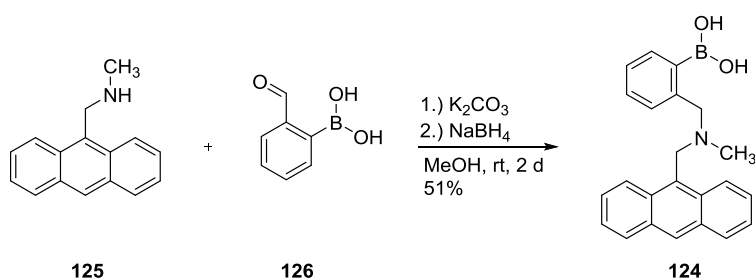
Die reduktive Aminierung erwies sich jedoch als sehr schwierig, da unter verschiedenen Reaktionsbedingungen kein Produkt isoliert werden konnte (Tabelle 17). Weder die von der Arbeitsgruppe Anslyn^[371] noch die von der Arbeitsgruppe Yoon^[383] beschriebenen Methoden für die reduktive Aminierung mit primären Aminen (Eintrag 1–2) oder sekundären Aminen führten zum Erfolg.

Tabelle 17: Getestete Reaktionsbedingungen für die reduktive Aminierung.

#	Amin	CHO	Lösungsmittel	AcOH	Reduktionsmittel I	Ergebnis
1	primär	–Bpin	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (2:1)	1.4 äq.	NaBH(OAc) ₃ 1.4 äq.	Kein Produkt
2	primär	–Bpin	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (1:1)	20mol %	NaBH(OAc) ₃ 1.4 äq.	Kein Produkt
3	sekundär	+Bpin	MeOH	20mol %	1.5 äq. NaBH ₄	Kein Produkt
4	sekundär	+Bpin	CH ₂ Cl ₂	20mol %	1.5 äq. NaBH ₄	Kein Produkt
5	sekundär	+Bpin	CH ₂ Cl ₂	20mol %	1.5 äq. NaBH ₄ ^a	Kein Produkt

^a Verwendung einer anderen Charge des Reduktionsmittels.

Um das Reduktionsmittel und die allgemeine Vorgehensweise zu überprüfen, wurde eine literaturbekannte Substanz, *Shinkai's* Reagenz **124**, über eine reduktive Aminierung dargestellt. *Shinkai's* Reagenz^[372] **124** wird als Zuckersensor in wässrigem Medium eingesetzt und könnte im Rahmen dieser Arbeit als Nachweis für die erfolgreiche *in vitro* Glykierung von HSA dienen. Die Phenylboronsäure **124** konnte ausgehend von 9-(Methylaminomethyl)anthracen (**125**) und 2-Formylphenylboronsäure (**126**) in einer Ausbeute von 51% erhalten werden.

Abbildung 133: Synthese von Shinkai's Reagenz (**124**).

Da die reduktive Aminierung mit verschiedenen Aminen und 2-Formylphenylboronsäure(pinakolester) unter diversen Reaktionsbedingungen nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde dieser Syntheseweg nicht weiter verfolgt. Zusätzlich würde der sich im Retrosyntheschema (Abbildung 131) dargestellte Syntheseweg aufgrund der Schutzgruppenmanipulation zur Verhinderung der Bildung von Nitrosaminen als sehr aufwendig gestalten und die Einführung der Boronsäure in einer frühen Synthesestufe die Synthese und Handhabung aufgrund der hohen Polarität deutlich erschweren. Ein Boronsäurepinakolester könnte für die reduktive Aminierung eingesetzt werden, allerdings würde es unter den stark sauren Bedingungen^[384] bei der Spaltung der Phosphortriamide vermutlich zu einer Abspaltung/Zersetzung der Schutzgruppe sowie der Boronsäure kommen. Daher wurde geplant, den Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **36** mit einer Acetonid-Schutzgruppe zu versehen, anschließend selektiv an der Sulfonsäure zu chlorieren und mit dem entsprechenden Amin umzusetzen. Das gewünschte Produkt **127** konnte allerdings nicht isoliert werden, da bei 50 °C kein Umsatz beobachtet und unter Rückfluss nur ein komplexes Reaktionsgemisch erhalten wurde (Abbildung 134).

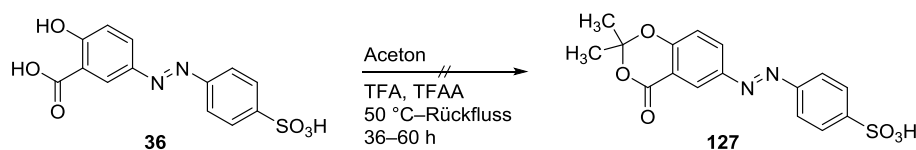


Abbildung 134: Versuch zur Einführung der Acetonid-Schutzgruppe.

Die Arbeitsgruppe Fesik^[385] hat erfolgreich Sulfonamidkupplungen durchgeführt. Allerdings konnte unter den genannten Reaktionsbedingungen kein Produkt isoliert werden. Bei einem deutlichen Überschuss von *N,N'*-Dimethylbutylendiamin (Putrescin) wurde bei der Umsetzung mit dem Benzolsulfonsäure-Azofarbstoff **38** jedoch anstelle des gewünschten Kupplungsproduktes **128** der *N*-Sulfonylharnstoff **129** erhalten (Abbildung 135).

3.5 VERSUCHE ZUR ENTWICKLUNG EINES SITE-SPEZIFISCHEN SENSORS FÜR GLYKIERTES HSA

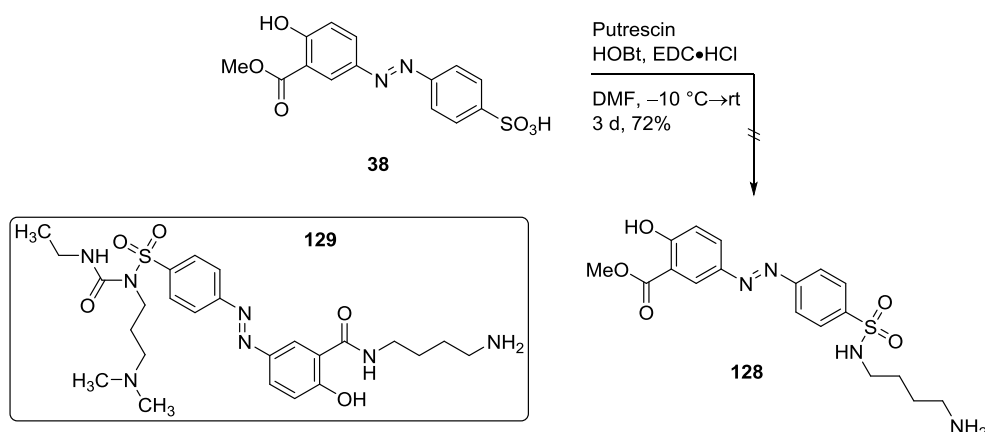


Abbildung 135: Versuch zur Sulfonamidkupplung zur Bildung des Vorläufers **128** für die reduktive Aminierung.

Da die bisherigen Versuche zur Darstellung der Boronsäure-funktionalisierten Sulfasalazin-Derivate **116–118** scheiterten, wurde auf die zuvor erfolgreich verwendete, modulare Synthese (Abbildung 131) zurückgegriffen. Allerdings sollte die Synthese der *N*-Alkylsulfonamide ausgehend von sekundären Aminen erfolgen, um die Bildung von Nitrosaminen am Benzylamin sowie am Sulfonamid zu verhindern und die Einführung einer säurestabilen Schutzgruppe (z.B. Fmoc) zu umgehen. Für die Glucoseerkennung durch die Boronsäure ist es nicht von Bedeutung, ob es sich bei der Aminogruppe in 2-Position zu der Phenylboronsäure um ein sekundäres oder tertiäres Amin handelt.^[370, 372, 374-375, 378, 382, 386] Die neue Syntheseroute wurde ausgehend von *N,N'*-Dimethylethylendiamin getestet. Dazu wurde das Diamin mit Di-*tert*-butyldicarbonat mono Boc-geschützt (Abbildung 136).

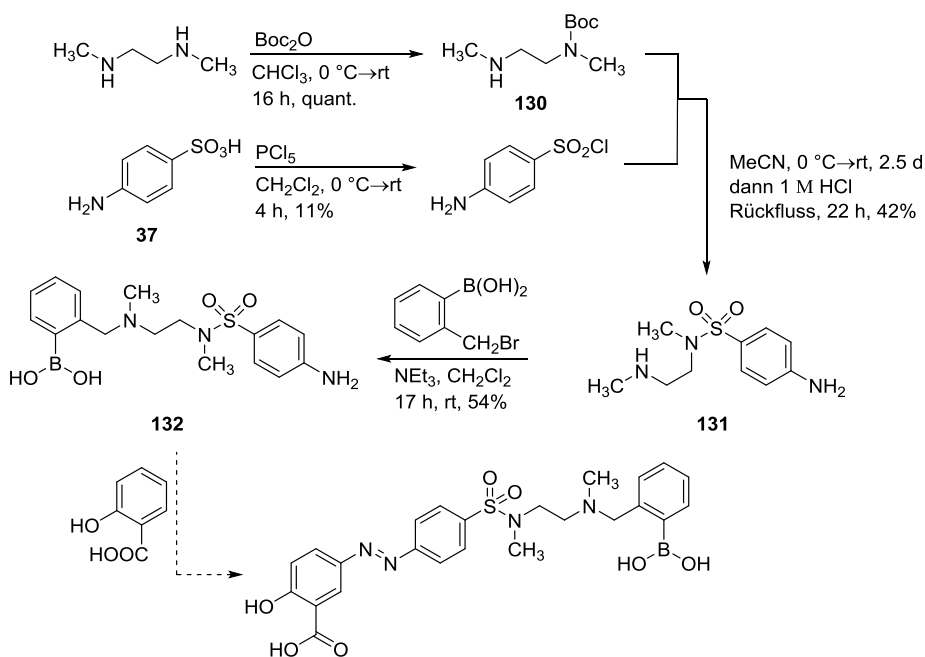


Abbildung 136: Synthese des *N*-Methyl-*N'*-alkylsulfonamids **132**.

Das erhaltene *N*-Boc-geschützte *N,N'*-Dimethylethylendiamin **130** wurde mit Benzolsulfonsäurechlorid, das durch Chlorierung von Sulfanilsäure (**37**) zugänglich war, zu dem Sulfonamid **131** in einer moderaten Ausbeute von 42% umgesetzt. Anschließend wurde das sekundäre Amin **131** mit 2-Brommethylphenylboronsäure alkyliert, wodurch das Vorläufermolekül **132** für die Azokupplung in einer Ausbeute von 54% erhalten wurde.

Da parallel an einem alternativen Syntheseweg zu den Boronsäure-funktionalisierten Sulfasalazin-Derivaten **116–118** gearbeitet wurde, der sich als effizienter (geringer Substanzverlust, hohe Ausbeuten) erwies, wurde die Diazotierung des Anilins **132** mit anschließender Azokupplung mit Salicylsäure (**32**) nicht durchgeführt. Die alternative Syntheseroute sah vor, 4-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid mit verschiedenen Aminen umzusetzen und anschließend die Nitrogruppe zur Aminogruppe zu reduzieren. Dadurch könnte auch die Bildung der Phosphortriamide verhindert werden. Während *N,N'*-Dimethylethylendiamin und *N,N'*-Dimethylpropylen-1,3-diamin kommerziell bezogen wurden, wurde *N,N'*-Dimethylbutylen-1,4-diamin (**133**) ausgehend von Putrescin synthetisiert. Dazu wurde das Diamin zweifach mit einer Boc-Schutzgruppe versehen und anschließend mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert. Das gewünschte Produkt **133** wurde in einer Ausbeute von 42% erhalten (Abbildung 137).

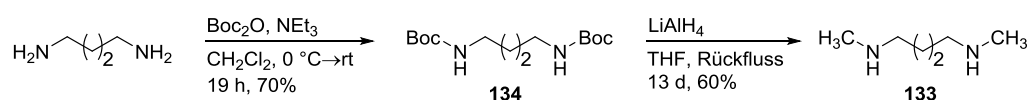


Abbildung 137: Synthese von *N,N'*-Dimethylbutylen-1,4-diamin (**133**).

Die drei als Spacer dienenden *N,N'*-Dimethylalkylendiamine wurden jeweils mit Di-*tert*-butyldicarbonat in quantitativer Ausbeute mit einer Boc-Schutzgruppe versehen. Anschließend wurden die Boc-geschützten *N,N'*-Dimethylalkylendiamine **130**, **135** und **136** mit 4-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid zu den 4-Nitrobenzolsulfonamiden **137–139** umgesetzt. Durch die Reduktion mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle waren die gewünschten Aniline **140–142** in teilweise quantitativer Ausbeute zugänglich. Das Anilin **141** wurde diazotiert und in einer Azokupplung mit Salicylsäure (**32**) umgesetzt. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe lieferte das sekundäre Amin **146** in einer Ausbeute von 39% über 2 Stufen (Abbildung 138). Um die Alkylierung mit 2-Brommethylphenylboronsäure unter verschiedenen Reaktionsbedingungen untersuchen zu können und die Carboxylgruppe zu schützen, wurde die Azokupplung von Anilin **140** mit Salicylsäuremethylester (**39**) durchgeführt. Nach der Abspaltung der Boc-

3.5 VERSUCHE ZUR ENTWICKLUNG EINES SITE-SPEZIFISCHEN SENSORS FÜR GLYKIERTES HSA

Schutzgruppe wurde das gewünschte Produkt **144** über 2 Stufen in einer Ausbeute von 43% erhalten.

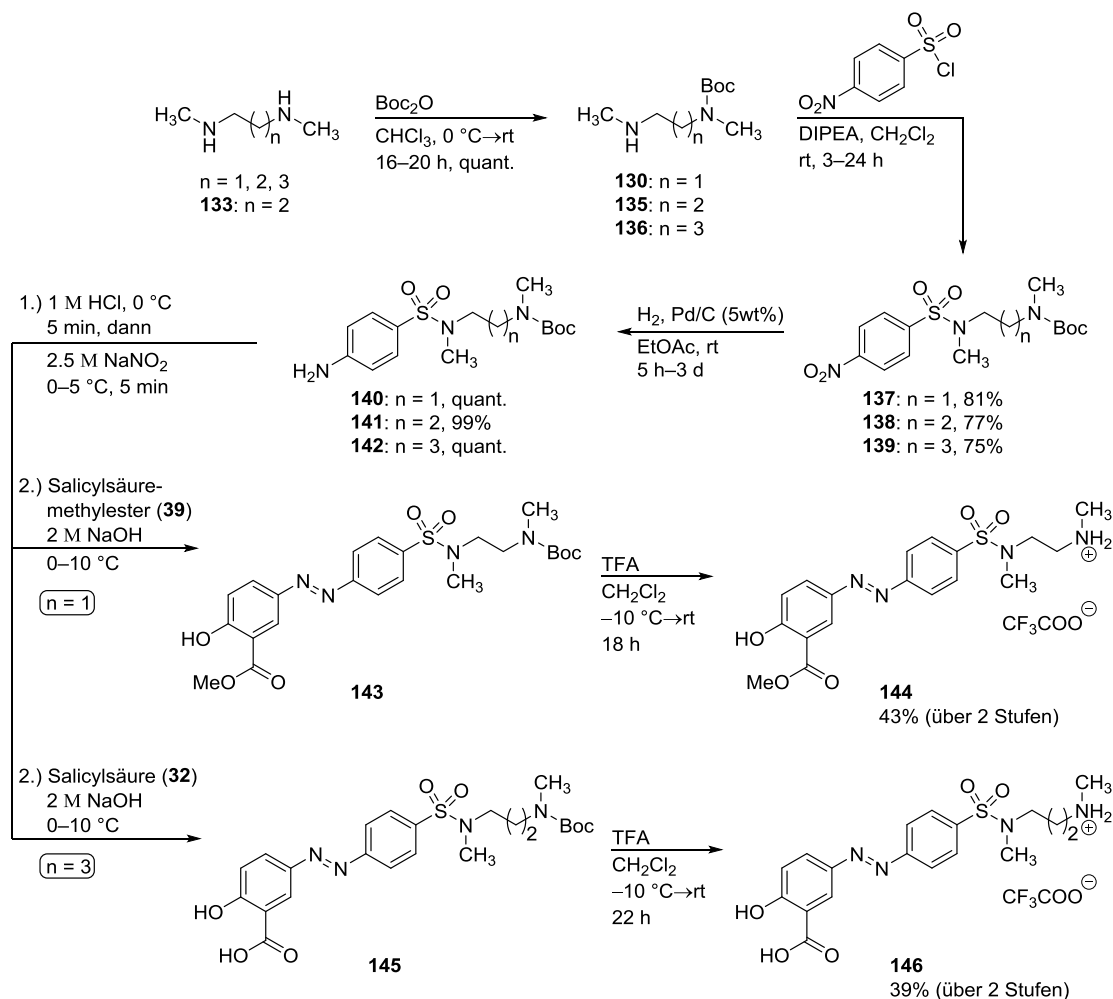


Abbildung 138: Synthese der N-Alkylsulfonamide **140**–**142** mit anschließender Azokupplung und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.

Auch das Sulfasalazin-Derivat **115** sollte über diese Syntheseroute zugänglich sein. Hydrazinhydrat (64wt% wässrige Lösung) wurde mit einer Boc-Schutzgruppe versehen und anschließend mit 4-Nitrophenylsulfonsäurechlorid zum Boc-geschützten Sulfonsäurehydrazid **147** umgesetzt (Abbildung 139).

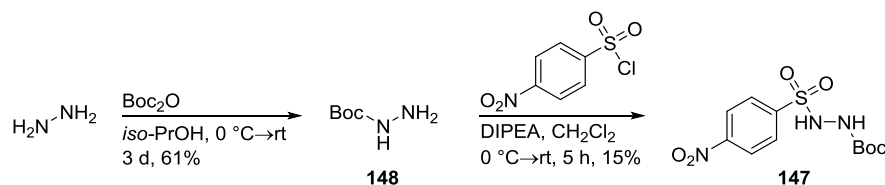


Abbildung 139: Synthese des Boc-geschützten Sulfonsäurehydrazids **147**.

Das Produkt zeigte sich mittels 2D-Dünnschichtchromatographie instabil auf Kieselgel. Bei der Verwendung von neutralem Aluminiumoxid konnte keine Separation erzielt werden. Aus der komplexen Reaktionsmischung wurde mittels CombiFlash-System über

Umkehrphase das Hydrazid **147** in einer Ausbeute von 15% isoliert. Aufgrund der Instabilität des Sulfonsäurehydrazids **147** wurden die weiteren Syntheseschritte vorerst nicht weiter verfolgt und der Fokus auf die Alkylierung der sekundären Amine **144** und **146** gelegt.

Für die Alkylierung mit 2-Brommethylphenylboronsäurepinakolester wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet (Tabelle 18). In Acetonitril wurden keine Reaktionen durchgeführt, da die TFA-Salze **144** und **146** in diesem Lösungsmittel nicht löslich waren.

Tabelle 18: Getestete Reaktionsbedingungen zur Alkylierung mit 2-Brommethylphenylboronsäure.

#	Amin	Lösungsmittel	Base	<i>T</i>	<i>t</i>	Beobachtung
1	144	MeOH	DIPEA	rt	3 d	unvollständiger Umsatz
2	144	MeOH	DIPEA	50 °C	4.5 d	unvollständiger Umsatz
3	144	DMF	DIPEA	rt	40 h	unvollständiger Umsatz
4	146	DMF	DIPEA	rt	17 h	Monomer/Dimer 7:93
5	146	DMF/H ₂ O (1:1)	DIPEA	rt	2 h	Monomer/Dimer 50:50

^a Das Verhältnis wurde über die Integrale der UV-Peaks bestimmt.

Die durchgeführten Alkylierungsversuche wurden sowohl dünnschichtchromatographisch als auch massenspektromisch mittels LC/MS verfolgt. Bei der Verwendung der Verbindung mit dem *N*-Methylethylendiamin-Spacer **144** wurde weder in Methanol noch in DMF ein vollständiger Umsatz beobachtet (Eintrag 1–3). Auch nach der Zugabe von weiterem Bromid konnte kein Fortgang der Reaktion verzeichnet werden. Die massenspektrometrischen Untersuchungen mittels LC/MS deuteten auf die Bildung des Alkylierungsproduktes **149** mit Abspaltung des Boronsäurepinakolesters sowie das Hydroxydeboronierungsprodukt **150** hin (Eintrag 2–3, Abbildung 140).

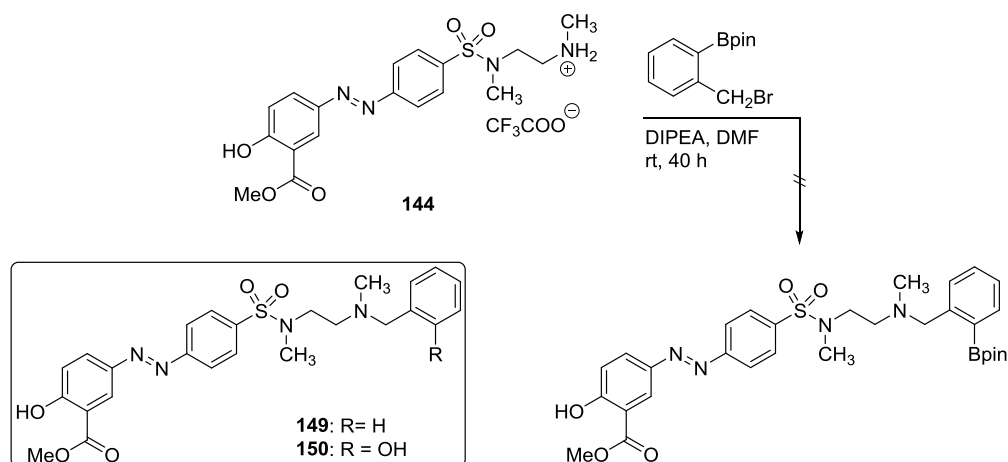


Abbildung 140: Versuch zur Alkylierung der Verbindung mit dem *N*-Methylethylendiamin-Spacer **144**.

Die Bildung von letzterem ist aber unter den Reaktionsbedingungen unwahrscheinlich, da kein Oxidationsmittel wie z.B. Wasserstoffperoxid oder *m*-Chlorperbenzoesäure eingesetzt wurde. Ein weiteres Indiz zum Verlust der Boronsäure ist ein fehlendes Signal im ^{11}B -NMR-Spektrum. Solche Protodeboronierungen sind für (Pinakol-geschützte) Phenylboronsäuren in der Literatur beschrieben,^[387] allerdings fanden diese Reaktionen unter deutlich höheren Temperaturen in DMSO (120 °C), DMF (120 °C), im sauren (150 °C) oder basischen (60 °) Medium statt.^[384, 388-390] Um zu testen, ob ein Sulfasalazin-Derivat wie das Alkylierungsprodukt **149**, das u.a. eine tertiäre Sulfonamidgruppe und einen Ethylendiamin-Spacer aufweist, in der Bindestelle von NBD- C_{12} **8** bindet, sollte der Ester **149** verseift und anschließend im Wettbewerbsexperiment mit der NBD-markierten Fettsäure **8** eingesetzt werden. Nach der Reinigung mittels CombiFlash-System über Umkehrphase wurde ein Produktgemisch erhalten, das im ^1H -NMR breite Signale zeigte und nicht identifiziert werden konnte. Die massenspektrometrische Untersuchung mittels HRMS deutete auf die beiden Salicylsäuren **151** und **152** hin.

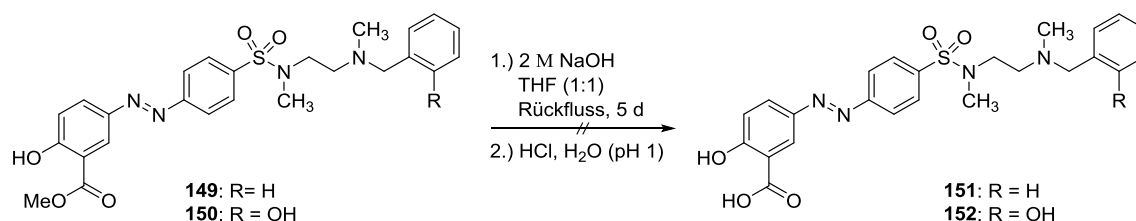


Abbildung 141: Versuch zur Verseifung des Esters **149**.

Beim Einsatz des Azofarbstoffes mit dem *N*-Methylpropylendiamin-Spacer **146** wurde bei der Alkylierung mit 2-Brommethylphenylboronsäurepinakolester in DMF die Bildung des gewünschten Produkts als Minderkomponente beobachtet (Eintrag 4, Tabelle 18). Die massenspektrometrische Untersuchung mittels LC/MS deutete allerdings auf eine dimere Verbindung **154** als Hauptkomponente (ca. 93%) hin, deren Summenformel mittels

HRMS bestätigt werden konnte. Nach der Reinigung mittels CombiFlash-System über Umkehrphase konnte die Struktur mittels 2D-NMR-Spektroskopie aufgrund sehr breiter Signale nicht bestätigt werden. Ein Wechsel des Lösungsmittels gestaltete sich in Folge von Löslichkeitsproblemen als schwierig. Ebenso führte die Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren bei höherer Temperatur (25 °C, 100 °C) zu keiner signifikanten Verbesserung der Signalbreite.

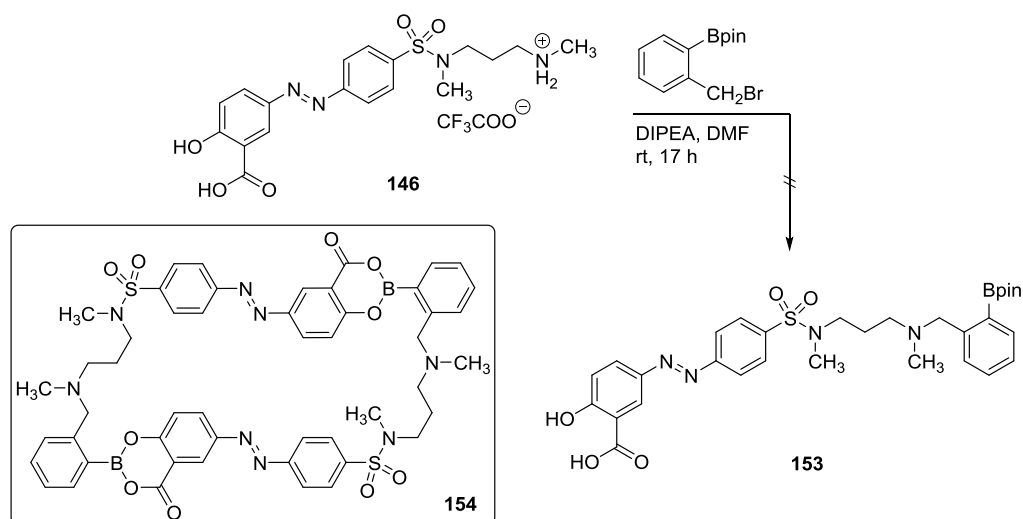


Abbildung 142: Versuch zur Synthese des Pinakol-geschützten Sulfasalazin-Derivates **153**.

Durch das Eindiffundieren von Wasser in DMSO konnten geeignete Kristalle erhalten und eine Kristallstrukturanalyse durchgeführt werden. Dabei wurde die dimere Struktur **154** bestätigt (Abbildung 143).

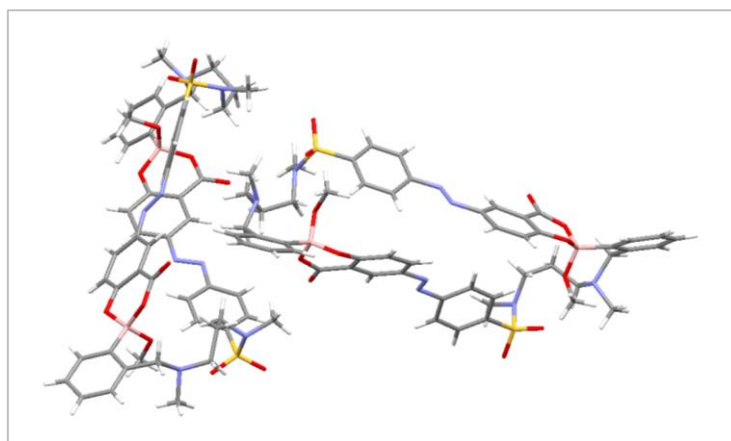


Abbildung 143: Kristallstruktur der dimeren Verbindung **154** ($\text{C}_{52}\text{H}_{56}\text{B}_2\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}_2$).

Das Strukturmotiv von β -Hydroxycarbonsäuren wurde bereits mehrfach in der Literatur^[378, 381-382, 391] zur Erkennung durch Boronsäuren untersucht. Da Salicylsäure (**32**) formal als β -Hydroxycarbonsäure aufgefasst werden kann, ist es nachvollziehbar, dass die Phenylboronsäure unter den wasserfreien Reaktionsbedingungen mit der Salicylsäure

zum Boronsäureester reagiert. Tatsächlich kann die Bildung des dimeren Produktes **154** zugunsten der monomeren Struktur **153** hin verschoben werden (ca. 50%), wenn die Alkylierung in DMF/Wasser (Verhältnis 1:1) als Lösungsmittel durchgeführt wird.

Interessanterweise konnte bei der Alkylierung des Azofarbstoffes mit dem *N*-Methylethylendiamin-Spacer **144** massenspektrometrisch mittels LC/MS keine Bildung eines Dimers beobachtet werden (siehe Abbildung 140). Dies könnte darauf beruhen, dass die Carboxylgruppe der Salicylsäure am Sulfasalazin-Derivat **144** durch einen Methylester blockiert ist. Denkbar ist aber auch, dass der Ethylendiamin-Spacer zu kurz ist und die Ringspannung für das entstehende Dimer zu groß wäre, sodass die Bildung nicht begünstigt ist.

Die Bildung der dimeren Verbindung **154** ist ein interessantes Ergebnis, das im Hinblick auf die Reversibilität untersucht wurde. Dazu wurden verschiedene Bedingungen zur Ringöffnung wie die Variation des pH-Wertes, das Lösungsmittel und die Zugabe von diversen Zuckern, einer α -Hydroxycarbonsäure sowie von Glycerol bei einer konstanten Temperatur von 20 °C getestet (Tabelle 19). Die Konzentrationen der Zuckerlösungen wurden ausgehend von der Nüchtern-Plasmaglukose bei gesunden Menschen (≤ 5.4 mM)^[349] und Diabetes-Patienten (≥ 7 mM)^[352] gewählt. Bei dem Anfangswert ($t = 0$ min) lag der Anteil der monomeren Verbindung bei ca. 7%.

Tabelle 19: Getestete Bedingungen zur Ringöffnung des Dimers **154**.

#	Bedingungen	Anteil Monomer 2 d (%)	Anteil Monomer 7 d (%)	Anteil Monomer 14 d (%)
1	MeOH	25.9	(11.9)	-
2	Wasser (pH 10–11)	Ringöffnung + Deboronierung	-	-
3	Wasser (pH 3)	15.4	37.9	35.5
4	10 mM L-Milchsäure	15.0	25.1	40.3
5	10 mM D-Fructose	47.9	57.8	53.0
6	1 mM Glycerol	21.2	(17.7)	50.8
7	5 mM Glycerol	38.6	(21.0)	62.0
8	10 mM Glycerol	53.8	38.3	14.0
9	1 mM D-Glucose	14.7	15.2	45.4
10	5 mM D-Glucose	15.2	17.3	43.8
11	10 mM D-Glucose	17.7	17.4	55.3

Der Anteil an monomerer Verbindung wurde mittels LC/MS über die Integrale der UV-Peaks bestimmt.

Aufgrund der geringen Substanzmenge an Dimer **154** konnten die Versuche zur Ringöffnung mit L-Milchsäure und D-Fructose nur bei einer Konzentration von 10 mM durchgeführt werden. Der 2-Wochenwert in Methanol konnte daher ebenfalls nicht bestimmt werden. Beim Suspendieren in Methanol stieg nach zwei Tagen der Anteil an Monomer um den fast 4-fachen Wert an (Eintrag 1). Der Wert nach 14 Tagen ist vermutlich auf einen Messfehler zurückzuführen. Unter basischen Bedingungen fand die Ringöffnung des Dimers **154** statt, allerdings kam es zusätzlich zu einer Abspaltung des Boratoms (Eintrag 2). Auch unter sauren Bedingungen, in Milchsäure-, Glycerol- und Glucoselösungen kann eine Zunahme der monomeren Verbindung beobachtet werden. Insgesamt scheint die Ringöffnung von Verbindung **154** in 10 mM Glucose, 10 mM Fructose und 10 mM Glycerol am vielversprechendsten zu sein (Einträge 5, 7, 11). Dennoch muss angemerkt werden, dass unklar ist, warum der Anteil an monomerer Substanz nach sieben bzw. 14 Tagen teilweise sinkt. Daher steht in weiteren Arbeiten die Validierung der Experimente zur Ringöffnung an. Gleichzeitig wäre auch eine Untersuchung unter physiologischen Bedingungen (37 °C) interessant.

Da das Dimer **154** durch D-Fructose gespalten werden kann, wurde zum Nachweis des Spaltproduktes ein Kristallisationsansatz in einer 0.4 mM D-Fructose-Lösung in Methanol vorbereitet. Unter diesen Bedingungen wurden jedoch keine Kristalle erhalten.

4. Zusammenfassung und Ausblick

In Vorarbeiten^[319-320, 326] wurde die NBD-markierte Fettsäure **8** (Abbildung 14) als spezifischer, fluoreszierender Binder für eine hochaffine Fettsäurebindestelle an HSA beschrieben.

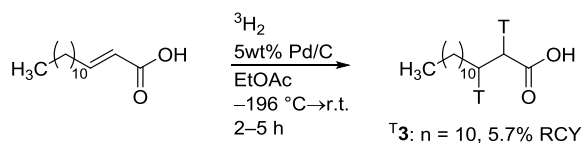
Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Evaluierung der Ergebnisse Titrations- und Konkurrenzexperimente, Gleichgewichtsdialysen und *Job*-Plots durchgeführt. Die Dissoziationskonstante (Tabelle 20), die 1:1-Bindungsstöchiometrie im NBD-C₁₂-**8**/HSA-Komplex und die Notwendigkeit einer Carboxylgruppe zur Bindung in der untersuchten Bindetasche (siehe Abbildung 22B) wurden bestätigt. In Konkurrenzexperimenten wurde natürlich vorkommende Laurinsäure (**28**) als weiterer Binder (K_1 (**28**) = $9.9 \pm 1.8 \mu\text{M}$) für die hochaffine Fettsäurebindestelle identifiziert.

Tabelle 20: Berechnete K_D -Werte von NBD-C₁₂ **8**.

<i>c</i> (HSA)	K_D (Fluoreszenztitration)	K_D (Gleichgewichtsdialyse)
25 μM ^[326]	11.6 μM ^a	-
25 μM ^[320]	12.9 μM ^a	-
12.5 μM	$27.4 \pm 2.2 \mu\text{M}$	$13.8 \pm 6 \mu\text{M}$
25 μM	$21.6 \pm 2.9 \mu\text{M}$	$32.2 \pm 10.9 \mu\text{M}$

^a Die K_D -Werte wurden in (eigenen) Vorarbeiten bestimmt.

Um den Einfluss des NBD-Labels auf die Bindung von Myristinsäure (**3**) an HSA zu quantifizieren, wurde [2,3-³H₂]-Myristinsäure (**^T3**) in zwei verschiedenen Konzentrationen (12.5 μM und 25 μM) in radioaktiven Gleichgewichtsdialysen mit HSA eingesetzt. [2,3-³H₂]-Myristinsäure (**^T3**) war durch Hydrierung von (2*E*)-Tetradecen-2-säure mit Tritiumgas zugänglich (Abbildung 144). Ein Vergleich der K_D -Werte von NBD-C₁₂ **8** und [2,3-³H₂]-Myristinsäure (**^T3**) (K_D (12.5 μM) = $0.94 \pm 0.12 \mu\text{M}$, K_D (25 μM) = $1.47 \pm 0.29 \mu\text{M}$) führte zu dem Ergebnis, dass die Einführung des NBD-Labels die spezifische Bindung von Myristinsäure (**3**) nicht verhindert, die Affinität allerdings um ungefähr den Faktor 20 reduziert.



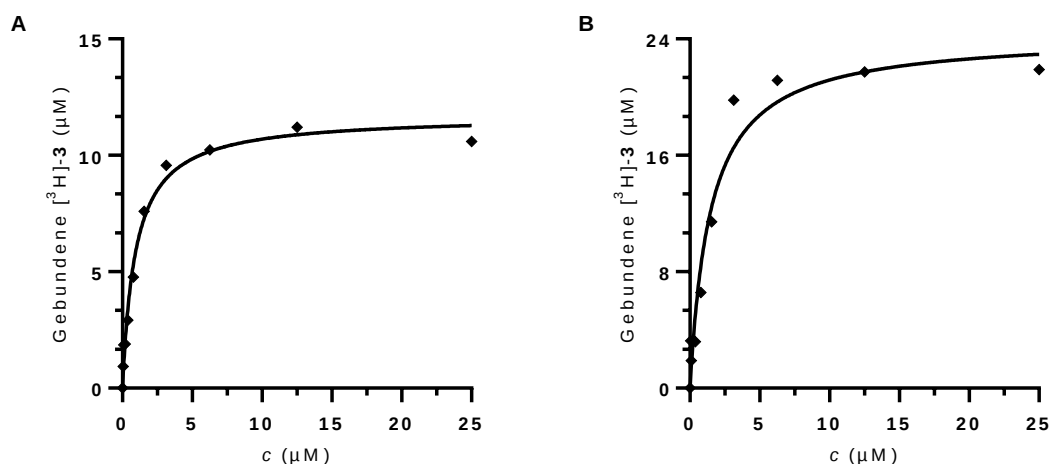


Abbildung 144: Synthese von $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Myristinsäure (T3) und radioaktive Gleichgewichtsdialysen (Anteil gebundener C_{14} -Fettsäure T3 mit steigender HSA-Konzentration): A) $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Myristinsäure (T3) ($12.5 \mu\text{M}$). B) $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ -Myristinsäure (T3) ($25 \mu\text{M}$).

In eigenen Arbeiten^[326] wurden in Konkurrenzexperimenten Hinweise auf die Bindetasche von NBD- C_{12} **8** erhalten. Während Sulfasalazin^[136] (**6**) als Sudlow-Site I-Binder die NBD-markierte Fettsäure **8** verdrängte, zeigte sich der bekannte Sudlow-Site I-Binder Warfarin^[1] (**2**) nicht kompetitiv. Zur Überprüfung einer möglichen Coexistenz von Warfarin (**2**) und NBD- C_{12} **8** in Sudlow-Site I wurden Titrationsexperimente mit Warfarin (**2**) inkubierter HSA sowie verschiedene FRET-Experimente durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Bindung von NBD- C_{12} **8** nicht durch bereits gebundenes Warfarin (**2**) beeinflusst wird (K_D (Warfarin-(**2**)/HSA) = $23.5 \pm 4.3 \mu\text{M}$) und ein FRET zwischen dem Fluorophor von NBD- C_{12} **8** und der Aminosäure Trp-214 von HSA stattfindet (Abbildung 145).

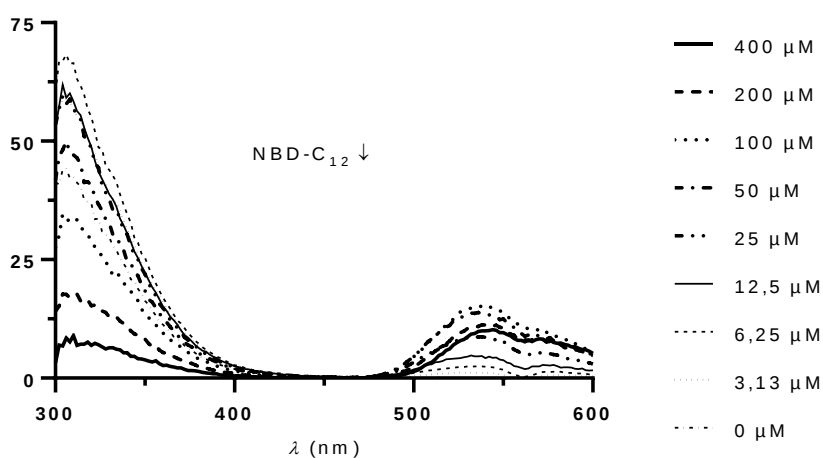


Abbildung 145: Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) von HSA ($25 \mu\text{M}$) mit zunehmender Konzentration an NBD- C_{12} **8** ($0\text{--}400 \mu\text{M}$).

Da ein FRET^[335] nur zwischen einem Donor und Akzeptor in enger Nachbarschaft zueinander erfolgen kann, erschien Sudlow-Site I als Bindestelle von NBD-C₁₂ **8** sehr wahrscheinlich. Die Cokristallisationsansätze mit fettfreier HSA (Fettsäuregehalt: $\leq 0.02\%$) waren nicht erfolgreich. Aufgrund des Ergebnisses aus dem Konkurrenzexperiment, das die Verdrängung der NBD-markierten Fettsäure **8** durch Myristinsäure (**3**) zeigt (siehe Abbildung 22A), folgte die Schlussfolgerung, dass nur der Einsatz essentiell fettfreier HSA (Fettsäuregehalt: $\leq 0.007\%$) zum Erfolg führen kann. Mit dem Hanging-Drop-Verfahren^[261] kombiniert mit Streak Seeding^[337] wurden Cokristalle von NBD-C₁₂ **8** und HSA erhalten und die Kristallstruktur bestimmt.

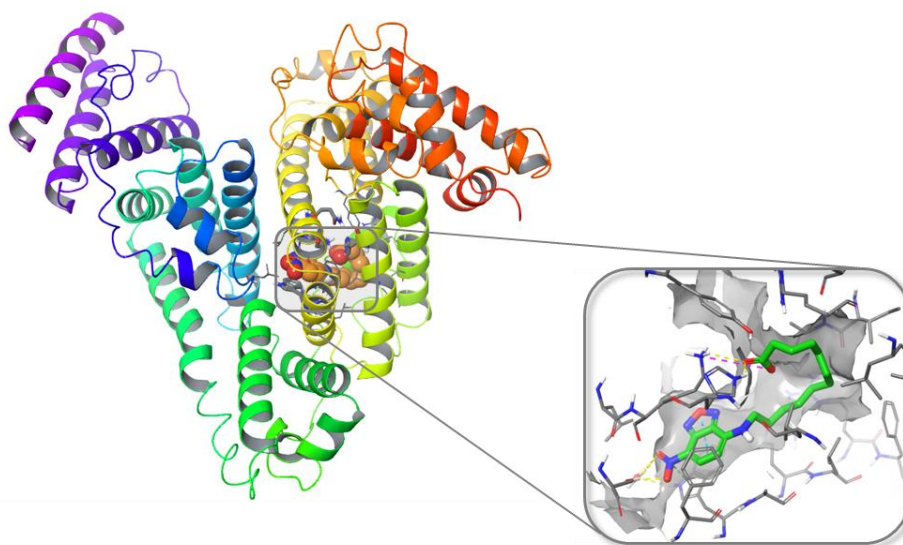


Abbildung 146: Röntgencokristallstruktur von NBD-C₁₂ **8** kokristallisiert mit essentiell fettfreier HSA (PDB^[46] Code: 6ezq^[239], Auflösung 3.0 Å).^[239]

In der neuen Cokristallstruktur von HSA liegt nur ein Molekül NBD-C₁₂ **8** gebunden in einer Sub-Site von Subdomäne IIA (Sudlow-Site I) vor, sodass die NBD-markierte Fettsäure **8** als hochaffiner, spezifischer Binder für diese Bindestelle klassifiziert werden kann. Die Interaktion von NBD-C₁₂ **8** mit den Aminosäuren Lys-199 und His-242 erklärt, warum eine Carboxylgruppe Voraussetzung für die Bindung in dieser Bindestelle ist. Weitere Cokristallisationsansätze zum Nachweis der Coexistenz von NBD-C₁₂ **8**, Sulfasalazin (**6**) oder Balsalazid (**22**) mit Warfarin (**2**) wurden präpariert, allerdings wurden keine Kristalle erhalten. Die erfolgreiche Cokristallisation einer dieser Ligand-Kombinationen mit HSA könnte Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

Zur Untersuchung der neu identifizierten Bindestelle an HSA auf Struktureinheiten, die für die Bindung von Substanzen des Sulfasalazin-Typs essentiell sind, wurden verschiedene Sulfasalazin-Grundkörper **33–36**, **38**, **40**, **41** und **47** synthetisiert (Abbildung 147).

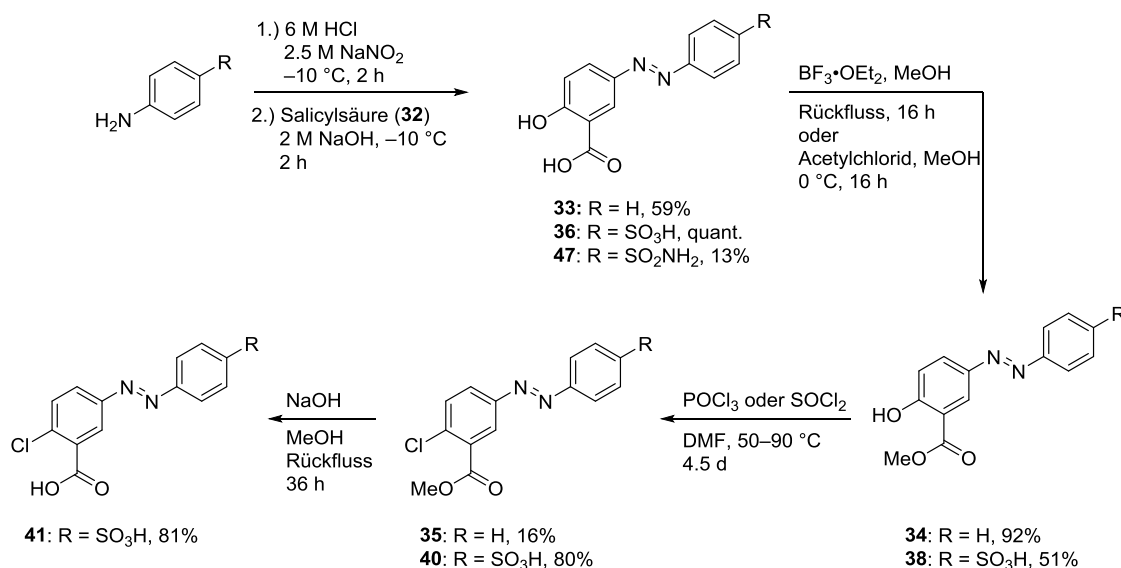


Abbildung 147: Synthese der Sulfasalazin-Grundkörper **33–36**, **38**, **40**, **41** und **47**.

Die Konkurrenzexperimente von NBD-C₁₂-**8**/HSA mit den Sulfasalazin-Grundkörpern **33–35** führten zu der Vermutung, dass die Salicylsäure allein nicht für die Bindung in der Bindetasche von NBD-C₁₂ **8** ausreicht. Die Einführung einer Sulfonylgruppe (Derivate **36** und **38**) führte zur Verdrängung der NBD-markierten Fettsäure **8**. Da nach Substitution der phenolischen OH-Gruppe durch ein Chloratom keine Konkurrenz zu beobachten war, folgte die Schlussfolgerung, dass zur Bindung von Substanzen des Sulfasalazin-Typs die phenolische OH-Gruppe sowie ein Akzeptor (z.B. –SO₂–R) notwendig sind. Zur weiteren Unterstützung dieser Hypothese könnte in weiteren Arbeiten 4-[(E)-(4-Hydroxyphenyl)diazenyl]benzolsulfonsäure im Konkurrenzexperiment getestet werden, um auch die Bedeutung der Methoxycarbonyl-Gruppe des Sulfasalazin-Derivats **38** näher zu untersuchen.

Um den räumlichen Anspruch und die Toleranz funktioneller Gruppen zu untersuchen, wurden *N*-Alkyl und *N*-Aryl substituierte Sulfasalazin-Derivate **71–88** synthetisiert. Zur Synthese dieser Verbindungen **71–88** wurden die entsprechenden Sulfonamide **155**, die durch Chlorierung und anschließende Alkylierung von Sulfanilsäure (**37**) zugänglich waren, nach Diazotierung mit Salicylsäure (**32**) in einer Azokupplung umgesetzt (Abbildung 148).

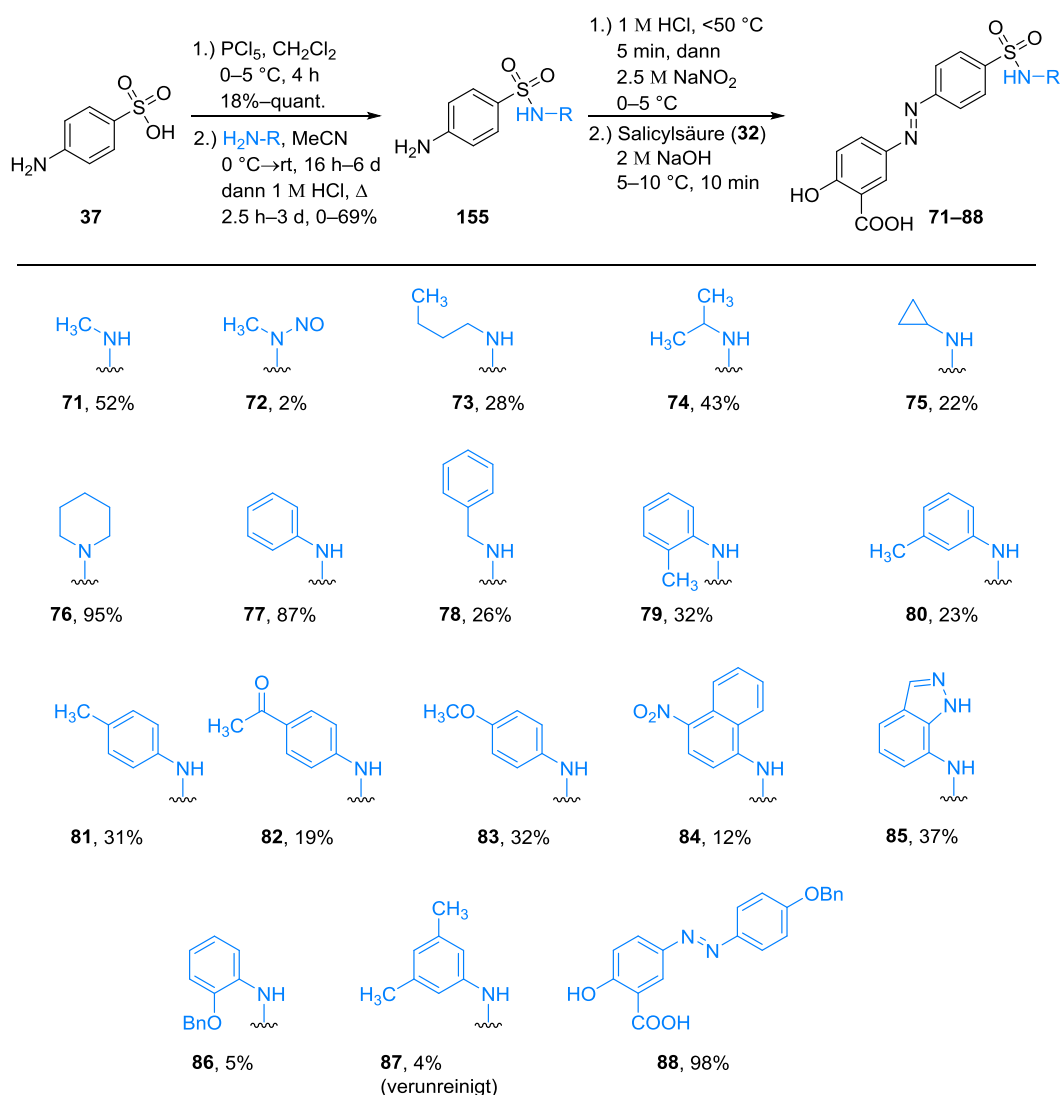


Abbildung 148: Synthetisierte Sulfasalazin-Derivate **71–88**.

Durch die Spaltung des Arylmethylethers **83** nach Zugabe von Bortribromid wurde der *N*-(4-Hydroxyphenyl) substituierte Azofarbstoff **89** in einer Ausbeute von 69% erhalten. Die in Konkurrenzexperimenten eingesetzten *N*-Alkyl und *N*-Aryl substituierten Sulfasalazin-Derivate sowie die Sulfasalazin-Grundkörper wurden nach ihrer Bindungsaffinität klassifiziert (Abbildung 149). Interessant war hierbei, dass die größte Affinität sowohl bei Sulfasalazin-Derivaten mit kurzkettigen (verzweigten) Alkylsubstituenten (**71** und **75**) als auch räumlich anspruchsvollen Resten (**82** und **84**) zu beobachten war. In zukünftigen Arbeiten könnte die Substitution der Azogruppe durch eine Ethylengruppe oder Aryl-Aryl-Bindung interessant sein, um bspw. die Auswirkungen freier Drehbarkeit auf die Bindung an HSA zu untersuchen.

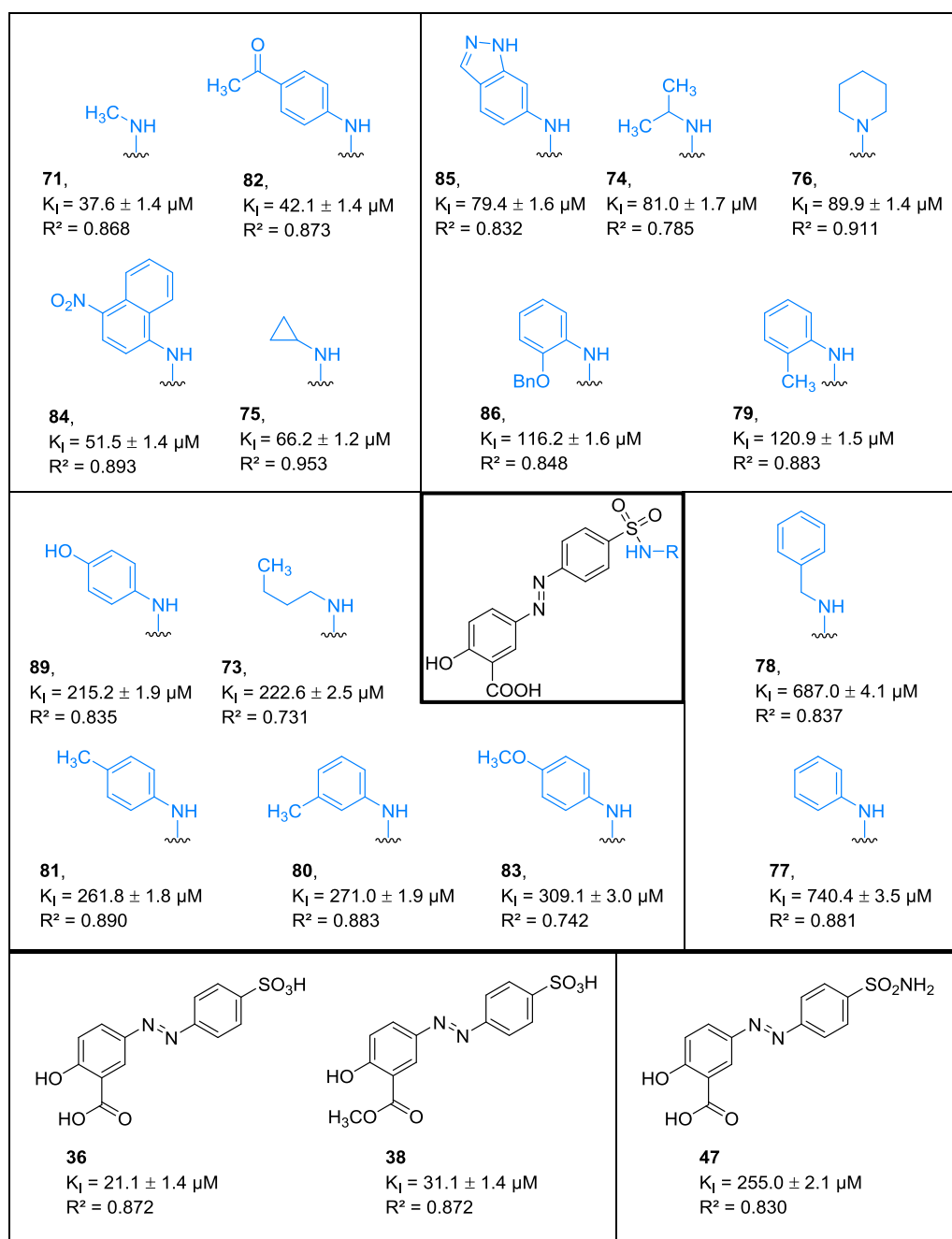


Abbildung 149: Klassifizierung der bindenden Sulfasalazin-Grundkörper sowie der N-Alkyl und N-Aryl substituierten Azofarbstoffe nach ihrer Bindungsaffinität (K_I -Wert) für die neu identifizierte Bindestelle an HSA.

Die Identifizierung der Bindestelle von NBD- C_{12} **8** sollte die Entwicklung eines trichromatischen Kompetitionsassays nach dem Vorbild des bichromatischen Assays von Chang^[181] ermöglichen. Dazu wurde zuerst das 4-Propyloxy-BODIPY **23**, das von Chang als Sudlow-Site II-Binder verwendet wurde, synthetisiert und die Eignung dieses BODIPY-Farbstoffes **23** als spezifischer Sudlow-Site II-Marker evaluiert. Nach Bestätigung der von Chang publizierten Ergebnisse bzgl. Dissoziationskonstante, Bindungsstöchiometrie und Bindestelle wurden die BODIPY-Derivate **99–102** und

synthetisiert. Die BODIPY-Farbstoffe **99–102** wurden durch Kondensation aromatischer Aldehyde mit dem BODIPY-Grundkörper **91**, der ausgehend von 2,4-Dimethylpyrrol (**92**) und Pyrrol-2-carbaldehyd (**93**) zugänglich war, in Ausbeuten von bis zu 81% erhalten.

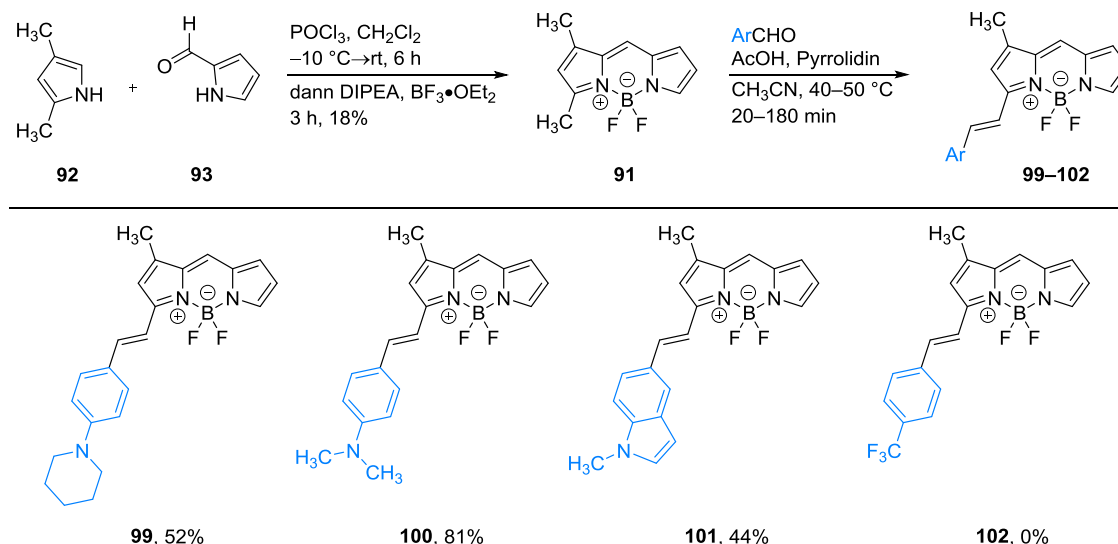


Abbildung 150: Synthese der BODIPY-Derivate **99–102**.

Alle drei BODIPY-Farbstoffe **99–101** erfüllten die Voraussetzungen, um als spezifischer Sudlow-Site II-Marker in Konkurrenzexperimenten eingesetzt zu werden. Unter Berücksichtigung der Anregungs- und Emissionswellenlängen von NBD- C_{12} **8** und der effizienteren sowie kostengünstigeren Synthese wurde das Dimethylamino-BODIPY **100** als Marker für Sudlow-Site II gewählt. Nach Validierung des Assays mit dem Dimethylamino-BODIPY **100** wurde nach einem spezifischen, fluoreszierenden Binder für Sudlow-Site I gesucht. Nach Studien von *Miranda*^[204] bindet die NBD-markierte Gallensäure **24** in Sudlow-Site I. Da dies in eigenen Arbeiten^[326] bestätigt werden konnte, wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Marina BlueTM, Pacific BlueTM, Badan, Acrylodan, Dapoxyl[®] succinimidylester und (7-Hydroxy-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)essigsäure (siehe Abbildung 15) auf eine mögliche solvatochrome Eigenschaft hin untersucht. Der Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von HSA war bei Badan, Acrylodan und Dapoxyl[®] succinimidylester zu beobachten, allerdings wurde unter den getesteten Reaktionsbedingungen zur Markierung der Gallensäure **106** und **107** kein Produkt erhalten. Warfarin (**2**) wurde bereits von mehreren Gruppen^[118, 168, 235] als Sudlow-Site I-Marker verwendet. Die Anwendbarkeit des Arzneistoffes **2** konnte bestätigt werden, jedoch war bei der Anregungswellenlänge des Dimethylamino-BODIPYs **100** eine deutliche Fluoreszenz von Warfarin (**2**) zu beobachten. Um Interferenzen zwischen den

Farbstoffen zu minimieren, wurden daher die Warfarin-Derivate **112–114** synthetisiert. Zuerst wurden verschiedene Benzaldehyde **108a–c** mit Aceton zu den α,β -ungesättigten Ketonen **109–111** in Ausbeuten von 71–83% umgesetzt (Abbildung 151). Durch die anschließende *Michael*-Addition mit 4-Hydroxycumarin wurden die Warfarin-Derivate **112–114** nach Zugabe von L-Prolin erfolgreich erhalten.

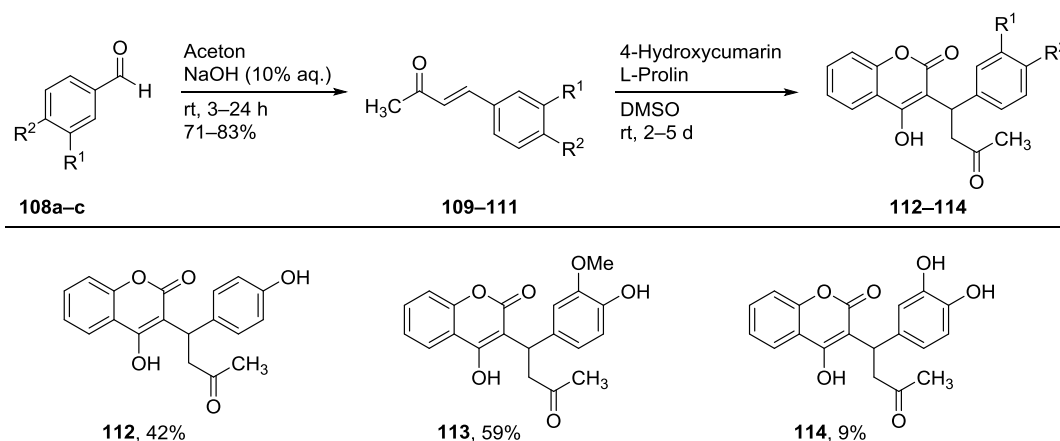


Abbildung 151: Synthese der Warfarin-Derivate **112–114**.

Die drei Warfarin-Derivate **112–114** erfüllten die Voraussetzungen, um in Konkurrenzexperimenten als spezifischer Sudlow-Site I-Marker eingesetzt zu werden. Bei Verwendung des 4-Hydroxywarfarins **112** wurde in den Experimenten das beste Signal-Rausch-Verhältnis erzielt, sodass dieses Warfarin-Derivat **112** als spezifischer Sudlow-Site I-Marker gewählt wurde. In den Cokristallisationsansätzen von HSA mit dem neuen Sudlow-Site I-Marker **112** wurden unter den getesteten Bedingungen keine Kristalle erhalten. Dennoch konnte die Validierung des Assays mit dem 4-Hydroxywarfarin **112** erfolgreich durchgeführt werden. Zwischen den Farbstoffen NBD- C_{12} **8**, Warfarin (**2**) und Dimethylamino-BODIPY **100** wurden keine Interferenzen beobachtet. Um die Kompatibilität dieser drei Farbstoffe zu veranschaulichen, wurden die Absorptionsspektren gemeinsam in Abbildung 152A dargestellt und die ausgewählten Anregungswellenlängen für den trichromatischen Assay eingezeichnet. Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Spektralbereiche, die der einzelne Farbstoff jeweils bedient, sind die normierten Fluoreszenzspektren in Abbildung 152B gezeigt. Die im Assay verwendeten Emissionswellenlängen sind markiert.

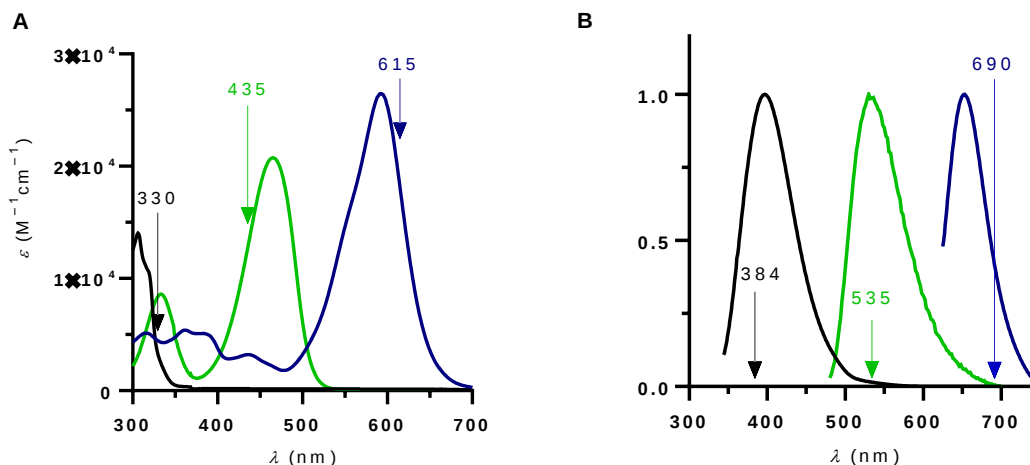


Abbildung 152: A) Absorptionsspektren von 4-Hydroxywarfarin **112** (schwarz), NBD- C_{12} **8** (grün) und Dimethylamino-BODIPY **100** (blau). Die eingezeichneten Anregungswellenlängen sind in nm angegeben. B) Fluoreszenzspektren von 4-Hydroxywarfarin **112** (schwarz, $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$), NBD- C_{12} **8** (grün, $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$) und Dimethylamino-BODIPY **100** (blau, $\lambda_{\text{exc}} = 615 \text{ nm}$) (normiert in EtOH). Die eingezeichneten Emissionswellenlängen sind in nm angegeben.

Somit war die Voraussetzung gegeben, um die drei Farbstoffe in einem Bindeassay zu kombinieren. Zur Validierung des trichromatischen Wettbewerbsassays wurden Iophenoxinsäure (**5**), Ibuprofen (**4**) und Myristinsäure (**3**) als bekannte Binder für je eine dieser Bindestellen eingesetzt. Die jeweiligen Wettbewerbskurven zeigen zu den monochromatischen Assays vergleichbare Daten (Abbildung 153A–C). Zusätzlich sind die Daten im Wettbewerbsexperiment mit Sulfasalazin (**6**) gezeigt, da dieser Arzneistoff **6** mit hoher Affinität kompetitiv zum 4-Hydroxywarfarin **112** sowie zur NBD-markierten Fettsäure **8** ist (Abbildung 153D). Im Vergleich zu den entsprechenden monochromatischen Assays waren die getesteten Verbindungen erst bei höheren Konzentrationen kompetitiv. Trotzdem ist es gelungen, einen trichromatischen Wettbewerbsassay an HSA zu entwickeln, der es ermöglicht, Testsubstanzen simultan in drei Bindestellen an HSA zu untersuchen. Die genaue Affinität für eine spezifische Bindestelle kann dann mit Hilfe des monochromatischen Assays bestimmt werden.

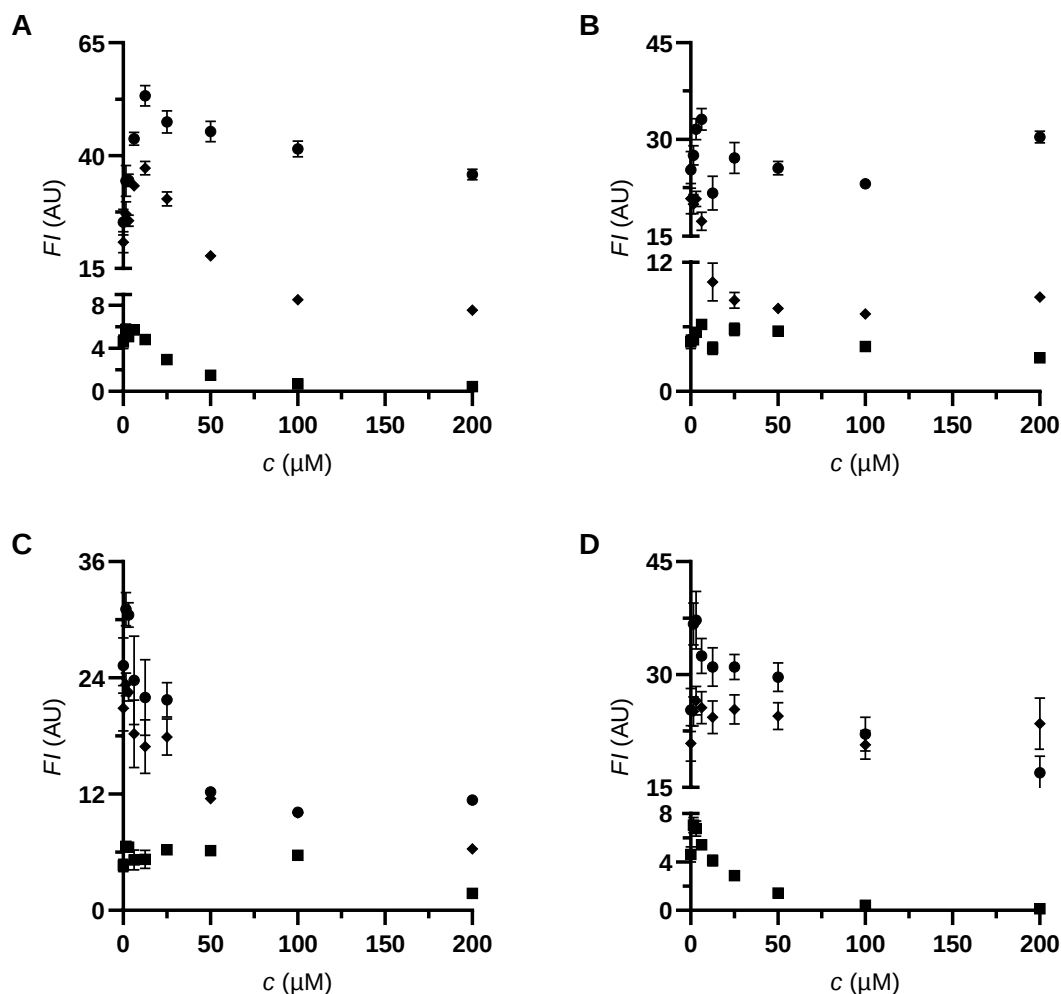


Abbildung 153: Konkurrenzexperimente von NBD- C_{12} -8/4-Hydroxywarfarin-112/Dimethyl-amino-BODIPY-100/HSA. ● NBD- C_{12} 8. ◆ 4-Hydroxywarfarin. ■ Dimethylamino-BODIPY-100/HSA: A) Iphenoxinsäure (5). B) Ibuprofen (4). C) Myristinsäure (3). D) Sulfasalazin (6).

Die entwickelten monochromatischen Konkurrenzassays mit den neuen Sudlow-Site I und Sudlow-Site II-Markern **112** und **100** wurden zur Untersuchung der Sulfasalazin-Derivate, die für die Struktur-Affinitätsbeziehungen synthetisiert worden waren, angewendet. Da die Sulfasalazin-Derivate **33–35**, **40**, **41**, **77** und **78** nicht kompetitiv zu NBD- C_{12} **8** waren, wurden diese getestet, um erste Hinweise auf den primären Bindungsort zu erhalten. Die weiteren Sulfasalazin-Derivate **36**, **38**, **47**, **71**, **73–76**, **79–86** und **89** wurden auf mögliche sekundäre Bindestellen untersucht. Unter Berücksichtigung der Daten aus allen Konkurrenzexperimenten wurde kein Sulfasalazin-Derivat identifiziert, das nur spezifisch in der Bindetasche von NBD- C_{12} **8** bindet. Die beiden Sulfasalazin-Derivate **82** und **38** binden bemerkenswerterweise in allen drei untersuchten Bindestellen mit hoher Affinität. Des Weiteren wurden acht Sulfasalazin-Derivate (**71**,

74, 75, 81, 83, 85, 86 und 89) identifiziert, die ähnlich wie Sulfasalazin (6) sowohl in Sudlow-Site I als auch in der Bindestelle von NBD-C₁₂ 8 binden.

In eigenen Arbeiten^[326] wurden Fettsäurederivate 10–21 mit einem Arylring an verschiedenen Positionen der homologen Kette (siehe Abbildung 119) synthetisiert, um durch eine Fixierung der Konformation die Bindungsaffinität von Myristinsäure (3) zu erhöhen. Da sich keines dieser Fettsäurederivate 10–21 kompetitiv zur NBD-markierten Fettsäure 8 zeigte, konnte so die Bindestelle nicht identifiziert werden. Interessant war hierbei, dass die Einführung von Rigidität an unterschiedlichen Positionen der homologen Alkylkette die Bindung in der ursprünglichen Bindetasche verhinderte. Um möglicherweise eine andere Bindestelle für die Fettsäurederivate 10, 12–21 zu identifizieren, wurden diese Substanzen ebenfalls in den monochromatischen Assays getestet. Die Konkurrenzexperimente mit dem 4-Hydroxywarfarin 112 und dem Dimethylamino-BODIPY 100 führten zu dem Ergebnis, dass bis auf die *ortho*-substituierte Zimtsäure 13 alle Fettsäurederivate 10, 12, 14–21 auf Sudlow-Site II als primäre Bindestelle ausweichen. Dieses Ergebnis wird durch Literaturdaten, wonach Sudlow-Site II vorwiegend aromatische Moleküle mit peripher gelegener Carboxylgruppe bindet, unterstützt.^[4, 9, 11, 23, 100] Die Bindetasche des Fettsäurederivates 13 blieb unbekannt.

In der neuen Kristallstruktur von NBD-C₁₂ 8 kokristallisiert mit HSA ist die Aminosäure Lys-199 maßgeblich an der Bindung der Fettsäure 8 beteiligt (siehe Abbildung 36). Diese Aminosäure, die auch bei der Bindung von Sulfasalazin (6) eine wichtige Rolle spielt, gehört zu einer Gruppe von Lysinen, die unter physiologischen Bedingungen glykiert^[346-348] werden können. In der Literatur^[1, 23, 368] wird glykierte HSA bereits lange als alternativer Biomarker zu HbA1c diskutiert, eine Methode zur direkten Bestimmung von glykiertem Lys-199 ist jedoch nicht beschrieben.

Um die Hypothese, dass Lys-199 maßgeblich an der Bindung von NBD-C₁₂ 8 beteiligt ist, zu überprüfen, wurden Sättigungsexperimente mit NBD-C₁₂ 8 an glykierter HSA durchgeführt. Dazu wurde HSA zuerst mit einer Glucoselösung (166 mM) über verschiedene Zeiträume (1 Tag, 1 Woche, 1 Monat) inkubiert und nach Reinigung in Sättigungsexperimenten eingesetzt. Eine Strukturveränderung von HSA infolge der Glykierung sollte durch die verschiedenen Glykierungszeiten anhand des veränderten K_D-Wertes von NBD-C₁₂ 8 zu erkennen sein. Die Sättigungsexperimente mit NBD-C₁₂ 8 an HSA wiesen nach den verschiedenen Glykierungszeiten auf strukturelle Veränderungen

von HSA hin. In den Titrationskurven war eine Sättigung zu beobachten, der K_D -Wert stieg allerdings nach bspw. einem Monat Inkubationszeit um über 200% an (K_D (1 Monat) = $47.8 \pm 7.4 \mu\text{M}$). Da Lys-199 durch die Interaktion mit der Sulfonylgruppe direkt an der Bindung von Sulfasalazin (**6**) beteiligt ist, wurde versucht, Boronsäure-funktionalisierte Sulfasalazin-Derivate zu synthetisieren, die den Glucoserest an diesem Lysin erkennen können. Ausgehend von *N,N'*-Dimethylalkylendiaminen wurden die Sulfonamide **140–142** in drei Stufen dargestellt (Abbildung 154). Nach Diazotierung und anschließender Azokupplung mit Salicylsäure (**32**) bzw. Salicylsäuremethylester (**39**) wurden die Sulfasalazin-Derivate **143** und **145** erhalten. Die anschließende Boc-Abspaltung und Alkylierung führten nicht zum gewünschten Produkt.

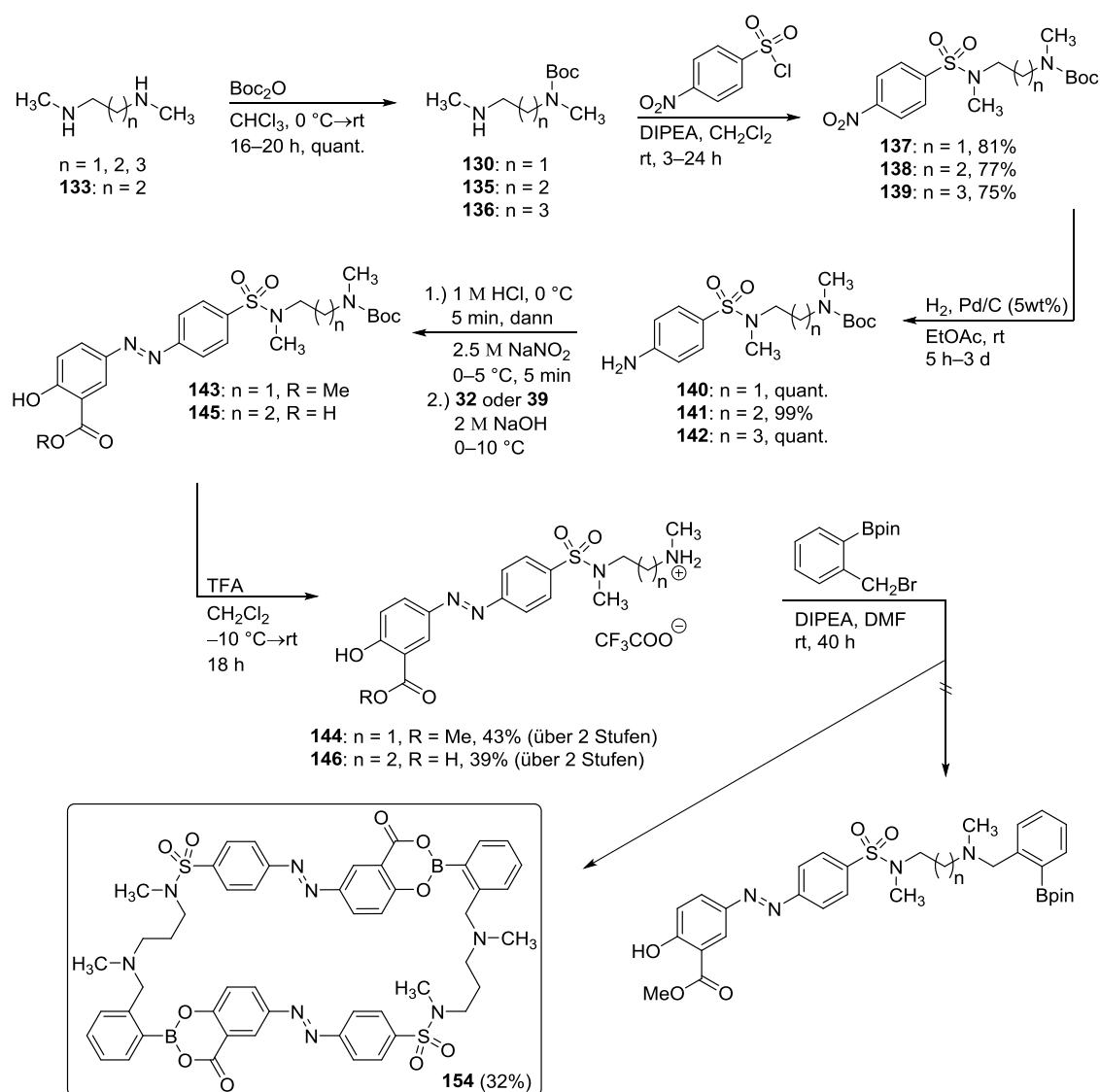


Abbildung 154: Versuche zur Synthese Boronsäure-funktionalisierter Sulfasalazin-Derivate.

Ausgehend von dem Propylendiamin-Derivat **146** wurde das Dimer **154** erhalten, dessen Struktur mittels Kristallstrukturanalyse bestätigt wurde. Durch Inkubation des Dimers **154** mit verschiedenen Reagenzlösungen bei 20 °C wurde die Dimerbildung auf eine mögliche Reversibilität untersucht. Ersten Daten zufolge scheint die Ringöffnung der dimeren Verbindung **154** in 10 mM Glucose, 10 mM Fructose und 10 mM Glycerol am vielversprechendsten zu sein.

In weiteren Arbeiten könnten die Experimente zur Ringöffnung validiert und um physiologische Bedingungen erweitert werden. Die Untersuchung der Öffnung des Dimers **154** unter physiologischen Bedingungen könnte interessant sein, um die modifizierte, dimere Verbindung **154** als Host für leicht metabolisierbare Wirkstoffe zu nutzen oder gebundene Prodrugs bspw. in Abhängigkeit von der Plasmaglukosekonzentration freizusetzen.

Zusätzlich könnte in weiteren Arbeiten die Dimerbildung in Abhängigkeit von der Spacerlänge durch die Alkylierung des Ethylendiamin- sowie Butylendiamin-Derivates untersucht werden, um die Größe des Makrozyklus variieren zu können.

5. Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines, Messgeräte und Methoden—synthetischer Teil

5.1.1 Allgemeines

Bei Reaktionsführungen unter Luft- und/oder Feuchtigkeitsausschluss wurde unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) gearbeitet und zuvor ausgeheizte Glasgeräte verwendet. Zur Entfernung von Lösungsmitteln wurde ein Rotationsverdampfer mit Membranpumpenvakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C eingesetzt. Letzte Spuren von Lösungsmitteln in hochsiedenden Flüssigkeiten und Feststoffen wurden im Hochvakuum entfernt. Die aufgeführten Molmassen beziehen sich bei eckigen Klammern [] auf die Massen der häufigsten Isotope ^1H , ^{11}B , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{19}F , ^{23}Na , ^{32}S , ^{35}Cl , ^{79}Br und bei runden Klammern () auf die natürliche Isotopenverteilung.

5.1.2 Reagenzien und Lösungsmittel

Alle eingesetzten Chemikalien wurden kommerziell von Anbietern bezogen und – wenn nicht explizit angegeben – ohne vorherige Reinigung verwendet. Die in Reaktionen verwendeten Lösungsmittel wurden – wenn nicht explizit angegeben – mit dem Reinheitsgrad p.a., *pro analysi*, eingesetzt. Die Lösungsmittel wurden nach etablierten Methoden getrocknet, frisch destilliert und sofort eingesetzt:^[392]

- Dichlormethan: Calciumhydrid
- Tetrahydrofuran: Kalium, Benzophenon

N,N-Dimethylformamid (99.8%, *Extra Dry over Molecular Sieve, Acros Seal*®), Tetrahydrofuran (99.5%, *Extra Dry over Molecular Sieve, Acros Seal*®) und Acetonitril (99.9%, *Extra Dry over Molecular Sieve, Acros Seal*®) wurden von der Firma *Acros Organics* bezogen.

Lösungsmittel für die Säulenchromatographie (Cyclohexan und Ethylacetat) wurden in technischer Qualität bezogen und vor dem Gebrauch destillativ gereinigt. *n*-Hexan, *n*-Heptan, Methanol sowie Ethanol wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

5.1.3 Dünnschicht- und Flashchromatographie

Reaktionskontrollen wurden mittels Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel beschichteten Aluminiumplatten der Firmen *Sorbent Technologies* (Typ u/W254) und

Merck (Typ 60 F₂₅₄) durchgeführt. Aluminiumoxid beschichtete Polyesterplatten von der Firma *Sorbent Technologies* (Neutral, Typ u/W254) wurden alternativ verwendet. Die Detektion wurde unter Verwendung von UV-Licht bei den Wellenlängen $\lambda = 254$ nm, $\lambda = 302$ nm und $\lambda = 365$ nm durchgeführt. Die aufgeführten Laufmittelverhältnisse beziehen sich auf Volumenanteile. Folgende Reagenzien wurden zum Anfärben eingesetzt:

- Bromkresolgrün: 0.1 g Bromkresolgrün, 0.3 mL 2 M NaOH, 500 mL Isopropanol
- Dinitrophenylhydrazin-Lösung: 1.0 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin, 25 mL Ethanol (ketonfrei), 8 mL Wasser, 5 mL Schwefelsäure
- Ninhydrin: 0.3 g Ninhydrin, 2 mL Eisessig, 100 mL Methanol
- *Seebach*-Reagenz: 1.0 g Cer(IV)sulfat (Tetrahydrat), 2.5 g Molybdatophosphorsäure, 4 mL konz. Schwefelsäure, 96 mL Wasser

Nach dem Eintauchen in das Anfärbereagenz wurde das Chromatogramm mit einem Heißluftgebläse entwickelt.

Zur Reinigung der Rohprodukte wurde die Flashchromatographie unter Verwendung von Kieselgel der Firma *Acros Organics* (Korngröße 35–70 μM), der Firma *Merck KGaA* (Korngröße 63–200 μM) und der Firma *Sorbent Technologies* (Korngröße 40–63 μM) durchgeführt. Alternativ wurde ein CombiFlash-System von der Firma *Teledyne Isco* Modell CombiFlash[®]R_f, CombiFlash[®]R_f+ und CombiFlash[®]Companion[®] mit Redi[®]SepR_f-Säule (C18 Umkehrphasen-Säule, Packmaterial 26 g, Säulenvolumen 26.4 mL) von der Firma *Teledyne Isco* bei einer Flussrate von 30 mL/min verwendet. Folgende Methoden wurden angewandt:

Tabelle 21: Methode A (A: H₂O)

t (min)	B: MeOH (Vol%)
0	5
0–10	5
10–40	80
40	95
40–50	95

Tabelle 22: Methode B (A: H₂O)

t (min)	B: MeOH (Vol%)
0	5
0–5	5
5–35	80
35	95
35–45	95

Tabelle 23: Methode C (A: H₂O)

t (min)	B: MeOH (Vol%)
0	5
0–10	5
10–25	60
25–35	80
35	95
35–45	95

Tabelle 24: Methode D (A: H₂O)

t (min)	B: MeOH (Vol%)
0	25
0–8	25
8–32	70
32	95
32–40	95

Tabelle 25: Methode E (A: H₂O)

t (min)	B: MeOH (Vol%)
0	5
0–8	5
8–30	70
30–35	70
35	95
35–45	95

Tabelle 26: Methode F (A: H₂O)

t (min)	B: MeOH (Vol%)
0	20
0–5	20
5–40	80
40	95
40–55	95

Tabelle 27: Methode G (A: H₂O)

t (min)	B: MeOH (Vol%)
0	10
0–8	10
8–35	80
35	95
35–40	95

Tabelle 28: Methode H (A: H₂O+0.1% FA)

t (min)	B: MeOH (Vol%)
0	20
0–5	20
5–15	95
15–25	95

5.1.4 HPLC

Lösungsmittel für die präparative HPLC wurden vor der Verwendung im Ultraschallbad entgast. Ein HPLC-System der Firma *Waters* mit einer SunFire C18 Säule (Länge 30 cm, Durchmesser 5 cm, Korngröße 10 µM) der Firma *Waters* gekoppelt mit einem Micromass ZQ-Massenspektrometer der Firma *Waters* wurde mit folgender Methode verwendet:

Tabelle 29: HPLC-Methode 1 (A: H₂O)

t (min)	B: MeCN (Vol%)	Flussrate (mLmin⁻¹)
0	20	30
0–2.9	20	30
2.9–4	20	150
4–24	80	150
24	100	150
24–30	100	150

Alternativ wurden HPLC-Anlagen von der Firma *Agilent* mit einer Agilent Prep C18 Säule (Länge 25 cm, Durchmesser 3 cm, Korngröße 10 µM, Flussrate 75 mL/min), mit einer XBridge BEH130 Prep C18 Säule (Länge 25 cm, Durchmesser 1.9 cm, Korngröße 10 µM, Flussrate 15 mL/min) von der Firma *Waters* und mit einer Purosphere[®] Star RP-18e Säule (Länge 25 cm, Durchmesser 2.5 cm, Korngröße 10 µM, Flussrate 25 mL/min) von der Firma *Merck Millipore* eingesetzt. Folgende Methoden wurden verwendet:

Tabelle 30: HPLC-Methode 2 (A: H₂O)

t (min)	B: MeCN (Vol%)
0	10
0–12.5	90
12.5–15	90

Tabelle 31: HPLC-Methode 3 (A: H₂O)

t (min)	B: MeCN (Vol%)
0	5
0–40	90
40–45	90

Tabelle 32: HPLC-Methode 4 (A: H₂O+0.05% TFA)

t (min)	B: MeCN (Vol%)
0	5
0–40	90
40–45	90

5.1.5 NMR-Spektroskopie

Für die Messung der NMR-Spektren wurde die Probe in einem deuterierten Lösungsmittel der Firmen *Deutero*, *Cambridge Isotope*, *Alfa Aesar* oder *Acros Organics* gelöst. Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu dem Standard Tetramethylsilan in ppm angegeben (z.B. CDCl_3 : ^1H : 7.26, ^{13}C : 77.16 ppm; CD_3CN : ^1H : 1.94 ppm, ^{13}C : 118.26 ppm; Aceton- d_6 : ^1H : 2.05 ppm, ^{13}C : 29.84 ppm; Methanol- d_4 : ^1H : 3.31, ^{13}C : 49.00 ppm; DMSO- d_6 : ^1H : 2.50 ppm, ^{13}C : 39.52 ppm).^[393] Die Proben wurden an folgenden Geräten gemessen:

- Avance III HD 300 (300 MHz) von *Bruker* für 300 MHz- ^1H -NMR und 75.5 MHz- ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC
- Avance II 400 (400 MHz) von *Bruker* für 400 MHz- ^1H -NMR und 100.6 MHz- ^{13}C -NMR, 376.5 MHz- ^{19}F -NMR, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC
- Avance III HD 400 (400 MHz) von *Bruker* für 400 MHz- ^1H -NMR, 100.6 MHz- ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC
- Avance III 600 (600 MHz, TCI-CryoProbe) von *Bruker* für 600 MHz- ^1H -NMR, 150.9 MHz- ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC
- Agilent MR 400 (400 MHz) von *Agilent Technologies* für 400 MHz- ^1H -NMR, 100.6 MHz- ^{13}C -NMR, 376.5 MHz- ^{19}F -NMR, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC
- Varian DirectDrive 600 (600 MHz, Oxford NMR AS 600 Magnet) von *Varian* für 600 MHz- ^1H -NMR, 150.9 MHz- ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC, ^1H , ^{13}C -HSQC-TOCSY
- Avance III HD 500 (500 MHz, CryoProbe Prodigy) von *Bruker* für 500 MHz- ^1H -NMR, 125.6 MHz- ^{13}C -NMR, 160.5 MHz- ^{11}B -NMR, 470.6 MHz- ^{19}F -NMR, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC

Zur Auswertung der NMR-Spektren wurde die Software *MestReNova* von der Firma *Mestrelab Research*[®] verwendet.

5.1.6 HPLC-MS

Eine HPLC-Anlage der Serie 1100 der Firma *Agilent Technologies*, bestehend aus einer binären Pumpe und einem Dioden-Array-Detektor, kombiniert mit einem LC/MSD-Trap-

Massenspektrometer der Firma *Agilent Technologies* wurde für HPLC-MS-Analysen verwendet. Die Proben wurden mittels Elektrospray-Ionenquelle ionisiert.

Die Proben wurden mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL in Methanol, Acetonitril oder Acetonitril/Wasser (1:1) vorbereitet und über einen Spritzenfilter filtriert. Folgende Methoden wurden verwendet:

- Wasser (+ 0.1% Ameisensäure)/Acetonitril (Verhältnis: 20:80), isokratisch
- Wasser (+ 0.1% Ameisensäure)/Acetonitril (Verhältnis: 90:10→10:90) in drei Minuten, dann drei Minuten isokratisch
- Wasser (+ 0.1% Ameisensäure)/Acetonitril (Verhältnis: 95:5→5:95) in drei Minuten, dann drei Minuten isokratisch

Zur Trennung wurde eine Ascentis Express C18 Säule (Länge 3 cm, Durchmesser 2.1 mm, Korngröße 2.7 μ M) mit einer Flußrate von 1.0 mL/min verwendet.

Alternativ wurde eine LC/MS-Anlage (Modell 1200 series) mit integriertem Quadrupol LC/MS-System der Firma *Agilent Technologies* mit einer Säule Modell J'sphere ODS H80 (Länge 2 cm, Durchmesser 2 mm, Korngröße 4 μ M) bei einer Flussrate von 1.1 mL/min (Wasser (0.05% TFA)/Acetonitril, Verhältnis: 95:5→4:96, zwei Minuten) eingesetzt.

Die Agilent 6130 Single Quad LC/MS-Anlage mit Multimode Source der Firma *Agilent Technologies* mit einer Zorbax Eclipse Plus C18 Säule (Länge 5 cm, Durchmesser 2.1 mm, Korngröße 5 μ M) bei einer Flussrate von 0.7 mL/min (Wasser/Methanol, Verhältnis: 95:5→0:100, 12 Minuten dann drei Minuten isokratisch; oder Wasser (0.1% Ameisensäure)/Acetonitril, Verhältnis: 95:5→0:100, 12 Minuten dann acht Minuten isokratisch) wurde ebenfalls verwendet. Die Ionisation erfolgte mittels Elektrospray-Ionisation und/oder durch chemische Ionisation bei Atmosphärendruck. Für die Vorstufen der Boronsäure-funktionalisierten Azofarbstoffe wurde zur Detektion nur die Wellenlänge $\lambda = 360$ nm verwendet.

5.1.7 HRMS

Die Analyse der hochaufgelösten ESI-MS-Proben erfolgte an einem Agilent 6545 Q-TOF-Massenspektrometer von der Firma *Agilent Technologies*. Alternativ wurden ein Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS-System oder ein TOF/Q-TOF-Massenspektrometer von der Firma *Agilent Technologies* verwendet.

5.1.8 Schmelzbereiche

Die Schmelzbereiche wurden an einer Schmelzpunktapparatur des Modells B-545 der Firma *Büchi* und an einer Schmelzpunktapparatur Modell SMP3 der Firma *Stuart* nach Dr. *Tottoli* bestimmt. Die ermittelten Werte wurden nicht korrigiert.

5.1.9 Infrarot-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden an einem Gerät der Firma *Bruker* Modell Tensor 27 mit eingebauter Diamant-ATR-Einheit gemessen. Alternativ wurde ein Gerät der Firma *Thermo Scientific* Modell Nicolet 380 FT-IR verwendet. Die acht Banden mit höchster Intensität sowie charakteristische Banden wurden angegeben.

5.1.10 Kristallstrukturanalysen

Zur Durchführung der Kristallstrukturanalysen wurden von Herrn Dr. Dieter Schollmeyer ein *STOE IPDS 2T* und von Herrn Dr. Vincenct Lynch ein *Agilent Technologies SuperNova Dual Source* Diffraktometer verwendet. Die Daten wurden mit dem Programm *Mercury 3.1* visualisiert und sind bei der zugehörigen Analyse angegeben.

5.2 Allgemeines, Messgeräte und Methoden—biochemischer Teil

5.2.1 Allgemeines

Lyophilisiertes, essentiell fettfreies humanes Serum-Albumin (A1887) wurde von der Firma *Sigma Aldrich* bezogen. Die verwendeten Arznei-/Wirkstoffe Warfarin (2), Iophenoxinsäure (5), Sulfasalazin (6), Balsalazid (22), Ibuprofen (4), Ketoprofen (7), Naproxen (95), Salicylsäure (32), Indometacin, Meloxicam, Diclofenac, Paracetamol, Celecoxib und Bumetanid sowie Myristinsäure (3), Myristinsäuremethylester (9) und Cholesterin waren kommerziell erhältlich und wurden – wenn nicht explizit angegeben – ohne weitere Reinigung verwendet. Die Synthesevorschriften für die Fettsäure-Derivate 10, 13–21 sind in eigenen Arbeiten^[326] beschrieben. Für die Herstellung von Stammlösungen und zur Verdünnung wurde Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) (1X, ohne CaCl₂, ohne MgCl₂) von der Firma *Gibco*[®] mit NaCl, KCl, KH₂PO₄ und Na₂HPO₄•7 H₂O mit einem pH-Wert von 7.08 verwendet. Stammlösungen von Testsubstanzen, Farbstoffen und HSA wurden bei 4–5 °C gelagert. Die HSA-Lösung

kann unter diesen Lagerungsbedingungen 2 Tage verwendet werden. Proteinkonzentrationen wurden an einem NanoDrop 2000 (molarer Extinktionskoeffizient ε (280 nm, Lit.^[394]) = 32810 M⁻¹ cm⁻¹) der Firma *Thermo Scientific* bestimmt. Der freie Thiol-Gehalt lag im Mittel bei 32% (siehe Abschnitt 5.7.14). Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte an einem Titrino Plus 877 der Firma *Metrohm*. Biochemische Experimente wurden – wenn nicht explizit angegeben – bei 20 °C durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Farbstoffe wurden bei den in Tabelle 33 aufgeführten Anregungswellenlängen (λ_{exc}) und Emissionswellenlängen (λ_{em}) gemessen.

Tabelle 33: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Farbstoffe.

Farbstoff	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
NBD-C ₁₂ 8	435	535
Warfarin (2)	330	379
4-Hydroxywarfarin 112	330	384
4-Hydroxy-3-methoxywarfarin 113	326	380
3,4-Dihydroxywarfarin 114	330	384
Piperidiny-BODIPY 99	615	678
Dimethylamino-BODIPY 100	615	690
Indolyl-BODIPY 101	554	600

Die erhobenen Messdaten wurden mit GraphPad Prism^[331] (Version 7) analysiert. Standardfehler wurden als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet.

5.2.2 Proteinkristallographie

Das Protein wurde an der GPC Äkta pure an einer HiLoad 16/600 Superdex[®] 200 pg Säule der Firma *GE Healthcare Life Science* gereinigt. Die Proteinkonzentration wurde an einem NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer der Firma *Kisker Biotech* bestimmt. Kristalle wurden an der Beamline PX-II am *Paul-Scherrer-Institut* (Villigen, Schweiz) untersucht. Die zugehörigen Parameter sind bei der Analyse angegeben.

5.2.3 UV-VIS-Spektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie

Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgte an den Spektralphotometern Cary 100 UV-VIS der Firma *Agilent Technologies* und Evolution 201 der Firma *Thermo Scientific* sowie an einem Mikroplattenleser Varioskan[™] der Firma *Thermo Scientific*.

Fluoreszenzspektren – auch für FRET-Experimente – wurden in Nunc Mikroplatten (schwarz, 96-Well, F bottom) von der Firma *Thermo Scientific* an dem Mikroplattenleser Varioskan™ der Firma *Thermo Scientific* und in Küvetten an dem Spektrofluorimeter FP-8300 von der Firma *JASCO* aufgenommen.

Zur Darstellung des spektralen Überlapps wurden die Spektren normalisiert.

5.2.4 Titrationsexperimente, Konkurrenzexperimente und Job-Plots

Titration- und Konkurrenzexperimente sowie Job-Plots^[324-325] wurden in *Greiner Bio-One* Mikroplatten (farblos, 384-Well, flat bottom) von der Firma *Greiner Bio-One* durchgeführt.

Die Fluoreszenzintensitäten wurden in *Greiner Bio-One* Mikroplatten (schwarz, 96-well, half area) von der Firma *Greiner Bio-One* an dem Mikroplattenleser Varioskan™ der Firma *Thermo Scientific* bestimmt. Zur Beschriftung der Achsen wurden die Abkürzungen *c* (Konzentration), χ_{HSA} (Stoffmengenanteil von HSA) und *FI* (AU) (Fluoreszenzintensität, arbitrary unit) verwendet.

5.2.5 (Radioaktive) Gleichgewichtsdialysen

Die Gleichgewichtsdialysen wurden in einem wiederverwendbaren Rapid Equilibrium Dialysis (RED)-System der Firma *Thermo Scientific* mit Einmal-Dialysekammern (MWCO 12000) durchgeführt. Für die kompetitiven Gleichgewichtsdialysen wurde eine Competition RED-Basisplatte der Firma *Thermo Scientific* mit RED-Einmal-Dialysekammern für Kompetitionen von der Firma *Thermo Scientific* eingesetzt.

In beiden Systemen besteht die Membran aus Cellulose kombiniert mit Glycerol. Die Basisplatte besteht aus Polytetrafluorethylen (PTFE) und die RED-Dialysekammern sind aus hochdichtem Polyethylen (HDPE) gefertigt. Die Gleichgewichtsdialysen wurden auf einem temperierbaren Schüttler bei 37 °C und 300 rpm durchgeführt.

Die Fluoreszenzintensitäten von (kompetitiven) Gleichgewichtsdialysen wurden in *Greiner Bio-One* Mikroplatten (schwarz, 384-Well, small volume) von der Firma *Greiner Bio-One* an dem Mikroplattenleser Varioskan™ der Firma *Thermo Scientific* bestimmt.

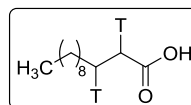
Radioaktive Gleichgewichtsdialysen wurden in Rapid Equilibrium Dialysis (RED) Einmalplatten mit fest eingesetzten RED-Dialysekammern (MWCO 12000) von der

Firma *Thermo Scientific* auf einem temperierbaren Schüttler bei 37 °C und 300 rpm durchgeführt. Für die Szintillationsmessung wurden Polyethylenvials von der Firma *Zinsser* verwendet und Rotiszint[®] eco plus von der Firma *Carl Roth* zugegeben. Zur Bestimmung der Aktivitätskonzentration von Tritium wurde der Flüssigkeitsszintillationszähler Tri-carb 3100TR der Firma *PerkinElmer* verwendet. Die spezifische Aktivität wurde mittels hochaufgelöster Masse an einem Bruker μ TOF-QII (ESI) der Firma *Bruker Daltonics* gemessen.

5.3 Radiochemische Synthesen

5.3.1 [2,3-³H₂]-Laurinsäure (^T28)

(2E)-Dodecen-2-säure (4.00 mg, 20.2 μmol, 1.0 äq.) wurde in trockenem Ethylacetat (0.7 mL) gelöst und mit 5wt% Palladium auf Aktivkohle (2 mg, 50wt%) versetzt. Das 1 mL Reaktionsgefäß wurde mit einem Tritium-Manifold verbunden und die Lösung in flüssigem Stickstoff eingefroren.



Das Gefäß wurde evakuiert und mit Tritium (2.36 Ci, 40.4 μmol) begast. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend 2 Stunden gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Tritiumgas durch die Zugabe von 1 mL Acetonitril/Wasser (10:1) mit anschließender Gefriertrocknung (3 ×) entfernt. Der Rückstand wurde in trockenem Acetonitril (3 × 3 mL) aufgenommen, filtriert, über eine HPLC (Phenomenex Gemini® NX C₁₈ Säule, Durchmesser 10 cm, Länge 15 cm, Partikelgröße 5 μm, Flussrate 6 mL/min, Acetonitril/Wasser Gradienten-Methode) gereinigt und mittels SPE-C₁₈-Kartusche in Ethanol überführt.

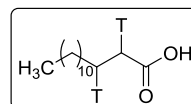
Ausbeute: 1.61 mg (4190 MBq (113 mCi), 4.8% RCY, 518 GBq/mmol (14 Ci/mmol), 99.9% radiochemische Reinheit durch HPLC), farbloser Feststoff, C₁₂H₂₂T₂O₂, (200.32), [200.1776].

³H-NMR (533 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.22–2.15 (m, 1T, T-2), 1.54–1.43 (m, 1T, T-3) ppm.

ESI-MS (neg.): 199.2 ([M-H]⁻ (max.) 30% tritium: 201.2).

5.3.2 [2,3-³H₂]-Myristinsäure (^T3)

(2E)-Tetradecen-2-säure (3.00 mg, 13.2 μmol, 1.0 äq.) wurde in trockenem Ethylacetat (0.7 mL) gelöst und mit 5wt% Palladium auf Aktivkohle (1 mg, 33wt%) versetzt. Das 1 mL Reaktionsgefäß wurde mit einem Tritium-Manifold verbunden und die Lösung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gefäß wurde evakuiert und mit Tritium (1.94 Ci, 33.2 μmol) begast. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend 2.5 Stunden



gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Tritiumgas durch die Zugabe von 1 mL Acetonitril/Wasser (10:1) mit anschließender Gefriertrocknung (3 ×) entfernt. Der Rückstand wurde in trockenem Acetonitril (5 × 3 mL) aufgenommen, filtriert, über eine HPLC-Anlage (Phenomenex Gemini[®] NX C₁₈ Säule, Durchmesser 10 cm, Länge 15 cm, Partikelgröße 5 µm, Flussrate 6 mL/min, Acetonitril/Wasser Gradienten-Methode) gereinigt und mittels SPE-C₁₈-Kartusche in Ethanol überführt.

Ausbeute: 0.93 mg (4108 MBq (111 mCi), 5.7% RCY, 444 GBq/mmol (12 Ci/mmol), 98.1% radiochemische Reinheit durch HPLC), farbloser Feststoff, C₁₄H₂₆T₂O₂, (228.38), [228.2089].

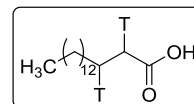
³H-NMR (533 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.06–1.95 (m, 1T, T-2), 1.47–1.37 (m, 1T, T-3) ppm.

ESI-MS (neg.): 227.2 ([M–H][–] (max.) 30% tritium: 231.2).

HR-ESI-MS (neg.): 227.2017 ([M–H][–] (max.) 30% tritium: 231.2356).

5.3.3 [2,3-³H₂]-Palmitinsäure (^T29)

(2E)-Hexadecen-2-säure (5.00 mg, 19.7 µmol, 1.0 äq.) wurde in trockenem Ethylacetat (0.7 mL) gelöst und mit 5wt% Palladium auf Aktivkohle (2 mg, 40wt%) versetzt. Das 1 mL Reaktionsgefäß wird mit einem Tritium-Manifold verbunden und die Lösung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gefäß wird evakuiert und mit Tritium (60%) begast. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend 4.5 Stunden gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Tritiumgas durch die Zugabe von Methanol mit anschließender Gefriertrocknung (3 ×) entfernt. Der Rückstand wird in trockenem Ethanol/Methanol (2 × 4 mL) aufgenommen, filtriert, über eine HPLC (Phenomenex Gemini[®] NX C₁₈ Säule, Durchmesser 10 cm, Länge 15 cm, Partikelgröße 5 µm, Flussrate 6 mL/min, Acetonitril/Wasser Gradienten-Methode) gereinigt und mittels SPE-C₁₈-Kartusche in Ethanol überführt.



Ausbeute: 1.49 mg (2460 MBq (67 mCi), 4.3% RCY, 407 GBq/mmol (11 Ci/mmol), 98.1% radiochemische Reinheit durch HPLC), farbloser Feststoff, C₁₆H₃₀T₂O₂, (256.438), [256.2402].

³H-NMR (533 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.51–1.45 (m, 1T, T-2), 1.28–1.18 (m, 1T, T-3) ppm.

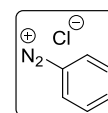
ESI-MS (neg.): 255.3 ([M–H][–] (max.) 30% tritium: 259.3).

5.4 Synthese der Sulfasalazin-Derivate

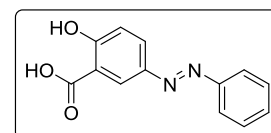
5.4.1 5-[(E)-Phenyldiazenyl]salicylsäure (33)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Jasmeen*.^[395]

Zu einer Lösung aus frisch destilliertem Anilin (**31**) (673 mg, 7.23 mmol, 1.0 äq.) in halbkonzentrierter Salzsäure (2 mL, 21.7 mmol, 3.0 äq.) wird bei –10 °C unter kräftigem Rühren eine 2.5 M Natriumnitrit-Lösung (2.9 mL, 7.23 mmol, 1.0 äq.) zugetropft. Nach 5 Minuten wird mit Kaliumiodid-Stärke-Papier auf freies Nitrit geprüft und solange 2.5 M Natriumnitrit-Lösung weiter zugegeben bis der Nachweis 5 Minuten nach der Zugabe positiv ausfällt. Sulfamidsäure (10 mg) wird zugegeben und bei –10 °C 2 Stunden gerührt.



Eine Lösung von Salicylsäure (**32**) (999 mg, 7.23 mmol, 1.0 äq.) in 2 M Natriumhydroxid-Lösung (2.9 mL, 21.7 mmol, 3.0 äq.) wird auf –10 °C gekühlt und tropfenweise mit der Diazonium-



Lösung so versetzt, dass die Temperatur unter 5 °C bleibt. Anschließend wird die Lösung 2 Stunden bei –10 °C gerührt, Wasser zugegeben und mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung pH 8–9 eingestellt. Der Niederschlag wird filtriert, mit eiskaltem Wasser gewaschen und mit Toluol (3 ×) codestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (C_{Hex}/EtOAc 8:1 + 0.5 Vol% AcOH → EtOAc + 0.5 Vol% AcOH) gereinigt.

Ausbeute: 1.04 g (4.29 mmol, 59%), rotbrauner Feststoff, R_f = 0.22 (C_{Hex}/EtOAc 8:1, 0.5% AcOH), Schmelzbereich: 217.8–219.3 °C (EtOAc), Schmelzbereich (Lit.^[395]): 218–220 °C (Benzol), C₁₃H₁₀N₂O₃, (242.23), [242.0691].

^1H -NMR, COSY (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 8.34$ (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-6$), 8.08 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-4$), 7.90–7.84 (m, 2H, $H-2'$, $H-6'$), 7.63–7.50 (m, 4H, $H-3'$, $H-4'$, $H-5'$), 7.16 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, $H-3$) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in NaOD in D_2O gemessen.^[396]

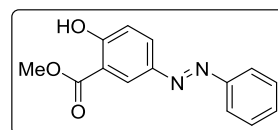
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 171.3$ (COOH), 163.9 (C_q-2), 151.9 (C_q-1'), 144.3 (C_q-5), 131.0 ($\text{CH}-4'$), 129.4 ($\text{CH}-3'$, $\text{CH}-5'$), 128.8 ($\text{CH}-4$), 125.7 ($\text{CH}-6$), 122.3 ($\text{CH}-2'$, $\text{CH}-6'$), 118.4 ($\text{CH}-3$), 114.1 (C_q-1) ppm.¹

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in NaOD in D_2O gemessen.^[396]

5.4.2 5-[(*E*)-phenyldiazenyl]salicylsäuremethylester (34)

Nach einer Synthesevorschrift von *Karton*.^[396]

Die Säure **33** (1.04 g, 4.06 mmol, 1.0 äq.) wird in Methanol (20 mL) gelöst und mit Bortrifluorid-Etherat (980 μL , 7.73 mmol, 1.9 äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wird unter Rückfluss gerührt.



Nach 16 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird Eis, Wasser und Natriumhydroxid-Lösung zugegeben und mit 1 M HCl pH 7 eingestellt. Der Niederschlag wird filtriert und säulenchromatographisch an Kieselgel ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 50:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.01 g (3.94 mmol, 92%), orangefarbener Feststoff, $R_f = 0.66$ (n -Heptan/ EtOAc 1:1), Schmelzbereich: 107.1–107.4 $^{\circ}\text{C}$ ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 50:1), Schmelzbereich (Lit.^[397]): 106 $^{\circ}\text{C}$, $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_5$, (256.26), [256.0848].

^1H -NMR, COSY (400 MHz, $\text{Aceton}-d_6$): $\delta = 11.12$ (s, 1H, OH), 8.40 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, $H-6$), 8.12 (dd, $J = 8.9$, $J = 2.5$ Hz, 1H, $H-4$), 7.92–7.88 (m, 2H, $H-2'$, $H-6'$), 7.60–7.50 (m, 3H, $H-3'$, $H-4'$, $H-5'$), 7.15 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, $H-3$), 4.03 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, $\text{Aceton}-d_6$): $\delta = 171.0$ (COOCH_3), 164.7 (C_q-2), 153.2 (C_q-1'), 146.1 (C_q-5), 131.9 ($\text{CH}-4'$), 130.1 ($\text{CH}-3'$, $\text{CH}-5$), 129.7 ($\text{CH}-4$), 126.9 ($\text{CH}-6$), 123.4 ($\text{CH}-2'$, $\text{CH}-6'$), 119.3 ($\text{CH}-3$), 113.5 (C_q-1), 53.3 (CH_3) ppm.

ESI-MS (pos.): 257.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 257.1).

¹ Die quartären Kohlenstoffatome C_q-1 und C_q-2 waren im ^{13}C -Spektrum nicht sichtbar und wurden durch HMBC-Kontakte zugeordnet.

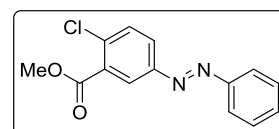
HR-ESI-MS (pos.): 257.0929 ($[M+H]^+$, ber.: 257.0926).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3069, 2954, 2927, 1677, 1586, 1480, 1442, 1351, 1288, 1215, 1078, 812 cm^{-1} .

5.4.3 5-[2-Chlor-5-[(E)-phenyldiazenyl]benzoesäuremethylester (35)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Jähne.^[338]

Phosphorylchlorid (50 μL) und *N,N*-Dimethylformamid (50 μL) werden unter Eiskühlung gemischt. Dann wird eine Lösung des Phenols **34** (54 mg, 0.21 mmol, 1.0 äq.) in DMF (0.8 mL) unter



Eiskühlung mit dem hergestellten *Vilsmeier*-Reagenz versetzt. Die Reaktionsmischung wird bei 90 °C gerührt. Nach 3 Tagen wird die Lösung vorsichtig auf Eis gegossen, im Vakuum eingeeengt und lyophilisiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1) und mittels HPLC (HPLC-Methode 2) gereinigt.

Ausbeute: 9.1 mg (33 μmol , 16%), orangefarbenes Öl, R_f = 0.78 ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1), $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$, (274.70), [274.0509].

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.27 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H -6), 8.08 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, H -4), 7.96–7.91 (m, 2H, H -2', H -6'), 7.83 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H -3), 7.65–7.60 (m, 3H, H -3', H -4', H -5'), 3.92 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 164.8 (CO), 151.7 (C_q -1'), 150.0 (C_q -5), 134.5 (C_q -2), 132.3 (CH-4'), 132.2 (CH-3), 131.0 (C_q -1), 129.6 (CH-3', CH-5'), 126.8 (CH-4), 124.5 (CH-6), 122.9 (CH-2', CH-6'), 52.9 (CH_3) ppm.

ESI-MS (pos.): 275.8 ($[M+H]^+$, ber.: 275.1).

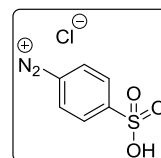
HR-ESI-MS (pos.): 275.0591 ($[M+H]^+$, ber.: 275.0587).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2953, 2928, 1675, 1440, 1387, 1254, 1213, 1095, 769, 689 cm^{-1} .

5.4.4 5-[(E)-(4-Sulfamoylphenyl)diazenyl]salicylsäure (36)

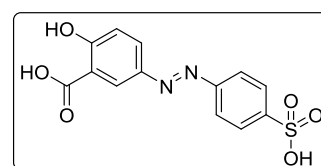
Angelehnt an eine Synthesevorschrift im *Organikum*.^[398]

Sulfanilsäure (37) (3.76 g, 21.7 mmol, 1.0 äq.) wird in 1 M HCl (65.2 mL, 65.2 mmol, 3.0 äq.) bei <50 °C unter kräftigem Rühren 10 Minuten suspendiert. Die Suspension wird auf 0–5 °C gekühlt und unter kräftigem Rühren mit einer 2.5 M Natriumnitrit-Lösung (8.7 mL, 21.7 mmol, 1.0 äq.)



versetzt. Nach 5 Minuten wird mit Kaliumiodid-Stärke-Papier auf freies Nitrit geprüft und solange 2.5 M Natriumnitrit-Lösung weiter zugegeben bis der Nachweis 5 Minuten nach der Zugabe positiv ausfällt.

Salicylsäure (32) (3.00 g, 21.7 mmol, 1.0 äq.) wird in 2 M Natriumhydroxid-Lösung (32.6 mL, 65.2 mmol, 3.0 äq.) gelöst und auf 5–10 °C gekühlt. Die Diazonium-Lösung wird so zugetropft, dass der pH-Wert durch Zugabe von 2 M



Natriumhydroxid-Lösung bei 9–10 liegt. Es wird 10 Minuten gerührt und mit 1 M HCl pH 1 eingestellt. Der Niederschlag wird filtriert, mit eiskaltem Wasser gewaschen und lyophilisiert.

Ausbeute: 7.01 g (21.8 mmol, quant.), orangebrauner Feststoff, $R_f = 0.55$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzbereich: 320 °C (Zersetzung), C₁₃H₁₀N₂O₆S, (322.29), [322.0260].

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8.34$ (d, $J = 2.5$, 1H, *H*-6), 8.09 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H, *H*-4), 7.85–7.81 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 7.81–7.77 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 7.16 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, *H*-3) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in D₂O gemessen.^[399]

¹³C-NMR (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 171.3$ (COOH), 163.6 (*C*_q-2), 151.5 (*C*_q-1'), 150.4 (*C*_q-4'), 144.5 (*C*_q-5), 129.0 (CH-4), 126.7 (CH-3', CH-5'), 125.8 (CH-6), 121.9 (CH-2', CH-6'), 118.4 (CH-3), 113.8 (*C*_q-1) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in D₂O gemessen.^[399]

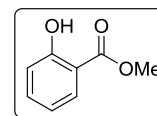
ESI-MS (pos.): 323.1 ([M+H]⁺, ber.: 323.0).

HR-ESI-MS (pos.): 323.0332 ([M+H]⁺, ber.: 323.0332).

5.4.5 Salicylsäuremethylester (39)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Laria*.^[400]

Salicylsäure (32) (3.00 g, 21.7 mmol, 1.0 äq.) wird in Methanol (50 mL) gelöst. Dann werden konzentrierte Schwefelsäure (2.3 mL, 43.4 mmol, 2.0 äq.) und Magnesiumsulfat (500 mg) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird unter Rückfluss gerührt. Nach 2 Tagen wird auf Raumtemperatur abgekühlt, Eis zugegeben und im Vakuum eingeeengt. Es wird mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung pH 7 eingestellt, mit Diethylether (4 × 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



Ausbeute: 2.62 g (17.2 mmol, 79%), farbloses Öl, $R_f = 0.86$ ($^C\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:1), $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, (152.15), [152.0473].

^1H -NMR, COSY (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 10.76$ (s, 1H, OH), 7.84 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, $H-6$), 7.45 (ddd, $J = 8.5$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, $H-4$), 6.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, $H-3$), 6.90–6.85 (m, 1H, $H-5$), 3.95 (s, 3H, OCH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[401]

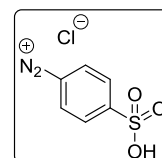
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (125.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.7$ (CO), 161.7 (C_q-2), 135.8 (CH-4), 130.0 (CH-6), 119.3 (CH-5), 117.7 (CH-3), 112.5 (C_q-1), 52.4 (OCH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[401]

5.4.6 4-[(E)-[4-Hydroxy-3-(methoxycarbonyl)phenyl]diazenyl]benzolsulfonsäure (38)

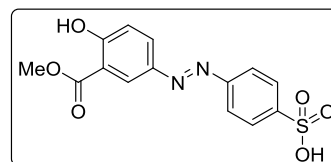
Angelehnt an eine Synthesevorschrift im *Organikum*.^[398]

Sulfanilsäure (37) (2.98 g, 17.2 mmol, 1.0 äq.) wird in 1 M HCl (51.7 mL, 51.7 mmol, 3.0 äq.) bei <50 °C 10 Minuten kräftig gerührt. Die Suspension wird auf 0–5 °C gekühlt und unter kräftigem Rühren 2.5 M Natriumnitrit-Lösung (6.9 mL, 17.2 mmol, 1.0 äq.) zugetropft. Nach 5 Minuten wird mit Kaliumiodid-Stärke-Papier auf freies Nitrit geprüft und solange 2.5 M Natriumnitrit-Lösung weiter zugegeben bis der Nachweis 5 Minuten nach der Zugabe positiv ausfällt.



Salicylsäuremethylester (**39**) (2.62 g, 17.2 mmol, 1.0 äq.)

wird in 2 M Natriumhydroxid-Lösung (25.8 mL, 51.7 mmol, 3.0 äq.) gelöst und auf 5–10 °C gekühlt. Während die



Diazonium-Lösung unter kräftigem Rühren zügig zu der

Suspension zugetropft wird, wird der pH-Wert durch Zugabe von 2 M Natriumhydroxid-Lösung bei 9–10 gehalten. Nach 10 Minuten wird mit 1 M HCl pH 1 eingestellt, der Niederschlag filtriert, mit kaltem Wasser gewaschen und lyophilisiert.

Ausbeute: 5.29 g (15.7 mmol, 91%), rotbrauner Feststoff, $R_f = 0.54$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5% AcOH), Schmelzbereich: 300 °C (Zersetzung), C₁₄H₁₂N₂O₆S, (336.32), [336.0416].

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.00 (s, 1H, OH), 8.30 (d, J = 2.5 Hz, 1H, *H*-6), 8.08 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, *H*-4), 7.85–7.81 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 7.81–7.77 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 7.19 (d, J = 8.9 Hz, 1H, *H*-3), 3.93 (s, 3H, OCH₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[399]

¹³C-NMR (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.1 (COOCH₃), 162.1 (C_q-2), 151.6 (C_q-1'), 150.4 (C_q-4'), 144.6 (C_q-5), 128.9 (CH-4), 126.7 (CH-3', CH-5'), 125.6 (CH-6), 122.0 (CH-2', CH-6'), 118.7 (CH-3), 114.4 (C_q-1), 52.7 (OCH₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[399]

ESI-MS (pos.): 337.1 ([M+H]⁺, ber.: 337.0).

HR-ESI-MS (neg.): 335.0347 ([M-H]⁻, ber.: 335.0343).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2920, 2852, 1681, 1256, 1183, 1127, 1076, 1045, 1009, 844, 794 cm⁻¹.

5.4.7 Alternative Synthese von 4-[(*E*)-[4-Hydroxy-3-(methoxycarbonyl)phenyl]diazenyl]benzolsulfonsäure (**38**): Veresterung der Benzolsulfonsäure **36**

Acetylchlorid (1 mL, 14.0 mmol, 30.0 äq.) wird unter Eiskühlung in Methanol (50 mL) gegeben. Dann wird die Salicylsäure **36** (153 mg, 474 μ mol, 1.0 äq.) hinzugegeben und 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es wird Acetylchlorid (1 mL) zugegeben und 2.5

Stunden unter Rückfluss gerührt. Nach einem Tag Rühren bei Raumtemperatur wird Acetylchlorid (1 mL) zugegeben, 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt, 15.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und erneut Acetylchlorid (1 mL) zugegeben. Nach 3 Tagen unter Rückfluss wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, Wasser (10 mL) zugegeben, mit 1 M Salzsäure pH 3 eingestellt und mit Ethylacetat (8×10 mL) extrahiert.

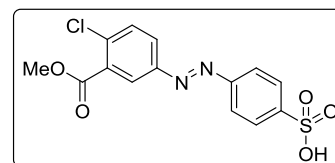
Die wässrige Phase wird im Vakuum eingengt, in wässrige HCl (50 mL, pH 3) aufgenommen und mit Ethylacetat (4×30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 4) gereinigt.

Ausbeute: 81 mg (241 μ mol, 51%), orangegelber Feststoff.

5.4.8 4-[(E)-[4-Chlor-3-(methoxycarbonyl)phenyl]diazenyl]benzolsulfonsäure (40)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Genco*.^[402]

Das Phenol **38** (201 mg, 0.60 mmol, 1.0 äq.) wird unter Eiskühlung in Thionylchlorid (4 mL) gelöst und mit DMF (3 Tropfen) versetzt. Die Reaktionslösung wird bei 50 °C gerührt und nach 4.5 Tagen auf Eis gegossen. Zu der zweiphasigen Lösung wird Ethylacetat (10 mL) hinzugegeben und mit Ethylacetat (3×30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2×30 mL) und mit Wasser (30 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.



Ausbeute: 169 mg (476 μ mol, 80%), roter Feststoff, $R_f = 0.68$ (*n*-Hexan/EtOAc 4:1), Schmelzbereich: 89.2–92.0 °C (EtOAc), $C_{14}H_{11}ClN_2O_5S$, (354.76), [354.0077].

1H -NMR, COSY (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.45$ (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, *H*-2), 8.21–8.18 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 8.12–8.08 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 8.02 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, *H*-6), 7.64 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, *H*-5), 4.00 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (125.6 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 165.3$ (CO), 155.5 (C_q -1'), 150.3 (C_q -1), 145.6 (C_q -4'), 137.9 (C_q -4), 132.4 (CH-5), 131.2 (C_q -3), 128.5 (CH-3', CH-5'), 127.0 (CH-2), 126.5 (CH-6), 124.0 (CH-2', C-6'), 52.9 (OCH₃) ppm.

ESI-MS (neg.): 353.0 ($[M-H]^-$, ber.: 353.0).

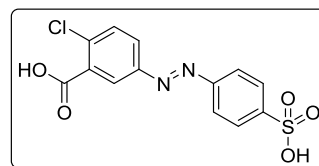
HR-ESI-MS (pos.): 376.9966 ($[M+Na]^+$, ber.: 376.9969).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3096, 2952, 2924, 2851, 1735, 1379, 1208, 1181, 1046, 846 cm^{-1} .

5.4.9 2-Chlor-5-[(*E*)-(4-sulfophenyl)diazenyl]benzoesäure (41)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Rossi.^[403]

Der Ester **40** (169 mg, 0.48 mmol, 1.0 äq.) wird in 2 M methanolischer Natriumhydroxid-Lösung (400 mg NaOH in 5 mL Methanol) gelöst und unter Rückfluss gerührt. Nach 39 Stunden wird die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt, im Vakuum eingengt, mit 1 M HCl auf pH 1 eingestellt und mit Ethylacetat (3×20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels CombiFlash (Methode H) gereinigt.



Ausbeute: 131 mg (384 μmol , 81%), gelbliches Öl, R_f = 0.60 (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5% AcOH), C₁₃H₉ClN₂O₅S, (340.73), [339.9921].

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.24 (d, J = 2.5 Hz, 1H, *H*-6), 8.02 (dd, J = 8.5 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, *H*-4), 7.96–7.92 (m, 2H, *H*-2', *H*-6'), 7.77 (d, J = 8.5 Hz, 1H, *H*-3), 7.70–7.66 (m, 2H, *H*-3', *H*-5') ppm.

¹³C-NMR (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.5 (CO), 150.7 (C_q-1'), 150.3 (C_q-5), 137.2 (C_q-4'), 135.1 (C_q-2), 133.2 (C_q-1), 132.5 (CH-3), 130.2 (CH-3', CH-5'), 126.6 (CH-4), 125.0 (CH-2', CH-6'), 124.8 (CH-6) ppm.

ESI-MS (neg.): 339.0 ($[M-H]^-$, ber.: 339.0).

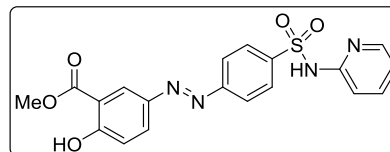
HR-ESI-MS (neg.): 338.9859 ($[M-H]^-$, ber.: 338.9848).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 1677, 1475, 1384, 1270, 1211, 1177, 1088, 1047, 921, 833, 669 cm^{-1} .

5.4.10 Sulfasalazinmethylester 42

Nach einer Synthesevorschrift von *Karton*.^[396]

Sulfasalazin (**6**) (291 mg, 726 μmol , 1.0 äq.) wird in Methanol (40 mL) gelöst und mit Bortrifluorid-Etherat (600 μL , 4.73 mmol, 6.5 äq.) versetzt. Die



Reaktionslösung wird unter Rückfluss gerührt. Nach 31 Stunden wird Bortrifluorid-Etherat (600 μL , 4.73 mmol, 6.5 äq.) zugegeben und 20 Stunden unter Rückfluss gerührt. Es wird Wasser (3 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wird Wasser (30 mL) zugegeben, mit Natriumhydrogencarbonat pH 9 eingestellt und mit Ethylacetat (3×100 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wird aus Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute: 230 mg (558 μmol , 77%), orangefarbener Feststoff, $R_f = 0.68$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzbereich: 215.7–217.7 °C (EtOAc), $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$, (412.42), [412.0841].

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.30$ (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, $H-6$), 8.08–8.04 (m, 1H, $H-4$), 8.05–8.02 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-3'$, $H-5'$), 7.99–7.96 (m, 1H, $H-6''$), 7.96–7.92 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-2'$, $H-6'$), 7.75 (ddd, $J = 8.7$ Hz, $J = 7.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, $H-4''$), 7.21 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, $H-3''$), 7.15 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, $H-3$), 6.85 (ddd, $J = 7.0$ Hz, $J = 5.7$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H, $H-5''$), 3.91 (s, 3H, OCH_3) ppm.

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 167.9$ (CO), 163.3 (C_q-2), 153.8 (C_q-2''), 153.4 (C_q-1'), 144.1 (C_q-5), 144.0 (C_q-4'), 141.1 (CH-4'' , CH-6''), 128.8 (CH-4), 127.8 (CH-3' , CH-5'), 126.6 (CH-6), 122.6 (CH-2' , CH-6'), 119.1 (CH-3), 114.8 (CH-5''), 114.4 (C_q-1 , CH-3''), 52.6 (OCH_3) ppm.

ESI-MS (pos.): 413.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 413.1).

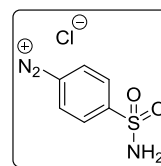
HR-ESI-MS (pos.): 413.0916 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 413.0914).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3057, 2924, 2854, 1678, 1653, 1532, 1390, 1359, 1292, 1139, 1083, 846$ cm^{-1} .

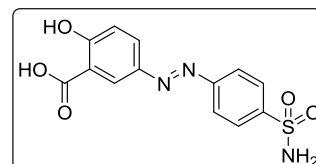
5.4.11 5-[(E)-(4-Sulfamoylphenyl)diazenyl]salicylsäure (47)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Jasmeen*.^[395]

Sulfanilamid (**46**) (2.06 g, 12.0 mmol, 1.0 äq.) wird in halbkonzentrierter HCl (80 mL, 480 mmol, 40 äq.) unter kräftigem Rühren gelöst und dann auf 0 °C gekühlt. Es wird eine 2.5 M Natriumnitrit-Lösung (10.2 mL, 25.5 mmol, 2.1 äq.) zugetropft und 2 Stunden bei 0 °C gerührt.



Salicylsäure (**32**) (2.62 g, 17.2 mmol, 1.0 äq.) wird in 13.4 M Natriumhydroxid-Lösung (60 mL, 804 mmol, 46.7 äq.) gelöst und auf -13 °C gekühlt. Die Diazonium-Lösung wird langsam zugetropft und 16 Stunden bei -13 °C gerührt. Es wird mit 2 M



HCl pH 5 eingestellt, der Niederschlag filtriert, mit kaltem Wasser gewaschen und mit Toluol (3 ×) codestilliert.

Ausbeute: 517 mg (1.61 mmol, 13%), orangefarbener Feststoff, $R_f = 0.12$ (EtOAc/EtOH/H₂O 7:2:1), Schmelzbereich: 217.8–219.3 °C (EtOAc), C₁₃H₁₁N₃O₅S, (321.31), [321.0419].

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.34 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, *H*-6), 7.97–7.96 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 7.95–7.94 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 7.88 (dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, *H*-4), 7.48 (s, 3H, NH₂), 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, *H*-3) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170.7 (COOH), 169.4 (C_q-2), 153.9 (C_q-1'), 144.5 (C_q-4'), 142.6 (C_q-5), 127.3 (CH-4), 127.0 (CH-3', CH-5'), 126.9 (CH-6), 122.3 (CH-2', CH-6'), 118.4 (C_q-1), 118.2 (CH-3) ppm.

ESI-MS (pos.): 322.0 ([M+H]⁺, ber.: 322.0).

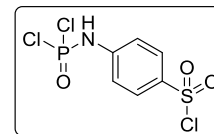
HR-ESI-MS (pos.): 344.0329 ([M+Na]⁺, ber.: 344.0317).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3357, 1624, 1586, 1485, 1460, 1434, 1383, 1305, 1147, 1094, 834$ cm⁻¹.

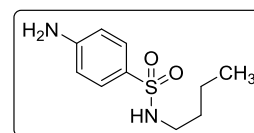
5.4.12 4-Amino-*N*-butylbenzolsulfonamid (49)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Godfroid* und *Bieber*.^[340-341]

Phosphorpentachlorid (2.62 g, 12.6 mmol, 1.09 äq.) wird in trockenem Dichlormethan (15 mL) suspendiert und unter Eiskühlung mit Sulfanilsäure (**37**) (2.00 g, 11.6 mmol, 1.0 äq.) - suspendiert in trockenem Dichlormethan (10 mL) - versetzt. Die Suspension wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, Eis und dann vorsichtig Wasser zugegeben und mit Ethylacetat extrahiert (3 × 30 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (30 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



Das Benzolsulfonsäurechlorid **50** (2.37 g, 7.68 mmol, 1.0 äq.) wird in trockenem Acetonitril (5 mL) gelöst und unter Eiskühlung mit *n*-Butylamin (6.9 mL, 69.4 mmol, 9.0 äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 4.5 Tagen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, Wasser (20 mL) zugegeben und mit Diethylether (2 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (15 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc 1:1) gereinigt.



Ausbeute: 422 mg (1.85 mmol, 16%), farbloser Feststoff, $R_f = 0.47$ (^CHex/EtOAc 1:1 + 0.5 Vol% NEt₃), Schmelzbereich: 92.3–95.1 °C (^CHex/EtOAc 1:1), Schmelzbereich (Lit.^[404]): 93–94 °C, C₁₀H₁₆N₂O₂S, (228.31), [228.0932].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7.43\text{--}7.35$ (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 7.02 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH), 6.64–6.55 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 5.89 (s, 2H, NH₂), 2.69–2.56 (m, 2H, NHCH₂), 1.37–1.26 (m, 3H, CH₂), 1.26–1.15 (m, 3H, CH₂CH₃), 0.79 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[404]

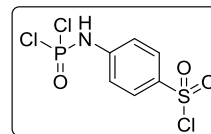
¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 152.3$ (C_q-4), 128.4 (CH-2, CH-6), 125.6 (C_q-1), 112.6 (CH-3, CH-5), 42.1 (NHCH₂), 31.0 (CH₂), 19.3 (CH₂CH₃), 13.5 (CH₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[404]

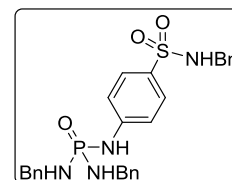
5.4.13 *N*-Benzyl-4-[[bis(benzylamino)phosphoryl]amino]benzolsulfonamid (52)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Bieber*.^[340]

Phosphorpentachlorid (2.41 g, 11.6 mmol, 2.0 äq.) wird in Phosphoroxychlorid (15 mL) suspendiert und unter Eiskühlung mit Sulfanilsäure (**37**) (1.00 g, 5.78 mmol, 1.0 äq.) versetzt. Die Suspension wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 4 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (Siedepunkt: 50 °C bei 130 mbar), vorsichtig Eis zugegeben und mit Ethylacetat extrahiert (3 × 20 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die leicht gelbe Flüssigkeit wird roh weiter umgesetzt.



In trockenem Acetonitril (4.3 mL) gelöstes Benzolsulfonsäurechlorid **50** (645 mg, 2.09 mmol, 1.0 äq.) wird unter Eiskühlung mit Benzylamin (2.1 mL, 18.9 mmol, 9.0 äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 1.5 Tagen



wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, Wasser (10 mL) hinzuzugegeben und mit Ethylacetat (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (15 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc 3:1→1:1) gereinigt.

Ausbeute: 52 mg (100 µmol, 5%), farbloser Feststoff, $R_f = 0.41$ (^CHex/EtOAc 1:1), Schmelzbereich: 176.1–177.2 °C (^CHex/EtOAc 1:1), Schmelzbereich (Lit.^[340]): 179 °C, C₂₇H₂₉N₄O₃PS, (520.59), [520.1698].

¹H-NMR, COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.83 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, SO₂NH), 7.75 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, SO₂PhNHPO), 7.61–7.52 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 7.36–7.20 (m, 15H, *H*-3, *H*-5, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6', *H*-2'', *H*-3'', *H*-5'', *H*-6'', *H*-2''', *H*-3''', *H*-5''', *H*-6'''), 7.24–7.13 (m, 2H, *H*-4'', *H*-4'''), 5.09 (dt, $J = 11.1$ Hz, $J = 7.1$ Hz, 2H, 2 × PONHBn'Bn''), 4.02 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, 2 × CH_{2A}, PONHBn', PONHBn''), 4.00 (d, $J = 7.1$, 2H, 2 × CH_{2B}, PONHBn', PONHBn''), 3.89 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH₂, SO₂NHBn) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 147.2 (C_q -4), 141.2 (C_q -1''), 141.1 (C_q -1'''), 137.9 (C_q -1'), 130.1 (C_q -1), 128.2 (CH -3', CH -5', Bn'), 128.0 (CH -3'', CH -5'', Bn'' ; CH -3''', CH -5''', Bn'''), 127.6 (CH -2, CH -6), 127.6 (CH -2', CH -6', Bn'), 127.3 (CH -2'', CH -6'', Bn'' ; CH -2''', CH -6''', Bn'''), 127.1 (CH -4', Bn'), 126.5 (CH -4'', Bn'' ; CH -4''', Bn'''), 116.7 (CH -3, CH -5), 46.1 (CH_2 , Bn'), 44.1 ($2 \times \text{CH}_2$, Bn'' , Bn''') ppm.

^{31}P -NMR (121 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.9 (s, $\text{PO}(\text{NHBn})_2$).

ESI-MS (pos.): 521.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 521.2).

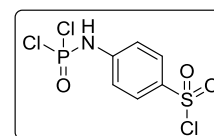
HR-ESI-MS (pos.): 521.1772 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 521.1776).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3064, 3031, 1653, 1597, 1498, 1454, 1304, 1151, 1095, 926, 698 cm^{-1} .

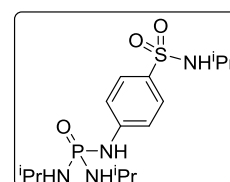
5.4.14 *N*-Isopropyl-4-[[bis(isopropylamino)phosphoryl]amino]benzolsulfonamid (53)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Bieber*.^[340]

In Phosphoroxychlorid (15 mL) suspendiertes Phosphorpentachlorid (2.41 g, 11.6 mmol, 2.0 äq.) wird unter Eiskühlung mit Sulfanilsäure (37) (1.00 g, 5.78 mmol, 1.0 äq.) versetzt. Die Suspension wird bei Raumtemperatur gerührt und nach 4 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (Siedepunkt: 50 °C bei 130 mbar). Dann wird vorsichtig Eis zugegeben und mit Ethylacetat (3×20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die leicht gelbe Flüssigkeit wird roh weiter umgesetzt.



Benzolsulfonsäurechlorid **50** (645 mg, 2.09 mmol, 1.0 äq.) wird in trockenem Acetonitril (4.3 mL) gelöst und unter Eiskühlung Isopropylamin (1.6 mL, 18.9 mmol, 9.0 äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 1.5 Tagen wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, Wasser (10 mL) hinzugegeben und mit Ethylacetat (3×20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (15 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird



säulenchromatographisch an Kieselgel ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:1 $\rightarrow$ EtOAc + 1.0 Vol% NEt_3) gereinigt.

Ausbeute: 88 mg (412 μmol , 14%), gelber Feststoff, $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_3\text{PS}$, (376.46), [376.1698].

^1H -NMR, COSY (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.56–7.50 (m, 2H, H -2, H -6), 7.50–7.46 (m, 1H, SO_2NH), 7.27–7.24 (m, 1H, SO_2ArNH), 7.23–7.18 (m, 2H, H -3, H -5), 4.21 (t, J = 10.1 Hz, 2H, PONHNNH), 3.31–3.18 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.17–3.09 (m, 1H, $\text{SO}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 1.07–0.97 (m, 12H, $2 \times \text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.90 (d, J = 6.5 Hz, 6H, $\text{SO}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 147.2 (C_q -4), 131.0 (C_q -1), 127.3 (CH -2, CH -6), 116.5 (d, J = 6.8 Hz, CH -3, CH -5), 45.0 ($\text{SO}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 42.4 ($2 \times \text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 25.3 (d, J = 5.7 Hz, ($2 \times \text{CH}(\text{CH}_3)_2$)), 25.1 (d, J = 5.5 Hz, ($2 \times \text{CH}(\text{CH}_3)_2$)), 23.1 ($\text{SO}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

^{31}P -NMR (121 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 6.2 (s, $\text{PO}(\text{NHiPr})_2$).

ESI-MS (pos.): 377.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 377.2).

5.4.15 Allgemeine Synthesevorschrift für die 4-Aminobenzolsulfonamide

5.4.15.1 Synthese des Benzolsulfonsäurechlorids 50

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Godfroid* und *Bieber*.^[340-341]

Sulfanilsäure (**37**) (1.0 äq.) wird in trockenem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wird Phosphorpentachlorid (1.09 äq.) zugegeben. Die Suspension wird 4 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und ein Eis/Wasser-Gemisch zugegeben. Die Suspension wird mit Ethylacetat ($3\text{--}4 \times 10\text{--}30$ mL) extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

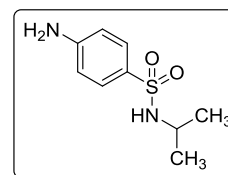
5.4.15.2 Synthesevorschrift für die Sulfonamide

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Bieber*.^[340]

Benzolsulfonsäurechlorid **50** (1.0 äq.) wird in trockenem Acetonitril gelöst und mit Amin (6.0 äq.) versetzt. Die Lösung wird bis zum vollständigen Umsatz (16 h–6 d) gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird Wasser (20–30 mL) hinzugegeben, mit 1 M Salzsäure pH 1 eingestellt und unter Rückfluss gerührt. Nach vollständigem Umsatz (2.5 h–3 d) wird mit Natriumhydrogencarbonat pH 9 eingestellt und mit Ethylacetat (3–13 × 20–150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann entweder ohne weitere Reinigung eingesetzt oder säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt werden.

5.4.16 4-Amino-*N*-isopropylbenzolsulfonamid (**53**)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (2.29 g, 7.42 mmol, 1.0 äq.), Isopropylamin (5.7 mL, 7.0 mmol, 9.0 äq.) und Acetonitril (20 mL) gearbeitet.



Ausbeute: 595 mg (2.78 mmol, 37%), farbloser Feststoff, Schmelzbereich: 116.5–117.2 °C (EtOAc), Schmelzbereich (Lit.^[405]): 117–118 °C (Methanol), C₉H₁₄N₂O₂S, (214.28), [214.0776].

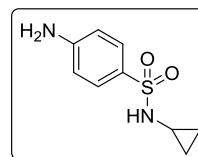
¹H-NMR, COSY (300 MHz, Aceton-*d*₆): δ = 7.58–7.49 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 6.79–6.68 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 5.93 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, NH), 5.39 (s, 2H, NH₂), 3.40–3.18 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.03 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH(CH₃)₂) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in DMSO-*d*₆ gemessen.^[405]

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, Aceton-*d*₆): δ = 153.0 (C_q-4), 129.6 (CH-2, CH-6), 129.4 (C_q-1), 113.9 (CH-3, CH-5), 46.2 (CH(CH₃)₂), 23.8 (CH(CH₃)₂) ppm.

5.4.17 4-Amino-*N*-cyclopropylbenzolsulfonamid (55)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (1.28 g, 4.15 mmol, 1.0 äq.), Cyclopropylamin (2.6 mL, 37.5 mmol, 9.0 äq.) und Acetonitril (10 mL) gearbeitet. Zur Entfernung von überschüssigem Amin wird das Rohprodukt mit Ethylacetat codestilliert.



Ausbeute: 576 mg (2.71 mmol, 65%), farbloser Feststoff, $R_f = 0.21$ (*n*-Heptan/EtOAc 1:1) Schmelzbereich: 143.5–146.0 °C (EtOAc), Schmelzbereich (Lit.^[406]): 153–155 °C, C₉H₁₂N₂O₂S, (212.27), [212.0619].

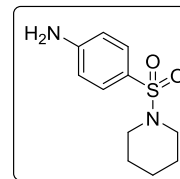
¹H-NMR, COSY (300 MHz, Aceton-*d*₆): $\delta = 7.60\text{--}7.47$ (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 6.77–6.68 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 5.93 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 5.39 (s, 2H, NH₂), 3.29 (quint, $J = 7.4$ Hz, $J = 6.5$ Hz, 1H, CH), 1.03 (d, $J = 6.5$ Hz, 4H, 2 x CH₂) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in DMSO-*d*₆ gemessen.^[407]

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, Aceton-*d*₆): $\delta = 153.0$ (C_q-4), 129.6 (CH-2, CH-6), 129.4 (C_q-1), 113.9 (CH-3, CH-5), 46.2 (CH), 23.8 (2 x CH₂) ppm.

5.4.18 4-(Piperidin-1-ylsulfonyl)anilin (56)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von dem Benzolsulfonsäurechlorid **50** (1.28 g, 4.15 mmol, 1.0 äq.), Piperidin (2.5 mL, 25.1 mmol, 6.0 äq.) und Acetonitril (20 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc 3:1) gereinigt.



Ausbeute: 638 mg (2.65 mmol, 64%), farbloser Feststoff, $R_f = 0.52$ (^CHex/EtOAc 1:1) Schmelzbereich: 169.7–169.9 °C (^CHex/EtOAc 3:1), Schmelzbereich (Lit.^[408]): 164 °C (wässriges Ethanol), C₁₁H₁₆N₂O₂S, (240.32), [240.0932].

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆): $\delta = 7.45\text{--}7.40$ (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 6.79–6.75 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 5.58–5.46 (m, 2H, NH₂), 2.89–2.83 (m, 4H, CH₂-2', CH₂-6'), 1.58 (p, *J* = 5.7 Hz, 4H, CH₂-5', CH₂-3'), 1.43–1.36 (m, 2H, CH₂-4') ppm.

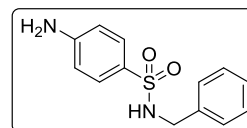
Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[406]

¹³C-NMR (150.9 MHz, Aceton-*d*₆): $\delta = 153.5$ (C_q-4), 130.5 (CH-2, CH-6), 123.1 (C_q-1), 113.8 (CH-3, CH-5), 47.7 (CH₂-2', CH₂-6'), 25.9 (CH₂-3', CH₂-5'), 24.2 (CH₂-4') ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3375, 2940, 2852, 1596, 1503, 1315, 1158, 1146, 1093, 837, 731\text{ cm}^{-1}$.

5.4.19 4-Amino-*N*-benzylbenzolsulfonamid

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (2.64 g, 8.56 mmol, 1.0 äq.), Benzylamin (8.4 mL, 77.3 mmol, 9.0 äq.) und Acetonitril (20 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Heptan/EtOAc 1:1) gereinigt.



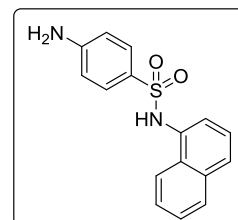
Ausbeute: 625 mg (2.38 mmol, 28%), hellgelber Feststoff, $R_f = 0.27$ (*n*-Heptan/EtOAc 1:1), Schmelzbereich: 117.3–118.7 °C (*n*-Heptan/EtOAc 3:1), Schmelzbereich (Lit.^[409]): 119–120 °C, C₁₃H₁₄N₂O₂S, (262.33), [262.0776].

^1H -NMR, COSY (400 MHz, Aceton- d_6): δ = 7.62–7.54 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 7.32–7.20 (m, 5H, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6'), 6.78–6.72 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 6.49 (t, J = 6.5 Hz, 1H, NH), 5.44 (s, 1H, NH_2), 4.03 (d, J = 6.5 Hz, 2H, CH_2) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, Aceton- d_6): δ = 153.2 (C_q -4), 138.9 (C_q -1'), 129.7 (CH -2, CH -6), 129.1 (CH -3', CH -5'), 128.6 (CH -2', CH -6'), 128.0 (C_q -1), 128.0 (CH -4'), 114.0 (CH -3, CH -5), 47.6 (CH_2) ppm.

5.4.20 4-Amino-*N*-(naphth-1-yl)benzolsulfonamid (57)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (611 mg, 1.98 mmol, 1.0 äq.), 1-Naphthylamin (1.71 g, 12.0 mmol, 6.0 äq.) und Acetonitril (20 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc 5:1) gereinigt.



Ausbeute: 406 mg (1.37 mmol, 69%), grauschwarzer Feststoff, R_f = 0.52 (c Hex/EtOAc 1:1), Schmelzbereich: 187.1–188.4 °C (Dichlormethan), Schmelzbereich (Lit.^[410]): 196 °C (wässriges Ethanol), $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, (298.36), [298.0776].

^1H -NMR, COSY (600 MHz, Methanol- d_6): δ = 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 2H, *H*-8'), 7.80 (d, J = 8.0 Hz, 2H, *H*-5'), 7.71 (d, J = 8.2 Hz, 1H, *H*-4'), 7.45–7.41 (m, 1H, *H*-6'), 7.41–7.37 (m, 1H, *H*-7'), 7.36–7.32 (m, 3H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6, *H*-3'), 7.22 (d, J = 7.4 Hz, 1H, *H*-2'), 6.55–6.51 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (150.9 MHz, Methanol- d_6): δ = 154.2 (C_q -4), 135.8 (C_q -4a'), 134.2 (C_q -1'), 131.4 (C_q -8a'), 130.2 (CH -2, CH -6), 129.0 (CH -5'), 127.8 (CH -4'), 127.1 (C_q -1), 127.1 (CH -6'), 127.0 (CH -7'), 126.3 (CH -3'), 124.8 (CH -2'), 124.2 (CH -8'), 114.1 (CH -3, CH -5) ppm.

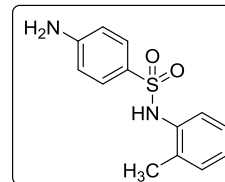
ESI-MS (pos.): 299.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 299.1).

HR-ESI-MS (pos.): 321.0667 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 321.0674).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3381, 3251, 3054, 1597, 1506, 1397, 1306, 1151, 830, 775 cm^{-1} .

5.4.21 4-Amino-*N*-(2-methylphenyl)benzolsulfonamid (58)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (6.61 g, 21.4 mmol, 1.0 äq.), 2-Methylanilin (21 mL, 0.19 mol, 9.0 äq.) und *N,N*-Dimethylformamid (9 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels CombiFlash an Kieselgel (*n*-Heptan/EtOAc 7:1→4:1) gereinigt.



Ausbeute: 813 mg (3.10 mmol, 14%), farbloser Feststoff, R_f = 0.13 (*n*-Heptan/EtOAc 4:1), Schmelzbereich: 129.3–131.2 °C (*n*-Heptan/EtOAc 7:1), Schmelzbereich (Lit.^[410]): 132 °C (wässriges Ethanol), $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, (262.33), [262.0776].

^1H -NMR, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.03 (s, 1H, NH), 7.30–7.21 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 7.16–6.92 (m, 4H, *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6'), 6.59–6.45 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 5.94 (s, 2H, NH₂), 2.01 (s, 3H, CH₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[411]

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ = 153.1 (C_q -4), 136.0 (C_q -2'), 134.1 (C_q -1'), 131.0 (CH-6'), 129.0 (CH-2, CH-6), 126.6 (CH-3'), 126.5 (CH-4'), 126.3 (CH-5'), 126.0 (C_q -1), 112.9 (CH-3, CH-5), 18.1 (CH₃) ppm.²

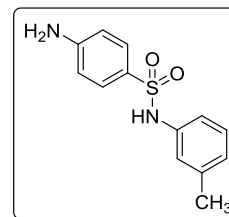
Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[411]

ESI-MS (pos.): 263.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 263.1).

² Genaue Zuordnung der ^{13}C -Signale für die Kohlenstoffatome CH-3', CH-4' und CH-5' aufgrund von Überlappungen nicht möglich.

5.4.22 4-Amino-N-(3-methylphenyl)benzolsulfonamid (59)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (1.04 g, 3.37 mmol, 1.0 äq.), 3-Methylanilin (3.3 mL, 30.4 mmol, 9.0 äq.) und Acetonitril (12 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels CombiFlash an Kieselgel (*n*-Heptan/EtOAc 4:1) gereinigt.



Ausbeute: 404 mg (1.54 mmol, 46%), hellbrauner Feststoff, $R_f = 0.27$ (*n*-Heptan/EtOAc 1:1), Schmelzbereich: 130.4–131.2 °C (*n*-Heptan/EtOAc 4:1), Schmelzbereich (Lit.^[412]): 132.5–133 °C (*n*-Hexan/Ethanol), $C_{13}H_{14}N_2O_2S$, (262.33), [262.0776].

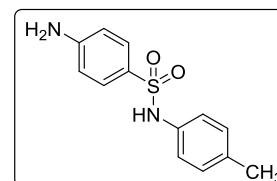
1H -NMR (300 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 8.56$ (s, 1H, NH), 7.55–7.42 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 7.15–7.03 (m, 1H, *H*-5'), 7.07–6.94 (m, 2H, *H*-2', *H*-4'), 6.88–6.78 (m, 1H, *H*-6'), 6.71–6.59 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 5.43 (s, 2H, NH_2), 2.22 (s, 3H, CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[412]

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 153.5$ (C_q -4), 139.5 (C_q -3'), 139.4 (C_q -1'), 129.9 (CH-2, CH-6), 129.6 (CH-5'), 127.1 (C_q -1), 125.3 (CH-6'), 121.6 (CH-2'), 118.1 (CH-4'), 113.8 (CH-3, CH-5), 21.4 (CH_3) ppm.

5.4.23 4-Amino-N-(4-methylphenyl)benzolsulfonamid (60)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (1.67 g, 5.41 mmol, 1.0 äq.), 4-Methylanilin (5.24 g, 48.9 mmol, 9.0 äq.) und Acetonitril (30 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (C Hex/EtOAc 2:1) gereinigt.



Ausbeute: 673 mg (2.57 mmol, 32%), hellbrauner Feststoff, $R_f = 0.50$ (C Hex/EtOAc 1:1, 0.5 Vol% NEt_3), Schmelzbereich: 190.4–193.2 °C (C Hex/EtOAc 2:1), Schmelzbereich (Lit.^[412]): 190–190.5 °C (*n*-Hexan/EtOAc 1:1), $C_{13}H_{14}N_2O_2S$, (262.33), [262.0776].

^1H -NMR, COSY (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9.66 (s, 1H, NH), 7.37–7.31 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-2, H-6), 7.02–6.97 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H-2', H-6'), 6.96–6.91 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H-3', H-5'), 6.53–6.47 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-3, H-5), 5.93 (s, 2H, NH_2), 2.17 (s, 3H, CH_3) ppm.

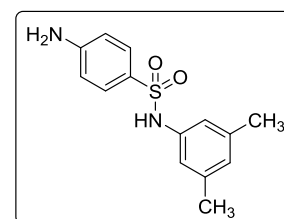
Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[413]

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 152.7 (C_q -4), 135.8 (C_q -1'), 132.5 (C_q -4'), 129.4 (CH-3', CH-5'), 128.7 (CH-2, CH-6), 124.4 (C_q -1), 120.0 (CH-2', CH-6'), 112.5 (CH-3, CH-5), 20.3 (CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[413]

5.4.24 4-Amino-N-(3,5-dimethylphenyl)benzolsulfonamid (61)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (1.02 g, 3.31 mmol, 1.0 äq.), 3,5-Dimethylanilin (3.62 g, 29.9 mmol, 9.0 äq.) und Acetonitril (12 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel ($^n\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1) und mittels HPLC (HPLC-Methode 3) gereinigt.



Ausbeute: 175 mg (0.63 mmol, 19%), farbloser Feststoff, R_f = 0.32 (n -Heptan/ EtOAc 1:1), Schmelzbereich: 151.0–152.3 °C (Acetonitril/ H_2O), Schmelzbereich (Lit.^[412]): 154–154.5 °C (n -Hexan/ EtOAc 1:1), $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, (276.35), [276.0932].

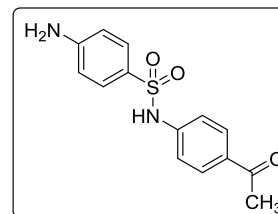
^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9.71 (s, 1H, NH), 7.45–7.32 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-2, H-6), 6.68 (s, 2H, H-2', H-6'), 6.59 (s, 1H, H-4'), 6.58–6.46 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-3, H-5), 5.95 (s, 2H, NH_2), 2.13 (s, 6H, 2 x CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[412]

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 152.7 (C_q -4), 138.4 (C_q -1'), 137.9 (C_q -3', C_q -5'), 128.7 (CH-2, CH-6), 124.8 (CH-4'), 124.6 (C_q -1), 116.9 (CH-2', CH-6'), 112.5 (CH-3, CH-5), 21.0 (2 x CH_3) ppm.

5.4.25 N-(4-Acetylphenyl)-4-aminobenzolsulfonamid (62)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (837 mg, 2.71 mmol, 1.0 äq.), 4-Acetylanilin (3.31 g, 24.5 mmol, 9.0 äq.) und Acetonitril (12 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Heptan/EtOAc 1:1) gereinigt.



Ausbeute: 329 mg (1.13 mmol, 42%), hellbrauner Feststoff, $R_f = 0.34$ (*n*-Heptan/EtOAc 1:1), Schmelzbereich: 190.5–192.1 °C (*n*-Heptan/EtOAc 1:1), Schmelzbereich (Lit.^[414]): 195–199 °C, $C_{14}H_{14}N_2O_3S$, (290.34), [290.0725].

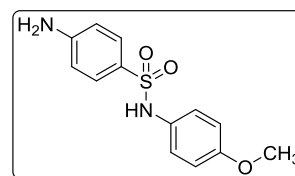
1H -NMR, COSY (300 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 9.20$ (s, 1H, NH), 7.91–7.80 (m, 2H, *H*-3', *H*-5'), 7.64–7.48 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 7.35–7.23 (m, 2H, *H*-2', *H*-6'), 6.73–6.57 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 5.54 (s, 2H, NH_2), 2.48 (s, 3H, CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten wurden in DMSO- d_6 gemessen.^[415]

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 196.6$ (CO), 153.9 (C_q -4), 143.9 (C_q -1'), 133.1 (C_q -4'), 130.5 (CH-3', CH-5'), 130.1 (CH-2, CH-6), 126.4 (C_q -1), 118.8 (CH-2', CH-6'), 113.9 (CH-3, CH-5), 26.4 (CH_3) ppm.

5.4.26 4-Amino-N-(4-methoxyphenyl)benzolsulfonamid (63)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (1.44 g, 4.67 mmol, 1.0 äq.), 4-Anisidin (3.45 g, 28.0 mmol, 6.0 äq.) und Acetonitril (20 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (C Hex/EtOAc 4:1) gereinigt.



Ausbeute: 803 mg (2.89 mmol, 62%), brauner Feststoff, $R_f = 0.50$ (C Hex/EtOAc 1:1), Schmelzbereich: 196.8–197.5 °C (C Hex/EtOAc 4:1), Schmelzbereich (Lit.^[414]): 198 °C, $C_{13}H_{14}N_2O_3S$, (278.33), [278.0725].

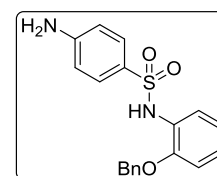
^1H -NMR, COSY (300 MHz, Aceton- d_6): δ = 8.28 (s, 1H, NH), 7.41–7.35 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-2, H-6), 7.11–7.04 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'MM'-Spinsystems, H-2', H-6'), 6.82–6.75 (m, 2H, MM'-Teil eines AA'MM'-Spinsystems, H-3', H-5'), 6.67–6.60 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-3, H-5), 5.42 (s, 2H, NH₂), 3.72 (s, 3H, OCH₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[416]

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, Aceton- d_6): δ = 157.9 (C_q-4'), 153.4 (C_q-4), 132.0 (C_q-1'), 129.9 (CH-2, CH-6), 127.1 (C_q-1), 124.7 (CH-2', CH-6'), 114.9 (CH-3', CH-5'), 113.7 (CH-3, CH-5), 55.6 (OCH₃) ppm.

5.4.27 4-Amino-N-[2-(benzyloxy)phenyl]benzolsulfonamid (65)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (487 mg, 1.58 mmol, 1.0 äq.), 2-Benzyloxyanilin (2.85 g, 14.3 mmol, 9.0 äq.) und Acetonitril (8 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (C_{Hex}/EtOAc 10:1) gereinigt.



Ausbeute: 230 mg (0.65 mmol, 41%, verunreinigt), brauner Feststoff, R_f = 0.61 (C_{Hex}/EtOAc 1:1), Schmelzbereich: 187.1–188.4 °C (Dichlormethan), C₁₉H₁₈N₂O₃S, (354.42), [354.1038].

^1H -NMR, COSY (400 MHz, Aceton- d_6): δ = 7.52 (dd, J = 7.6 Hz, J = 1.7 Hz, 1H, H-6'), 7.45–7.41 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-2, H-6), 7.41–7.35 (m, 2H, H-3'', H-5'', Bn), 7.34–7.29 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-6'', Bn), 6.99 (ddd, J = 8.7 Hz, J = 7.6 Hz, J = 1.7 Hz, 1H, H-4'), 6.92 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 1.5 Hz, H-3'), 6.88 (td, J = 7.6 Hz, J = 1.5 Hz, 1H, H-5'), 6.65–6.60 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-3, H-5), 5.47 (s_{br}, 2H, NH₂), 5.01 (s, 2H, CH₂) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, Aceton- d_6): δ = 152.6 (C_q-4), 149.2 (C_q-2'), 136.7 (C_q-1'', Bn), 128.9 (CH-2, CH-6), 128.3 (CH-3'', CH-5'', Bn), 127.7 (CH-4'', Bn), 127.3 (CH-2'', CH-6'', Bn), 127.0 (C_q-1'), 126.0 (C_q-1), 124.8 (CH-4'), 121.8 (CH-6'), 120.6 (CH-5'), 112.7 (CH-3, CH-5), 112.2 (CH-3'), 69.9 (CH₂) ppm.

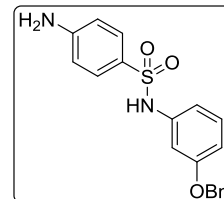
ESI-MS (pos.): 355.3 ($[M+H]^+$, ber.: 355.1).

HR-ESI-MS (pos.): 355.1115 ($[M+Na]^+$, ber.: 355.1117).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3251, 3065, 2923, 2853, 1595, 1497, 1316, 1152, 1091, 830 cm^{-1} .

5.4.28 4-Amino-N-[3-(benzyloxy)phenyl]benzolsulfonamid (64)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Benzolsulfonsäurechlorid **50** (951 mg, 3.08 mmol, 1.0 äq.), 3-Benzyloxyanilin (3.69 g, 18.5 mmol, 6.0 äq.) und Acetonitril (12 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 10:1 $\rightarrow$ 3:1 + 0.5 Vol% NEt_3) gereinigt.



Ausbeute: 132 mg (0.37 mmol, 12%), hellbrauner Feststoff, R_f = 0.43 ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:1), Schmelzbereich: 163.0–163.7 $^{\circ}\text{C}$ ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1 + 0.5 Vol% NEt_3), $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, (354.42), [354.1038].

^1H -NMR, COSY (400 MHz, Aceton- d_6): δ = 8.70 (s_{br} , 1H, NH), 7.50–7.46 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H -3, H -5), 7.46–7.42 (m, 2H, H -2'', H -6''), 7.41–7.35 (m, 2H, H -3'', H -5''), 7.35–7.28 (m, 1H, H -4''), 7.11 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H -5'), 6.93 (t, J = 2.3 Hz, 1H, H -2'), 6.80–6.76 (m, 1H, H -6'), 6.69–6.65 (m, 1H, H -4'), 6.67–6.63 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H -2, H -6), 5.45 (s, 2H, NH_2), 5.04 (s, 2H, CH_2) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, Aceton- d_6): δ = 160.2 (C_q -3'), 153.6 (C_q -1), 140.8 (C_q -1'), 138.1 (C_q -1''), 130.6 (CH -5'), 130.0 (CH -3, CH -5), 129.2 (CH -3'', CH -5''), 128.6 (CH -4''), 128.4 (CH -2'', CH -6''), 126.9 (C_q -4), 113.8 (CH -2, CH -6), 113.2 (CH -6'), 110.8 (CH -4'), 107.4 (CH -2'), 70.3 (CH_2) ppm.

ESI-MS (pos.): 355.3 ($[M+H]^+$, ber.: 355.1).

HR-ESI-MS (pos.): 377.0922 ($[M+Na]^+$, ber.: 377.0936).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3336, 3060, 1594, 1499, 1403, 1320, 1255, 1178, 1147, 1089, 1010, 844 cm^{-1} .

5.4.29 Allgemeine Synthesevorschrift für die Diazotierung und die Azokupplung

5.4.29.1 Synthesevorschrift für die Diazotierung

Angelehnt an eine Synthesevorschrift im *Organikum*.^[398]

Das Amin (1.0 äq.) wird in 6 M HCl bei <50 °C 10 Minuten kräftig gerührt. Die Lösung/Suspension wird auf 0 °C gekühlt und unter kräftigem Rühren 2.5 M Natriumnitrit-Lösung (1.0 äq.) so zugegeben, dass die Temperatur <5 °C bleibt. Nach 5 Minuten wird mit Kaliumiodid-Stärke-Papier auf freies Nitrit geprüft und solange 2.5 M Natriumnitrit-Lösung zugegeben bis der Nachweis 5 Minuten nach der Zugabe positiv ausfällt. Überschüssiges Nitrit wird durch Zugabe von Sulfamidsäure zerstört.

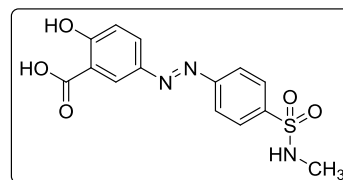
5.4.29.2 Synthesevorschrift für die Azokupplung

Angelehnt an eine Synthesevorschrift im *Organikum*.^[398]

Salicylsäure (32) (1.0 äq.) wird in 2 M Natriumhydroxid-Lösung gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Während die zuvor hergestellte Diazonium-Lösung unter kräftigem Rühren zügig zu der Lösung zugetropft wird, werden die Temperatur bei 5–10 °C und der pH-Wert durch die Zugabe von 2 M Natriumhydroxid-Lösung bei 10 gehalten. Die Lösung wird 10 Minuten gerührt und mit 6 M HCl angesäuert (pH-Wert: 3–6). Der Niederschlag wird filtriert, mit kaltem Wasser gewaschen, in Ethylacetat gelöst und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel oder mittels HPLC gereinigt.

5.4.30 5-[(E)-[4-(Methylsulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (71)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (32) (308 mg, 2.23 mmol, 1.0 äq.), 4-Amino-N-methylbenzolsulfonamid (415 mg, 2.23 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (12 mL) und 2 M Natriumhydroxid-



Lösung (3.3 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.

Ausbeute: 385 mg (1.15 mmol, 52%), orangefarbener Feststoff, $R_f = 0.18$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), $C_{14}H_{13}N_3O_5S$, (335.33), [335.0576].

^1H -NMR, COSY (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.37 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H -6), 8.11 (dd, J = 8.9, J = 2.6 Hz, 1H, H -4), 8.07–8.00 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H -2', H -6'), 8.00–7.93 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H -3', H -5'), 7.62 (q, J = 5.0 Hz, 1H, NH), 7.18 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H -3), 2.47 (d, J = 5.0 Hz, 3H, CH_3) ppm.

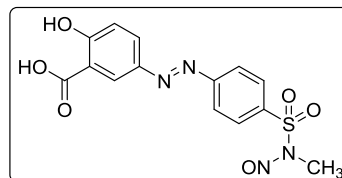
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO- d_6): δ = 171.2 (COOH), 164.2 (C_q -2), 153.7 (C_q -1'), 144.5 (C_q -5), 140.8 (C_q -4'), 129.1 (CH-4), 128.1 (CH-3', CH-5'), 126.5 (CH-6), 123.0 (CH-2', CH-6'), 118.6 (CH-3), 113.9 (C_q -1), 28.7 (CH_3) ppm.

ESI-MS (pos.): 336.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 336.1).

HR-ESI-MS (pos.): 358.0478 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 358.0474).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3097, 2923, 2853, 1679, 1588, 1483, 1304, 1203, 1167, 1147, 843, 805 cm^{-1} .

5-[(*E*)-[4-(Methyl(nitroso)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (72) wurde als Nebenprodukt isoliert



Ausbeute: 11 mg (28.7 μmol , 2%), orangefarbener Feststoff, R_f = 0.31 (EtOAc/EtOH/ H_2O 17:2:1), Schmelzbereich: $>212^\circ\text{C}$ (Zersetzung), $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$, (364.33), [364.0478].

^1H -NMR, COSY (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.39 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H -6), 8.26–8.18 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H -2', H -6'), 8.12 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, H -4), 8.13–8.05 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H -3', H -5'), 7.18 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H -3), 3.20 (s, 1H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO- d_6): δ = 171.1 (COOH), 164.7 (C_q -2), 155.3 (C_q -1'), 144.5 (C_q -5), 137.0 (C_q -4'), 129.5 (CH-3', CH-5'), 129.2 (CH-4), 127.0 (CH-6), 123.7 (CH-2', CH-6'), 118.7 (CH-3), 114.1 (C_q -1), 29.8 (CH_3) ppm.

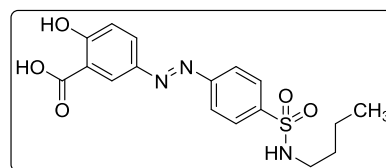
ESI-MS (pos.): 336.1 ($[M-NO+H]^+$, ber.: 336.1), 365.0 ($[M+H]^+$, ber.: 365.1).

HR-ESI-MS (pos.): 365.0541 ($[M+H]^+$, ber.: 365.0556).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3063, 2921, 2854, 1673, 1451, 1381, 1174, 1149, 1086, 848, 725, 673 cm^{-1} .

5.4.31 5-[(E)-[4-(Butylsulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (73)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (131 mg, 947 μmol , 1.0 äq.), Benzolsulfonamid **49** (216 mg, 947 μmol , 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (4 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (3 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 3) gereinigt.



Ausbeute: 98 mg (259 μmol , 28%), orangebrauner Feststoff, R_f = 0.27 (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$, (377.42), [377.1045].

^1H -NMR, COSY (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.37 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H -6), 8.09 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, H -4), 8.03–8.00 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H -2', H -6'), 7.97–7.95 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H -3', H -5'), 7.74 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH), 7.13 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H -3), 2.80–2.76 (m, 2H, NHCH_2), 1.38–1.32 (m, 2H, CH_2), 1.27–1.20 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.79 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (150.9 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 171.1 (COOH), 165.1 (C_q -2), 153.7 (C_q -1'), 144.2 (C_q -5), 141.9 (C_q -4'), 128.9 (CH-4), 127.9 (CH-3', CH-5'), 126.6 (CH-6), 122.9 (CH-2', CH-6'), 118.6 (CH-3), 114.7 (C_q -1), 42.3 (NHCH_2), 31.1 (CH_2), 19.3 (CH_2CH_3), 13.5 (CH_3) ppm.

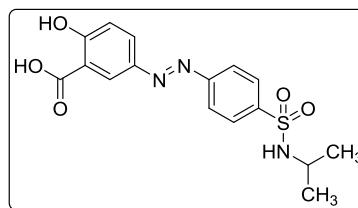
ESI-MS (pos.): 378.1 ($[M+H]^+$, ber.: 378.1).

HR-ESI-MS (pos.): 378.1115 ($[M+H]^+$, ber.: 378.1118).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2958, 2929, 2873, 1586, 1489, 1436, 1302, 1160, 1145, 1090, 843 cm^{-1} .

5.4.32 5-[(*E*)-[4-(Propan-2-ylsulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (74)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (384 mg, 2.78 mmol, 1.0 äq.), Benzolsulfonamid **53** (595 mg, 2.78 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (2 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (4.2 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 3) gereinigt.



Ausbeute: 434 mg (1.19 mmol, 43%), orangefarbener Feststoff, $R_f = 0.14$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), $C_{16}H_{17}N_3O_5S$, (363.39), [363.0889].

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.38$ (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-6$), 8.11 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-4$), 8.05–8.00 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-2'$, $H-6'$), 8.00–7.96 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-3'$, $H-5'$), 7.76 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NH), 7.18 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, $H-3$), 3.37–3.22 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 0.97 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, $CH(CH_3)_2$) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.2$ (COOH), 164.3 (C_q-2), 153.6 (C_q-1'), 144.4 (C_q-5), 143.4 (C_q-4'), 129.1 (CH-4), 127.8 (CH-3', CH-5'), 126.4 (CH-6), 122.9 (CH-2', CH-6'), 118.6 (CH-3), 114.0 (C_q-1), 45.4 ($CH(CH_3)_2$), 23.2 ($CH(CH_3)_2$) ppm.

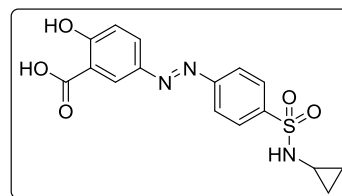
ESI-MS (pos.): 364.2 ($[M+H]^+$, ber.: 364.1).

HR-ESI-MS (pos.): 364.0966 ($[M+H]^+$, ber.: 364.0967).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2977, 2928, 1678, 1589, 1483, 1427, 1329, 1173, 1142, 1090, 1004, 846$ cm^{-1} .

5.4.33 5-[(E)-[4-(Cyclopropylsulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (75)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (32) (202 mg, 1.46 mmol, 1.0 äq.), Benzolsulfonamid 55 (310 mg, 1.46 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (2 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (2.2 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.



Ausbeute: 115 mg (3.19 mmol, 22%), orangebrauner Feststoff, $R_f = 0.20$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzpunkt: $>165\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zersetzung), $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$, (361.37), [361.0732].

^1H -NMR, COSY (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 8.39$ (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, $H-6$), 8.13 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H, $H-4$), 8.08–8.03 (m, 3H, $H-3'$, $H-5'$, NH), 8.02–7.97 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-2'$, $H-6'$), 7.19 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, $H-3$), 2.21–2.12 (m, 1H, NHCH), 0.55–0.46 (m, 2H, CH_2), 0.44–0.35 (m, 2H, CH_2) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 171.2$ (COOH), 164.3 (C_q-2), 153.8 (C_q-4'), 144.4 (C_q-5), 141.7 (C_q-1'), 129.1 (CH-3), 128.2 (CH-2', CH-6'), 126.5 (CH-6), 122.9 (CH-3', CH-5'), 118.6 (CH-4), 114.0 (C_q-1), 24.1 (NHCH), 5.2 ($2 \times \text{CH}_2$) ppm.

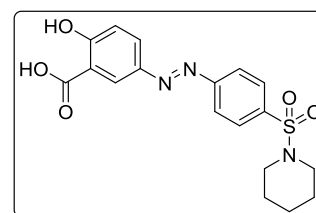
ESI-MS (pos.): 362.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 362.1).

HR-ESI-MS (pos.): 384.0641 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 384.0630).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3263, 3017, 2926, 2855, 1588, 1483, 1304, 1206, 1149, 1092, 845\text{ cm}^{-1}$.

5.4.34 5-[(E)-[4-Piperidin-1-ylsulfonyl]phenyl]diazenyl]salicylsäure (76)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (32) (116 mg, 836 μmol , 1.0 äq.), Benzolsulfonamid 56 (201 mg, 836 μmol , 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (4 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (2 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.



Ausbeute: 310 mg (0.80 mmol, 95%), orangebrauner Feststoff, $R_f = 0.22$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzpunkt: 244–245 °C, $C_{18}H_{19}N_3O_5S$, (389.43), [389.1045].

1H -NMR, COSY (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.39$ (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-6$), 8.12 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-4$), 8.09–8.01 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-2'$, $H-6'$), 7.96–7.88 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-3'$, $H-5'$), 7.18 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, $H-3$), 2.95 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H, $H-2''$, $H-6''$), 1.55 (quint, $J = 5.6$ Hz, 4H, CH_2-3'' , CH_2-5''), 1.40–1.36 (m, 2H, CH_2-4'') ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.1$ (COOH), 164.5 (C_q-2), 154.0 (C_q-1'), 144.4 (C_q-5), 137.0 (C_q-4'), 129.1 (CH-4), 128.9 (CH-3', CH-5'), 126.6 (CH-6), 123.0 (CH-2', CH-6'), 118.6 (CH-3), 114.1 (C_q-1), 46.6 (CH_2-2 , CH_2-6), 24.7 (CH_2-3 , CH_2-5), 22.8 (CH_2-4) ppm.

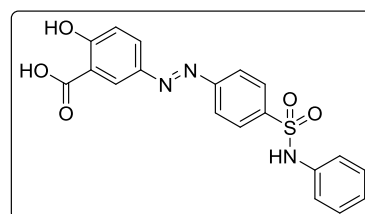
ESI-MS (pos.): 390.4 ($[M+H]^+$, ber.: 390.1).

HR-ESI-MS (pos.): 412.0928 ($[M+Na]^+$, ber.: 412.0943).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3060, 2941, 2852, 1660, 1448, 1337, 1308, 1204, 1148, 1091, 932, 839$ cm^{-1} .

5.4.35 5-[(E)-[4-(Phenylsulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (77)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (32) (326 mg, 2.36 mmol, 1.0 äq.), 4-Amino-*N*-phenylbenzolsulfonamid (585 mg, 2.36 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (20 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (10 mL) gearbeitet.



Ausbeute: 815 mg (2.05 mmol, 87%), dunkelroter Feststoff, $R_f = 0.14$ (EtOAc/EtOH/ H_2O 40:2:1), Schmelzbereich: 242.1–242.9 °C, $C_{19}H_{15}N_3O_5S$, (397.41), [397.0732].

1H -NMR, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.37$ (s, 1H, NH), 8.28 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, $H-6$), 7.88–7.86 (m, 4H, $H-2'$, $H-3'$, $H-5'$, $H-6'$), 7.81 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.7$ Hz, 1H,

H-4), 7.27–7.20 (m, 2H, *H*-3", *H*-5"), 7.18–7.09 (m, 2H, *H*-2", *H*-6"), 7.07–7.00 (m, 1H, *H*-4"), 6.76 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, *H*-3) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170.6 (COOH), 170.5 (C_q-2), 154.6 (C_q-1'), 142.3 (C_q-5), 139.5 (C_q-4'), 137.5 (C_q-1"), 129.2 (CH-2", CH-6"), 128.1 (CH-3', CH-5'), 127.1 (CH-4, CH-6), 124.3 (CH-4"), 122.3 (CH-2', CH-6'), 120.4 (CH-3", CH-5"), 118.9 (C_q-1), 118.3 (CH-3) ppm.

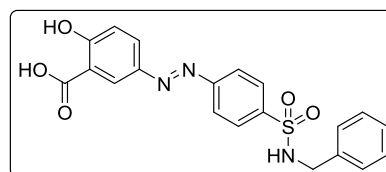
ESI-MS (pos.): 398.2 ([M+H]⁺, ber.: 398.1).

HR-ESI-MS (pos.): 420.0639 ([M+Na]⁺, ber.: 420.0630).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3085, 2969, 2887, 1586, 1489, 1397, 1302, 1143, 1088, 921, 837 cm⁻¹.

5.4.36 5-[(*E*)-[4-(Benzylsulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (78)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (330 mg, 2.38 mmol, 1.0 äq.), 4-Amino-*N*-benzylbenzolsulfonamid (625 mg, 2.38 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (2 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (3.6 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Heptan/EtOAc 3:1 + 0.5 Vol% AcOH) und mittels HPLC (HPLC-Methode 2) gereinigt.



Ausbeute: 300 mg (0.73 mmol, 31%), orangebrauner Feststoff, *R*_f = 0.29 (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzpunkt: >200 °C (Zersetzung), C₂₀H₁₇N₃O₅S, (411.43), [411.0889].

¹H-NMR, COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.37 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, *H*-6), 8.32 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, NH), 7.95 (s, 4H, *H*-2', *H*-3', *H*-5', *H*-6'), 7.96–7.92 (m, 1H, *H*-4), 7.33–7.15 (m, 5H, *H*-2", *H*-3", *H*-4", *H*-5", *H*-6"), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, *H*-3), 4.05 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170.9 (COOH), 168.4 (C_q-2), 154.1 (C_q-1'), 143.0 (C_q-5), 141.3 (C_q-4'), 137.6 (C_q-1"), 128.2 (CH-3", CH-5"), 127.9

(CH-3', CH-5'), 127.7 (CH-4), 127.6 (CH-2'', CH-6''), 127.2 (CH-4''), 126.8 (CH-6), 122.5 (CH-2', CH-6'), 118.3 (CH-3), 117.6 (C_q-1), 46.2 (CH₂) ppm.

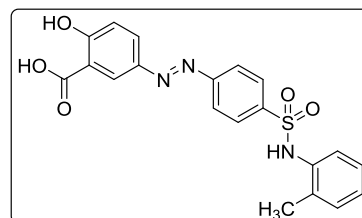
ESI-MS (pos.): 412.1 ([M+H]⁺, ber.: 412.1).

HR-ESI-MS (pos.): 412.0958 ([M+H]⁺, ber.: 412.0962).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2989, 2926, 1627, 1587, 1485, 1427, 1326, 1163, 1144, 1091, 840, 732 cm⁻¹.

5.4.37 5-[(E)-[4-((2-Methylphenyl)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (79)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (32) (164 mg, 1.19 mmol, 1.0 äq.), Benzolsulfonamid 58 (312 mg, 1.19 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (4 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (1.8 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.



Ausbeute: 154 mg (374 μ mol, 32%), orangebrauner Feststoff, R_f = 0.25 (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzpunkt: >220 °C (Zersetzung), C₂₀H₁₇N₃O₅S, (411.43), [411.0889].

¹H-NMR, COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.75 (s, 1H, NH), 8.37 (d, J = 2.6 Hz, 1H, *H*-6), 8.11 (dd, J = 8.9, J = 2.6 Hz, 1H, *H*-4), 8.00–7.97 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 7.84–7.81 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 7.18 (d, J = 8.9 Hz, 1H, *H*-3), 7.17–7.13 (m, 1H, *H*-3''), 7.13–7.08 (m, 2H, *H*-5'', *H*-6''), 7.00–6.96 (m, 1H, *H*-4''), 2.01 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.2 (COOH), 164.3 (C_q-2), 153.8 (C_q-1'), 144.4 (C_q-5), 141.9 (C_q-4'), 134.5 (C_q-2''), 134.4 (C_q-1''), 130.8 (CH-3''), 129.1 (CH-4), 128.0 (CH-3', CH-5'), 126.7 (CH-4'', CH-6''), 126.5 (CH-5''), 126.4 (CH-6), 122.9 (CH-2', CH-6'), 118.6 (CH-3), 114.0 (C_q-1), 17.6 (CH₃) ppm.

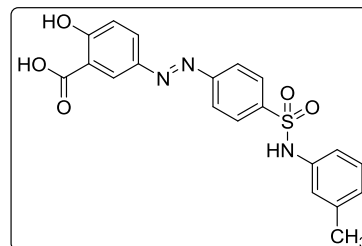
ESI-MS (pos.): 412.4 ([M+H]⁺, ber.: 412.1).

HR-ESI-MS (pos.): 434.0797 ([M+Na]⁺, ber.: 434.0787).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3249, 3071, 2924, 2859, 1669, 1489, 1461, 1396, 1308, 1149, 1087, 845 cm^{-1} .

5.4.38 5-[(E)-[4-((3-Methylphenyl)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (**80**)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (150 mg, 1.09 mmol, 1.0 äq.), Benzolsulfonamid **59** (285 mg, 1.09 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (2 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (1.6 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.



Ausbeute: 102 mg (248 μmol , 23%), orangefarbener Feststoff, R_f = 0.27 (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzpunkt: >212 °C (Zersetzung), $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$, (411.43), [411.0889].

^1H -NMR, COSY (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 10.34 (s, 1H, NH), 8.34 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H -6), 8.07 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, H -4), 7.96–7.94 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H -3', H -5'), 7.94–7.92 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H -2', H -6'), 7.16 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H -3), 7.11 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H -5''), 6.95–6.90 (m, 2H, H -2'', H -6''), 6.85 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H -4'), 2.19 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 171.2 (COOH), 164.3 (C_q -2), 153.9 (C_q -4'), 144.4 (C_q -5), 140.9 (C_q -1'), 138.6 (C_q -3''), 137.4 (C_q -1''), 129.1 (CH-5''), 129.0 (CH-4), 128.1 (CH-2', CH-6'), 126.5 (CH-6), 125.1 (CH-4''), 122.9 (CH-3', CH-5'), 120.8 (CH-2''), 118.6 (CH-3), 117.3 (CH-6''), 113.9 (C_q -1), 21.0 (CH_3) ppm.

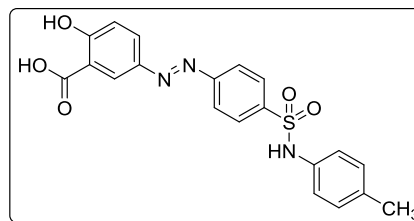
ESI-MS (pos.): 412.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 412.1).

HR-ESI-MS (pos.): 434.0785 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 434.0787).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3258, 3096, 1675, 1590, 1483, 1305, 1172, 1147, 1090, 846 cm^{-1} .

5.4.39 5-[(*E*)-[4-((4-Methylphenyl)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (**81**)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (394 mg, 2.85 mmol, 1.0 äq.), Benzolsulfonamid **60** (747 mg, 2.85 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (1.8 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (4.3 mL) gearbeitet. Das



Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc 1:1 + 1.0 Vol% AcOH) gereinigt und mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.

Ausbeute: 310 mg (0.75 mmol, 26%), orangefarbener Feststoff, $R_f = 0.28$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzpunkt: >223 °C (Zersetzung), C₂₀H₁₇N₃O₅S, (411.43), [411.0889].

¹H-NMR, COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 10.23$ (s, 1H, NH), 8.35 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, *H*-6), 8.08 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, *H*-4), 7.97–7.92 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 7.91–7.86 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 7.17 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, *H*-3), 7.07–7.02 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3'', *H*-5''), 7.01–6.96 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2'', *H*-6''), 2.18 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 171.2$ (COOH), 164.3 (C_q-2), 153.8 (C_q-1'), 144.4 (C_q-5), 140.8 (C_q-4'), 134.7 (C_q-1''), 133.8 (C_q-4''), 129.7 (CH-3'', CH-5''), 129.1 (CH-4), 128.1 (CH-3', CH-5'), 126.5 (CH-6), 122.9 (CH-2', CH-6'), 121.0 (CH-2'', CH-6''), 118.6 (CH-3), 113.9 (C_q-1), 20.3 (CH₃) ppm.

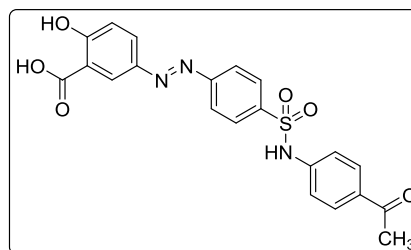
ESI-MS (pos.): 412.4 ([M+H]⁺, ber.: 412.1).

HR-ESI-MS (pos.): 434.0786 ([M+Na]⁺, ber.: 434.0787).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3254, 3066, 3036, 1667, 1578, 1487, 1453, 1165, 1150, 1087, 847$ cm⁻¹.

5.4.40 5-[(E)-[4-((4-Acetylphenyl)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (**82**)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (157 mg, 1.13 mmol, 1.0 äq.), Benzolsulfonamid **62** (329 mg, 1.13 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (5 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (3 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.



Ausbeute: 95 mg (216 μ mol, 19%), orangefarbener Feststoff, $R_f = 0.18$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), $C_{21}H_{17}N_3O_6S$, (439.44), [439.0838].

1H -NMR, COSY (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11.00$ (s, 1H, NH), 8.34 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-6$), 8.08 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-4$), 8.03–7.97 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-3'$, $H-5'$), 8.00–7.96 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-2'$, $H-6'$), 7.88–7.82 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, $H-3''$, $H-5''$), 7.28–7.22 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, $H-2''$, $H-6''$), 7.16 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, $H-3$), 2.46 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 196.5$ (CO), 171.1 (COOH), 164.4 (C_q-2), 154.1 (C_q-1'), 144.4 (C_q-5), 141.9 (C_q-1''), 140.5 (C_q-4'), 132.2 (C_q-4''), 129.9 (CH-3'', CH-5''), 129.1 (CH-4), 128.2 (CH-3', CH-5'), 126.6 (CH-6), 123.1 (CH-2', CH-6'), 118.6 (CH-3), 118.3 (CH-2'', CH-6''), 114.0 (C_q-1), 26.4 (CH_3) ppm.

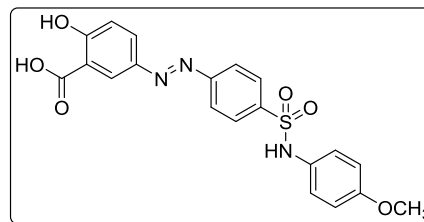
ESI-MS (pos.): 440.3 ($[M+H]^+$, ber.: 440.1).

HR-ESI-MS (pos.): 440.0917 ($[M+H]^+$, ber.: 440.0916).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3259, 3060, 2938, 1700, 1654, 1602, 1470, 1161, 1146, 1087, 919, 842$ cm^{-1} .

5.4.41 5-[(*E*)-[4-((4-Methoxyphenyl)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (**83**)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (208 mg, 1.50 mmol, 1.0 äq.), Benzolsulfonamid **63** (418 mg, 1.50 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (5 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (3 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.



Ausbeute: 209 mg (489 μ mol, 32%), rotbrauner Feststoff, R_f = 0.20 (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzpunkt: >232 °C (Zersetzung), $C_{20}H_{17}N_3O_6S$, (427.43), [427.0838].

1H -NMR, COSY (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.03 (s, 1H, NH), 8.35 (d, J = 2.6 Hz, 1H, *H*-6), 8.09 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, *H*-4), 8.00–7.92 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 7.90–7.80 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 7.17 (d, J = 8.9 Hz, 1H, *H*-3), 7.05–6.96 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'MM'-Spinsystems, *H*-2'', *H*-6''), 6.85–6.77 (m, 2H, MM'-Teil eines AA'MM'-Spinsystems, *H*-3'', *H*-5''), 3.66 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO- d_6): δ = 171.2 (COOH), 164.3 (C_q -2), 156.7 (C_q -4''), 153.8 (C_q -1'), 144.4 (C_q -5), 140.8 (C_q -4'), 129.7 (C_q -1''), 129.1 (CH-4), 128.2 (CH-3', CH-5'), 126.5 (CH-6), 123.9 (CH-2'', CH-6''), 122.8 (CH-2', CH-6'), 118.6 (CH-3), 114.4 (CH-3'', CH-5''), 114.0 (C_q -1), 55.1 (OCH_3) ppm.

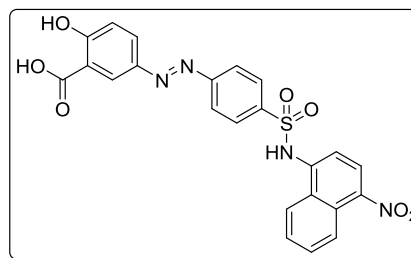
ESI-MS (pos.): 428.4 ($[M+H]^+$, ber.: 428.4).

HR-ESI-MS (pos.): 428.0927 ($[M+H]^+$, ber.: 428.0916).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3256, 3032, 3012, 2839, 1674, 1508, 1442, 1338, 1254, 1220, 1164, 848 cm^{-1} .

5.4.42 5-[(E)-[4-((4-Nitronaphthalen-1-yl)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (84)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (86 mg, 0.62 mmol, 1.0 äq.), Benzolsulfonamid **57** (185 mg, 0.62 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (4 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (2 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.



Ausbeute: 37 mg (74 μ mol, 12%), orangerotes Öl, R_f = 0.11 (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), $C_{23}H_{16}N_4O_7S$, (492.46), [492.0740].

1H -NMR, COSY (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.39–8.35 (m, 1H, H -5''), 8.34 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H -6), 8.28 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H -3''), 8.25 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H -8''), 8.08 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, H -4), 7.96 (s, 4H, H -2', H -3', H -5', H -6'), 7.77 (ddd, J = 8.5 Hz, J = 6.9 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, H -6''), 7.67 (ddd, J = 8.6 Hz, J = 6.9 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, H -7''), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H -2''), 7.16 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H -3) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO- d_6): δ = 171.2 (COOH), 164.4 (C_q -2), 154.1 (C_q -1'), 144.4 (C_q -5), 143.5 (C_q -4''), 140.8 (C_q -4'), 138.4 (C_q -1''), 129.9 (CH-6''), 129.1 (CH-4), 128.4 (C_q -8a''), 128.2 (CH-3', CH-5'), 127.6 (CH-7''), 126.6 (CH-6), 125.2 (C_q -4a''), 124.7 (CH-3''), 123.8 (CH-8''), 123.1 (CH-2', CH-6'), 122.7 (CH-5''), 119.3 (CH-2''), 118.6 (CH-3), 114.0 (C_q -1) ppm.

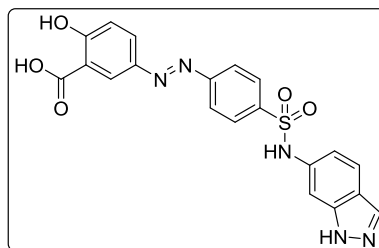
ESI-MS (pos.): 493.1 ($[M+H]^+$, ber.: 493.1).

HR-ESI-MS (pos.): 493.0819 ($[M+H]^+$, ber.: 493.0818).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2925, 1667, 1519, 1480, 1334, 1262, 1167, 1023, 987, 822, 765 cm^{-1} .

5.4.43 5-[(*E*)-[4-(1*H*-Indazol-6-ylsulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (85)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (163 mg, 1.18 mmol, 1.0 äq.), 4-Amino-*N*-(1*H*-indazol-6-yl)benzolsulfonamid (339 mg, 1.18 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (6 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (2 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.



Ausbeute: 189 mg (432 μ mol, 37%), orangefarbener Feststoff, R_f = 0.06 (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzpunkt: 244–245°C (Zersetzung), $C_{20}H_{15}N_5O_5S$, (437.43), [437.0794].

$^1\text{H-NMR}$, COSY (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 12.89 (s, 1H, COOH), 10.54 (s, 1H, NH), 8.33 (d, J = 2.6 Hz, 1H, *H*-6), 8.06 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, *H*-4), 7.96–7.91 (m, 5H, *H*-2', *H*-3', *H*-5', *H*-6', *H*-3''), 7.62 (dd, J = 8.7 Hz, J = 0.7 Hz, 1H, *H*-4''), 7.29–7.26 (m, 1H, *H*-7''), 7.15 (d, J = 8.9 Hz, 1H, *H*-3), 6.91 (dd, J = 8.7 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, *H*-5'') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (100.6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 171.1 (COOH), 164.4 (C_q -2), 153.9 (C_q -1'), 144.4 (C_q -5), 140.7 (C_q -4'), 140.1 (C_q -7a''), 135.7 (C_q -6''), 133.4 (CH-3''), 129.1 (CH-4), 128.1 (CH-3', CH-5'), 126.5 (CH-6), 122.9 (CH-2', CH-6'), 121.4 (CH-4''), 120.0 (C_q -3a''), 118.6 (CH-3), 115.1 (CH-5''), 114.0 (C_q -1), 100.6 (CH-7'') ppm.

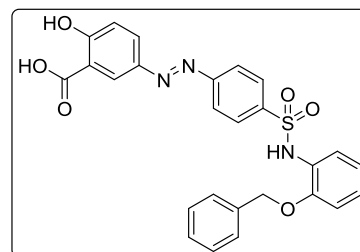
ESI-MS (pos.): 438.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 438.1).

HR-ESI-MS (pos.): 438.0869 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 438.0872).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3287, 3067, 1638, 1584, 1482, 1372, 1337, 1259, 1156, 1142, 1082, 848 cm^{-1} .

5.4.44 5-[(*E*)-[4-((2-(Benzyloxy)phenyl)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (**86**)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (78 mg, 562 μ mol, 1.0 äq.), Benzolsulfonamid **65** (199 mg, 562 μ mol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (3 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (2 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt.



Ausbeute: 14 mg (27 μ mol, 5%), orangerores Öl, R_f = 0.30 (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), $C_{26}H_{21}N_3O_6S$, (503.53), [503.1151].

1H -NMR, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.76 (s, 1H, NH), 8.36 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H -3), 8.10 (dd, J = 8.9, J = 2.6 Hz, 1H, H -4), 7.81 (s, 4H, H -2', H -3', H -5', H -6'), 7.34–7.20 (m, 6H, H -6'', H -2''', H -3''', H -4''', H -5''', H -6'''), 7.19 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H -6), 7.16–7.09 (m, 1H, H -4''), 6.97–6.92 (m, 1H, H -3''), 6.93–6.87 (m, 1H, H -5''), 4.87 (s, 2H, CH_2) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ = 171.1 (CO), 164.2 (C_q -2), 153.6 (C_q -1'), 151.7 (C_q -2''), 144.3 (C_q -5), 142.0 (C_q -4'), 136.6 (C_q -1'''), 129.0 (CH-4), 128.0 (CH-3''', CH-5'''), 127.9 (CH-3', CH-5'), 127.4 (CH-4'''), 127.1 (CH-4''), 127.1 (CH-2''', CH-6'''), 126.6 (CH-6''), 126.3 (CH-3), 124.8 (C_q -1''), 122.5 (CH-2', CH-6'), 120.5 (CH-5''), 118.5 (CH-6), 113.9 (C_q -1), 112.8 (CH-3''), 69.1 (CH_2) ppm.

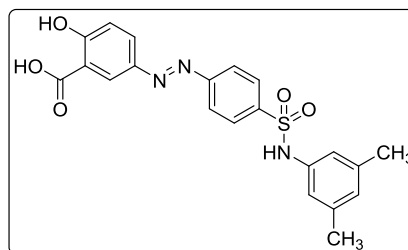
ESI-MS (pos.): 504.6 ($[M+H]^+$, ber.: 504.1).

HR-ESI-MS (pos.): 504.1239 ($[M+H]^+$, ber.: 504.1229).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3259, 3066, 2925, 2854, 1589, 1497, 1341, 1255, 1168, 1111, 1023, 846 cm^{-1} .

5.4.45 5-[(E)-[4-((3,5-Dimethylphenyl)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (87)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (88 mg, 0.63 mmol, 1.0 äq.), Benzolsulfonamid **61** (175 mg, 0.63 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (2 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (1.5 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird zweimal mittels HPLC (HPLC-Methode 1 und HPLC-Methode 2) gereinigt.



Ausbeute: 11 mg (4%, verunreinigt), rotorangenes Öl, $R_f = 0.08$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), $C_{21}H_{19}N_3O_5S$, (425.46), [425.1045].

1H -NMR, COSY (600 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.30$ (s, 1H, NH), 8.35 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-6$), 8.08 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-4$), 7.98–7.95 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-2'$, $H-6'$), 7.94–7.91 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-3'$, $H-5'$), 7.15 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, $H-3$), 6.74 (s, 2H, $H-2''$, $H-6''$), 6.67 (s, 1H, $H-4''$), 2.15 (s, 6H, $2 \times CH_3$) ppm.

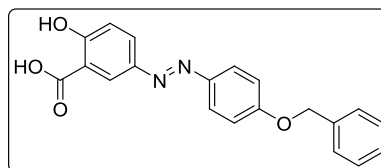
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (150.9 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.2$ (COOH), 164.7 (C_q-2), 153.9 (C_q-1'), 144.3 (C_q-5), 140.9 (C_q-4'), 138.3 ($CH-3''$, $CH-5''$), 137.3 (C_q-1''), 129.0 ($CH-4$), 128.2 ($CH-3'$, $CH-5'$), 126.6 ($CH-6$), 125.9 ($CH-4''$), 122.9 ($CH-2'$, $CH-6'$), 118.6 ($CH-3$), 117.8 ($CH-2''$, $CH-6''$), 114.3 (C_q-1), 21.0 ($2 \times CH_3$) ppm.

ESI-MS (pos.): 426.4 ($[M+H]^+$, ber.: 426.1).

HR-ESI-MS (pos.): 426.1128 ($[M+H]^+$, ber.: 426.1124).

5.4.46 5-[(E)-[4-(Benzyloxy)phenyl]diazenyl]salicylsäure (88)

Es wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift ausgehend von Salicylsäure (**32**) (262 mg, 1.90 mmol, 1.0 äq.), 4-Benzyloxyanilin **70** (682 mg, 1.90 mmol, 1.0 äq.), 6 M Salzsäure (6 mL) und 2 M Natriumhydroxid-Lösung (3 mL) gearbeitet. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 3) gereinigt.



Ausbeute: 644 mg (1.85 mmol, 98%), orangebrauner Feststoff, $R_f = 0.22$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzpunkt: 210–212 °C (Wasser/Acetonitril), $C_{20}H_{16}N_2O_4$, (348.36), [348.1110].

1H -NMR, COSY (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.28$ (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-6$), 8.02 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, $H-4$), 7.88–7.83 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-2'$, $H-6'$), 7.52–7.44 (m, 2H, $H-2''$, $H-6''$), 7.44–7.38 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, $H-3''$, $H-5''$), 7.37–7.32 (m, 1H, $H-4''$), 7.21–7.16 (m, 2H, $H-3'$, $H-5'$), 7.13 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, $H-3$), 5.20 (s, 2H, CH_2) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.5$ (COOH), 163.0 (C_q-2), 160.8 (C_q-4'), 146.1 (C_q-1'), 144.6 (C_q-5), 136.6 (C_q-1'' , Bn), 128.8 (CH-4), 128.5 (CH-3'', CH-5'', Bn), 128.0 (CH-4'', Bn), 127.8 (CH-2'', CH-3'', Bn), 125.2 (CH-6), 124.3 (CH-2', CH-6'), 118.3 (CH-3), 115.4 (CH-3', CH-5'), 113.5 (C_q-1), 69.7 (CH_2) ppm.

ESI-MS (pos.): 349.1 ($[M+H]^+$, ber.: 349.1).

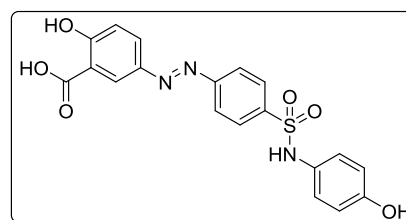
HR-ESI-MS (pos.): 349.1188 ($[M+H]^+$, ber.: 349.1183).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3061, 2922, 2853, 1675, 1600, 1498, 1454, 1240, 1205, 1000, 841\text{ cm}^{-1}$.

5.4.47 5-[(E)-[4-((4-Hydroxyphenyl)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (89)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Shrestha.^[417]

Eine Suspension von Methylarylether **83** (132 mg, 308 μmol , 1.0 äq.) in trockenem Dichlormethan (10 mL) wird auf -78°C gekühlt und Bortribromid (1 M in CH_2Cl_2 , 860 μL , 647 μmol , 2.1 äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird 24 Stunden gerührt, während sie



langsam Raumtemperatur erreicht. Es wird unter Eiskühlung 1 M HCl (3 mL) zugegeben und mit Ethylacetat (10 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser ($2 \times 3\text{ mL}$) und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (3 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 4) gereinigt.

Ausbeute: 88 mg (213 μmol , 69%), hellbrauner Feststoff, $R_f = 0.58$ (EtOAc/EtOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzpunkt: $>207^\circ\text{C}$ (Zersetzung), C₁₉H₁₅N₃O₆S, (413.40), [413.0682].

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 9.86$ (s, 1H, NH), 8.36 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, *H*-6), 8.09 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H, *H*-4), 8.00–7.90 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 7.87–7.78 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 7.17 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, *H*-3), 6.91–6.82 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'MM'-Spinsystems, *H*-2'', *H*-6''), 6.66–6.57 (m, 2H, MM'-Teil eines AA'MM'-Spinsystems, *H*-3'', *H*-5'') ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 171.2$ (COOH), 164.3 (C_q-2), 155.2 (C_q-4''), 153.7 (C_q-1'), 144.5 (C_q-5), 140.9 (C_q-4'), 129.1 (CH-4), 128.2 (CH-3', CH-5'), 128.1 (C_q-1''), 126.5 (CH-6), 124.5 (CH-2'', CH-6''), 122.8 (CH-2', CH-6'), 118.6 (CH-3), 115.6 (CH-3'', CH-5''), 114.0 (C_q-1) ppm.

ESI-MS (pos.): 414.1 ([M+H]⁺, ber.: 414.1).

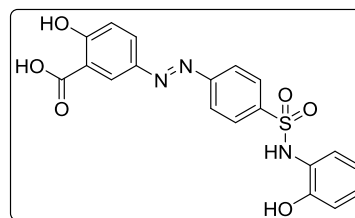
HR-ESI-MS (pos.): 414.0759 ([M+H]⁺, ber.: 414.0754).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3263, 3048, 2924, 2854, 1670, 1452, 1327, 1256, 1161, 913, 847\text{ cm}^{-1}$.

5.4.48 5-[(*E*)-[4-((2-Hydroxyphenyl)sulfamoyl)phenyl]diazenyl]salicylsäure (90)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Shresta.^[417]

Eine Lösung von Benzylarylether **86** (13.5 mg, 26.8 μmol , 1.0 äq.) in trockenem Dichlormethan (5 mL) wird auf -78°C gekühlt und Bortribromid (1 M in CH₂Cl₂, 100 μL , 98.8 μmol , 3.7 äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird 24 Stunden gerührt, während sie langsam Raumtemperatur



erreicht. Es wird unter Eiskühlung 1 M HCl (3 mL) zugegeben und mit Ethylacetat (1 $\times$ 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser (2 $\times$ 3 mL) und mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (3 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels HPLC (HPLC-Methode 4) gereinigt.

Ausbeute: 15 mg (quant., verunreinigt), gelbes Öl, $R_f = 0.06$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), $C_{19}H_{15}N_3O_6S$, (413.40), [413.0682].

1H -NMR, COSY (600 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9.56$ (s, 1H, OH), 9.48 (s, 1H, NH), 8.35 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-6), 8.08 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-4), 7.94–7.92 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H-2', H-6'), 7.89–7.86 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H-3', H-5'), 7.18–7.12 (m, 2H, H-3, H-6''), 6.96 (td, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-4''), 6.74–6.70 (m, 2H, H-3'', H-5'') ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (150.9 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 171.2$ (COOH), 164.9 (C_q -2), 153.8 (C_q -1'), 150.9 (C_q -2''), 144.3 (C_q -5), 142.0 (C_q -4'), 129.0 (CH-4), 128.2 (CH-3', CH-5'), 126.8 (CH-4''), 126.5 (CH-6), 125.9 (CH-6''), 123.6 (C_q -1''), 122.5 (CH-2', CH-6'), 119.0 (CH-3''), 118.6 (CH-3), 115.6 (CH-5''), 114.4 (C_q -1) ppm.

ESI-MS (pos.): 414.1 ($[M+H]^+$, ber.: 414.1), 436.1 ($[M+Na]^+$, ber.: 436.1).

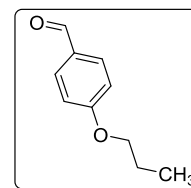
HR-ESI-MS (neg.): 412.0604 ($[M-H]^-$, ber.: 412.0609).

5.5 Synthese der BODIPY-Farbstoffe und Cumarin-Derivate

5.5.1 4-(Propyloxy)benzaldehyd (94)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Gong.^[418]

4-Hydroxybenzaldehyd (0.80 g, 6.55 mmol, 1.0 äq.) und 1-Brompropan (1.3 mL, 14.4 mmol, 2.2 äq.) werden in *N,N*-Dimethylformamid (17 mL) gelöst. Kaliumcarbonat (1.75 g, 12.6 mmol, 1.9 äq.) wird zugegeben. Die Reaktionslösung wird 24 Stunden bei 90 °C gerührt. Es wird Wasser (51 mL) hinzugegeben und mit Ethylacetat (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (4 × 20 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 3:1) gereinigt.



Ausbeute: 414 mg (2.52 mmol, 39%), hellgelbe Flüssigkeit, $R_f = 0.50$ (PE/EtOAc 4:1), $C_{10}H_{12}O_2$, (164.20), [164.0837].

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 9.88 (s, 1H, CHO), 7.85–7.80 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-2, H-6), 7.02–6.96 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-3, H-5), 4.00 (t, J = 6.5 Hz, 2H, OCH_2), 1.91–1.78 (m, 2H, CH_2), 1.05 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[419]

^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ = 191.0 (CHO), 164.4 (C_q -4), 132.1 (CH-2, CH-6), 129.9 (C_q -1), 114.9 (CH-3, CH-5), 70.0 (OCH_2), 22.5 (CH_2), 10.6 (CH_3) ppm.

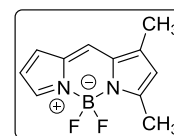
Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[419]

5.5.2 1,3-Dimethyl-4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (91)

Nach einer Synthesevorschrift von Lee.^[342]

Die Reaktion wird unter Lichtausschluss durchgeführt.

Eine Lösung von Pyrrol-2-carbaldehyd (**93**) (586 mg, 6.16 mmol, 1.0 äq.) in trockenem Dichlormethan (10 mL) wird bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ mit 2,4-Dimethylpyrrol (**92**) (349 μL , 6.16 mmol, 1.0 äq.) versetzt und 10 Minuten gerührt. Dann wird Phosphorylchlorid (1.28 mL, 6.16 mmol, 1.0 äq.) zugetropft und innerhalb von 3 Stunden auf Raumtemperatur erwärmt. Die Lösung wird 3 Stunden gerührt und anschließend mit *N,N*-Diisopropylethylamin (3.2 mL, 18.5 mmol, 3.0 äq.) und Bortrifluorid-Etherat (2.3 mL, 18.5 mmol, 3.0 äq.) versetzt. Nach 3 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Hexan/EtOAc 8:1) gereinigt.



Ausbeute: 246 mg (1.12 mmol, 18%), Ausbeute (Lit^[342]): 33%, roter, grün metallisch glänzender Feststoff, R_f = 0.20 ($^{\text{C}}$ Hex/EtOAc 10:1), Schmelzbereich: 141.1–141.9 $^\circ\text{C}$ (PE/EtOAc 8:1), Schmelzbereich (Lit^[420]): 136–138 $^\circ\text{C}$ (PE/EtOAc 10:1), $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BF}_2\text{N}_2$, (220.02), [220.0983].

^1H -NMR, COSY (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.64 (s_{br} , 1H, H-7), 7.19 (s, 1H, H-8), 6.92 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-5), 6.44–6.41 (m, 1H, H-6), 6.15 (s, 1H, H-2), 2.59 (s, 3H, CH_3 -1), 2.26 (s, 3H, CH_3 -3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[342]

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl_3): δ = 163.2 (C_q -8a), 145.9 (C_q -3), 139.3 (CH-7), 136.6 (C_q -1), 132.8 (C_q -7a), 126.6 (CH-5), 124.9 (CH-8), 121.4 (CH-2), 116.4 (CH-6), 15.3 (CH_3 -1), 11.5 (CH_3 -3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[420]

^{19}F -NMR (282 MHz, CDCl_3): δ = -147.4 (q, J = 31.4 Hz, BF_2) ppm.³

ESI-MS (pos.): 221.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 221.1), 201.2 ($[\text{M}-\text{F}]^+$, ber.: 201.1).

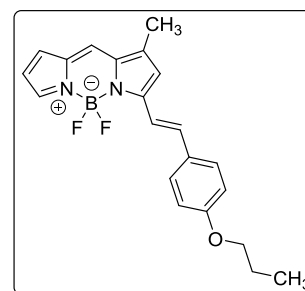
HR-ESI-MS (pos.): 201.0996 ($[\text{M}-\text{F}]^+$, ber.: 201.0999).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3118, 2925, 2854, 1599, 15293, 1399, 1282, 1264, 1142, 1071, 1032, 971, 738 cm^{-1} .

5.5.3 1-Methyl-3-(4-(propyloxy)styryl)-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (4-Propyloxy-BODIPY 23)

Nach einer Synthesevorschrift von *Chang*.^[181]

Eine Lösung von BODIPY **91** (30 mg, 0.14 mmol, 1.0 äq.) in trockenem Acetonitril (1.5 mL) wird mit Essigsäure (47 μL , 0.82 mmol, 6.0 äq.) und Pyrrolidin (67 μL , 0.82 mmol, 6.0 äq.) versetzt. Dann wird eine Lösung von 4-(Propyloxy)-benzaldehyd (**94**) (45 mg, 0.27 μmol , 2.0 äq.) in trockenem Acetonitril (1.0 mL) zugegeben und die Lösung für 5 Minuten



unter Rückfluss und unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 21 mg (57 μmol , 42%), Ausbeute (Lit.^[181]): 61%, violette, grün metallisch glänzende Flüssigkeit, R_f = 0.22 ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 5:1), $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}$, (366.22), [366.1715].

^1H -NMR, COSY (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.65 (s_{br} , 1H, H -8), 7.58–7.54 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H -2', H -6'), 7.50 (d, J = 16.2 Hz, J = 1.5 Hz, 1H,

³ Die Fluor-Atome spalten wegen des Kernspins von Bor ($I = 3/2$) in ein Quartett auf.

CH=CHAr), 7.35 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, CH=CHAr), 7.13 (s, 1H, $H-5$), 6.93–6.90 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, $H-3'$, $H-5'$), 6.89 (s, 1H, $H-6$), 6.74 (s_{br} , 1H, $H-2$), 6.46–6.43 (m, 1H, $H-7$), 3.97 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, OCH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃-1), 1.88–1.78 (m, 2H, CH₂), 1.06 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in CD₃CN gemessen.^[181]

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 161.1$ (C_q-4'), 159.7 (C_q-3), 144.7 (C_q-8a), 140.5 (BodipyCH=CH), 138.2 (CH-8), 133.0 (C_q-7a), 129.9 (CH-2', CH-6'), 128.5 (C_q-1'), 125.3 (CH-6), 122.4 (CH-5), 117.3 (CH-2), 116.4 (BodipyCH=CH), 116.2 (CH-7), 115.1 (CH-3', CH-5'), 69.8 (OCH₂), 22.7 (CH₂), 11.7 (CH₃-1), 10.6 (CH₃) ppm.⁴

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in CD₃CN gemessen.^[181]

¹⁹F-NMR (377 MHz, CDCl₃): $\delta = -143.6$ (q, $J = 31.6$ Hz, BF₂) ppm.⁵

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in CD₃CN gemessen.^[181]

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2962, 2927, 1729, 1594, 1398, 1288, 1263, 1174, 1147, 1063, 1031$ cm⁻¹.

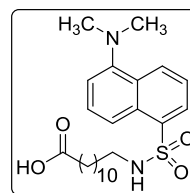
UV-VIS-/Fluoreszenzdaten (Methanol): $\lambda_{exc, max} = 560$ nm. $\epsilon = 39130$ M⁻¹cm⁻¹.

$\lambda_{em, max} = 580$ nm.

5.5.4 12-(5-(Dimethylamino)naphth-1-yl-sulfonamido)dodecansäure (96)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Brown.^[421]

12-Aminododecansäure (719 mg, 3.33 mmol, 3.0 äq.) wird in Wasser (38 mL) gelöst und Natriumhydrogencarbonat (3.02 g, 35.9 mmol, 32.3 äq.) hinzugegeben. 5-(Dimethylamino)naphth-1-ylsulfonsäurechlorid (300 mg, 1.11 mmol, 1.0 äq.) wird in Aceton (5 mL) gelöst und zu der



Reaktionslösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss 5 Stunden gerührt. Anschließend wird mit 1 M Salzsäure angesäuert und mit Ethylacetat (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Heptan/EtOAc 2:1) gereinigt.

⁴ Für das quartäre Kohlenstoffatom C_q-1 konnte kein ¹³C-Signal gefunden werden.

⁵ Die Fluor-Atome spalten wegen des Kernspins von Bor ($I = 3/2$) in ein Quartett auf.

Ausbeute: 299 mg (666 μmol , 60%), farbloses Öl, $R_f = 0.16$ (*n*-Heptan/EtOAc 2:1), $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, (448.62), [448.2396].

^1H -NMR, COSY (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.56$ (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, *H*-2), 8.31 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, *H*-8), 8.24 (dd, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 1H, *H*-4), 7.58–7.50 (m, 2H, *H*-3, *H*-7), 7.20 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, *H*-6), 4.90 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, NH), 2.91–2.85 (m, 2H, CH_2 -12), 2.90 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2 -2), 1.61 (p, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2 -3), 1.39–1.03 (m, 16H, CH_2 -4, CH_2 -5, CH_2 -6, CH_2 -7, CH_2 -8, CH_2 -9, CH_2 -10, CH_2 -11) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta = 179.7$ (COOH), 151.8 (C_q -5), 134.9 (C_q -1), 130.9 (C_q -8a), 130.4 (CH-2), 129.9 (C_q -4a), 129.8 (CH-4), 128.4 (CH-7), 123.4 (CH-3), 119.1 (CH-8), 115.4 (CH-6), 45.6 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 43.4 (CH_2 -12), 34.1 (CH_2 -2), 29.6, 29.3, 29.2, 29.0, 28.9, 26.4 (CH_2 -4, CH_2 -5, CH_2 -6, CH_2 -7, CH_2 -8, CH_2 -9, CH_2 -10, CH_2 -11), 24.7 (CH_2 -3) ppm.

ESI-MS (pos.): 449.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 449.6).

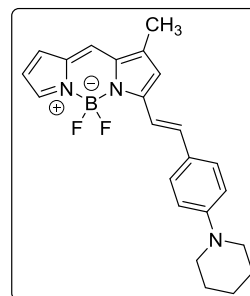
HR-ESI-MS (pos.): 449.2470 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 449.2474).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3291, 2925, 2854, 1707, 1589, 1310, 1202, 1141, 789, 734 \text{ cm}^{-1}$.

5.5.5 1-Methyl-3-(4-(piperidin-1-yl)styrenyl)-4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (Piperidinyl-BODIPY 99)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Chang*.^[181]

Eine Lösung von BODIPY **91** (25 mg, 114 μmol , 1.0 äq.) in trockenem Acetonitril (2.5 mL) wird mit Essigsäure (39 μL , 0.68 mmol, 6.0 äq.) und Pyrrolidin (56 μL , 0.68 mmol, 6.0 äq.) versetzt. Dann wird 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzaldehyd (44 mg, 0.23 mmol, 2.0 äq.) gelöst in trockenem Acetonitril (1 mL) zugegeben und die Lösung für 20 Minuten bei 40 °C unter Lichtausschluss gerührt. Nach vollständigem Umsatz wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Hex/EtOAc 8:1 + 1% NEt_3) gereinigt.



Ausbeute: 23 mg (59 μmol , 52%), dunkelblaue, metallisch glänzende Flüssigkeit, $R_f = 0.25$ ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 5:1), $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{BF}_2\text{N}_3$, (391.27), [391.2031].

^1H -NMR, COSY (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.61$ (s_{br} , 1H, $H-8$), 7.53–7.49 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, $H-2'$, $H-6'$), 7.46 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, BodipyCH=CH), 7.34 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, BodipyCH=CH), 7.06 (s, 1H, $H-5$), 6.90–6.86 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, $H-3'$, $H-5'$), 6.84 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, $H-6$), 6.74 (s_{br} , 1H, $H-2$), 6.43–6.40 (m, 1H, $H-7$), 3.35–3.31 (m, 4H, $2 \times \text{N}(\text{CH}_2)$), 2.29 (s, 3H, CH_3-1), 1.73–1.62 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 160.6$ (C_q-3), 153.0 (C_q-4'), 144.7 (C_q-7a), 141.6 (BodipyCH=CH), 138.6 (C_q-8a), 137.1 (CH-8), 133.0 (C_q-1), 130.2 (CH-2', CH-6'), 125.7 (C_q-1'), 124.2 (CH-6), 121.2 (CH-5), 117.7 (CH-2), 115.8 (CH-7), 115.1 (CH-3', CH-5'), 114.7 (BodipyCH=CH), 49.3 ($2 \times \text{N}(\text{CH}_2)$), 25.7 ($3 \times \text{CH}_2$), 11.8 (CH_3-1) ppm.⁶

^{19}F -NMR (471 MHz, CDCl_3): $\delta = -142.6$ (q, $J = 31.2$ Hz, BF_2) ppm.

ESI-MS (pos.): 392.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 392.3).

HR-ESI-MS (pos.): 392.2116 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 392.2108).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2961, 2928, 2360, 1730, 1592, 1523, 1397, 1289, 1126, 1072, 957 \text{ cm}^{-1}$.

UV-VIS-/Fluoreszenzdaten (Ethanol): $\lambda_{\text{exc, max}} = 581 \text{ nm}$. $\epsilon = 28859 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

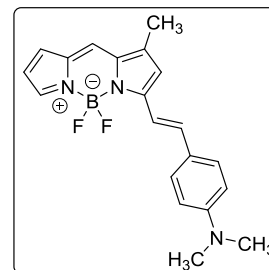
$\lambda_{\text{em, max}} = 653 \text{ nm}$.

⁶ Die quartären Kohlenstoffatomen C_q-7a und C_q-8a konnten nicht zweifelsfrei zugeordnet werden.

5.5.6 1-Methyl-3-(4-(*N,N*-dimethylamino)styrenyl)-4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diazas-indacen (Dimethylamino-BODIPY 100)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Chang*.^[181]

Eine Lösung von BODIPY **91** (25 mg, 114 μmol , 1.0 äq.) in trockenem Acetonitril (2.5 mL) wird mit Essigsäure (39 μL , 0.66 mmol, 6.0 äq.) und Pyrrolidin (56 μL , 0.66 mmol, 6.0 äq.) versetzt. Dann wird 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzaldehyd (34 mg, 0.22 mmol, 2.0 äq.) gelöst in trockenem Acetonitril zugegeben und die Lösung für 25 Minuten bei 50 °C unter Lichtausschluss gerührt. Nach vollständigem Umsatz wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc 14:1) gereinigt.



Ausbeute: 32 mg (92 μmol , 81%), dunkelblaue, metallisch glänzende Flüssigkeit, $R_f = 0.21$ (^CHex/EtOAc 5:1), $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BF}_2\text{N}_3$, (351.21), [351.1718].

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.59$ (s_{br} , 1H, *H*-8), 7.54–7.49 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 7.44 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, BodipyCH=CH), 7.34 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, BodipyCH=CH), 7.03 (s, 1H, *H*-5), 6.82 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, *H*-6), 6.72 (s_{br} , 1H, *H*-2), 6.70–6.65 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 6.42–6.40 (m, 1H, *H*-7), 3.04 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.27 (s, 3H, CH_3 -1) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in $\text{DMSO}-d_6$ gemessen.^[275]

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 144.8$ (C_q -7a), 161.0 (C_q -3), 152.1 (C_q -4'), 142.3 (BodipyCH=CH), 138.8 (C_q -8a), 136.7 (CH-8), 133.0 (C_q -1), 130.5 (CH-2', CH-6'), 124.3 (C_q -1'), 123.9 (C_q -6), 120.9 (CH-5), 117.9 (CH-2), 115.7 (CH-7), 113.9 (BodipyCH=CH), 112.4 (CH-3', CH-5'), 40.6 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 11.9 (CH_3 -1) ppm.⁷

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in $\text{DMSO}-d_6$ gemessen.^[275]

¹⁹F-NMR (296 MHz, CDCl_3): $\delta = -144.0$ (q, $J = 31.6$ Hz, BF_2) ppm.

ESI-MS (pos.): 352.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 352.2).

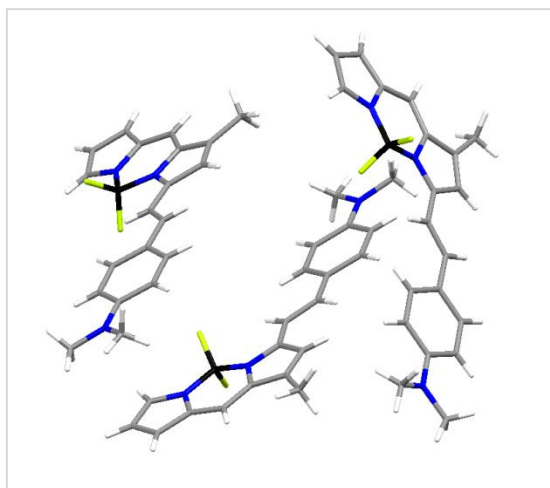
HR-ESI-MS (pos.): 374.1627 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 374.1616).

⁷ Die quartären Kohlenstoffatomen C_q -7a und C_q -8a konnten nicht zweifelsfrei zugeordnet werden.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3068, 2920, 2857, 1583, 1524, 1398, 1287, 1149, 1160, 1028, 725 cm^{-1} .

UV-VIS-/Fluoreszenzdaten (Ethanol): $\lambda_{\text{exc, max}} = 593 \text{ nm}$. $\varepsilon = 26457 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

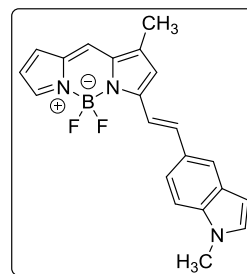
$\lambda_{\text{em, max}} = 652 \text{ nm}$.



5.5.7 1-Methyl-3-(2-(1-methylindol-5-yl)ethenyl)-4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (Indolyl-BODIPY 101)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Chang*.^[181]

Eine Lösung von BODIPY **91** (25 mg, 114 μmol , 1.0 äq.) in trockenem Acetonitril (2.5 mL) wird mit Essigsäure (39 μL , 0.68 mmol, 6.0 äq.) und Pyrrolidin (56 μL , 0.68 mmol, 6.0 äq.) versetzt. Dann wird eine Lösung von 1-Methyl-1*H*-indol-5-carbaldehyd (36 mg, 0.23 mmol, 2.0 äq.) in trockenem Acetonitril (1.5 mL) zugegeben und drei Stunden bei 40 °C unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels CombiFlash-System über Normalphase (*n*-Heptan/EtOAc 95% für 60 Minuten, dann 15%) gereinigt.



Ausbeute: 18 mg (50 μmol , 44%), dunkelblaue, metallisch glänzende Flüssigkeit, $R_f = 0.25$ ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 4:1), $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{BF}_2\text{N}_3$, (361.20), [361.1562].

^1H -NMR (400 MHz, CD_3CN): $\delta = 7.86$ (d, $J = 1.6 \text{ Hz}$, 1H, $H\text{-}4'$), 7.78 (d, $J = 16.3 \text{ Hz}$, 1H, BodipyCH=CH), 7.59 (s_{br} , 1H, $H\text{-}8$), 7.56 (dd, $J = 8.7 \text{ Hz}$, $J = 1.6 \text{ Hz}$, 1H, $H\text{-}6'$), 7.52

(d, $J = 16.3$ Hz, 1H, BodipyCH=CH), 7.48–7.43 (m, 1H, $H-7'$), 7.40 (s, 1H, $H-5$), 7.22 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, $H-2'$), 6.98 (s, 1H, $H-6$), 6.97 (s_{br}, 2H, $H-2$), 6.55 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 0.8$ Hz, 1H, $H-3'$), 6.49–6.45 (m, 1H, $H-7$), 3.81 (s, 3H, N(CH₃)), 2.33 (s_{br}, 3H, CH₃-1) ppm.

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃CN): $\delta = 161.4$ (C_q-3), 147.1 (C_q-7a), 144.8 (BodipyCH=CH), 139.3 (C_q-8a), 139.0 (C_q-7a'), 137.7 (CH-8), 133.7 (C_q-1), 131.9 (CH-2'), 130.0 (C_q-3a'), 128.2 (C_q-5'), 125.7 (CH-6), 123.7 (CH-5), 123.3 (CH-4'), 121.8 (CH-6'), 118.6 (CH-2), 116.7 (CH-7), 115.5 (BodipyCH=CH), 111.4 (CH-7'), 102.8 (CH-3'), 33.4 (N(CH₃)), 11.7 (CH₃-1) ppm.

¹⁹F-NMR (377 MHz, CD₃CN): $\delta = -143.1$ (q, $J = 31.4$ Hz, BF₂) ppm.

ESI-MS (pos.): 362.2 ([M+H]⁺, ber.: 362.2).

HR-ESI-MS (pos.): 384.1463 ([M+Na]⁺, ber.: 384.1460).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2924, 2853, 1596, 1524, 1416, 1312, 1287, 1145, 1063, 994$ cm⁻¹.

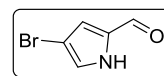
UV-VIS-/Fluoreszenzdaten (Ethanol): $\lambda_{\text{exc, max}} = 567$ nm. $\varepsilon = 8081$ M⁻¹cm⁻¹.

$\lambda_{\text{em, max}} = 592$ nm.

5.5.8 4-Brom-1H-pyrrol-2-carbaldehyd (104)

Nach einer Synthesevorschrift von *Lindsey*.^[422]

Eine Lösung von Pyrrol-2-carbaldehyd (**93**) (3.05 g, 32.1 mmol, 1.0 äq.) in trockenem Tetrahydrofuran (100 mL) wird auf -78 °C gekühlt und *N*-Bromsuccinimid (5.61, 31.5 mmol, 0.98 äq.), gelöst in trockenem Tetrahydrofuran (26 mL), zugetropft. Es wird 1 Stunde gerührt. Anschließend werden *n*-Hexan und Wasser (je 50 mL) hinzugegeben und 16 Stunden gerührt, während die Reaktionslösung langsam Raumtemperatur erreicht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, Wasser (150 mL) zugegeben und mit Ethylacetat (2 × 75 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (C₆Hex/EtOAc 8:1) gereinigt.



Ausbeute: 4.71 g (27.1 mmol, 84%), Ausbeute (Lit.^[422]): 55%, farbloser Feststoff, $R_f = 0.24$ ($^C\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 5:1), Schmelzbereich: 121.2–123.9 °C ($^C\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 8:1), Schmelzbereich (Lit.^[422]): 120–121 °C (Hexan/THF), $\text{C}_5\text{H}_4\text{BrNO}$, (174.00), [172.9476].

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 10.56$ (s, 1H, NH), 9.45 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, CHO), 7.17–7.13 (m, 2H, H-3), 7.00–6.97 (m, 1H, H-5) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[422]

^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta = 179.2$ (CHO), 132.7 ($\text{C}_q\text{-2}$), 126.9 (CH-3), 122.8 (CH-5), 98.9 ($\text{C}_q\text{-4}$) ppm.

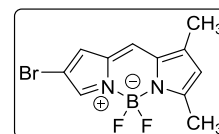
Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[422]

5.5.9 1,3-Dimethyl-6-brom-4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (103)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Lee.^[342]

Die Reaktion wird unter Lichtausschluss durchgeführt.

Eine Lösung von 4-Brom-1H-pyrrol-2-carbaldehyd (**104**) (130 mg, 0.75 mmol, 1.0 äq.) in trockenem Dichlormethan (2.2 mL) wird bei –5 °C mit 2,4-Dimethylpyrrol (**92**) (78 μL , 0.75 mmol, 1.0 äq.) versetzt und 3 Minuten gerührt. Dann wird Phosphorylchlorid (68 μL , 0.75 mmol, 1.0 äq.) zugetropft und 3 Stunden bei –5 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird 30 Minuten gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Es wird 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden *N,N*-Diisopropylethylamin (440 μL , 2.25 mmol, 3.0 äq.) und Bortrifluorid-Etherat (328 μL , 2.25 mmol, 3.0 äq.) zugetropft und für 3 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser (14 mL) versetzt und mit Dichlormethan (10×50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt und über Kieselgel (Dichlormethan) filtriert.



Ausbeute: 47 mg (0.16 mmol, 21%), roter, grün metallisch glänzender Feststoff, $R_f = 0.19$ ($^C\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 5:1), Schmelzbereich: 142.4–145.2 °C (Dichlormethan), $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{BBF}_2\text{N}_2$, (298.93), [298.0888].

$^1\text{H-NMR}$, COSY (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.48$ (s_{br} , 1H, $H-7$), 7.09 (s_{br} , 1H, $H-8$), 6.82 (s_{br} , 1H, $H-5$), 6.20 (s_{br} , 1H, $H-2$), 2.59 (s, 3H, CH_3-1), 2.26 (s, 3H, CH_3-3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 165.9$ (C_q-3), 147.5 (C_q-1), 137.5 (C_q-8a), 137.3 (CH-7), 132.0 (C_q-7a), 125.5 (CH-5), 124.0 (CH-8), 122.3 (CH-2), 103.4 (C_q-6), 15.5 (CH_3-1), 11.6 (CH_3-3) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (377 MHz, CDCl_3): $\delta = -147.5$ (q, $J = 31.7$ Hz, BF_2) ppm.

ESI-MS (pos.): 279.1 ($[\text{M-F}]^+$, ber.: 279.0).

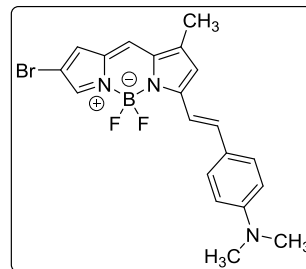
HR-ESI-MS (pos.): 279.0099 ($[\text{M-F}]^+$, ber.: 279.0104).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2924, 2853, 1626, 1376, 1170, 1140, 1071, 1013, 973 \text{ cm}^{-1}$.

5.5.10 1-Methyl-3-(4-(*N,N*-dimethylamino)styrenyl)-6-brom-4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (105)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Chang.^[181]

Das bromierte BODIPY **103** (20 mg, 67 μmol , 1.0 äq.) wird in trockenem Acetonitril (2.0 mL) gelöst und mit Essigsäure (23 μL , 401 μmol , 6.0 äq.) und Pyrrolidin (33 μL , 401 μmol , 6.0 äq.) versetzt. Dann wird 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzaldehyd (20 mg, 134 μmol , 2.0 äq.), gelöst in trockenem Acetonitril (0.8 mL), zugegeben. Die Reaktionslösung wird 40 Minuten bei 80 °C unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 5:1) gereinigt.



Ausbeute: 23 mg (54 μmol , 81%), dunkelblaue Flüssigkeit, $R_f = 0.50$ ($^{\text{C}}\text{Hex/EtOAc 2:1}$), $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{BBBrF}_2\text{N}_3$, (430.10), [429.0823].

$^1\text{H-NMR}$, COSY (400 MHz, CD_3CN): $\delta = 7.68$ (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, Bodipy CH=CH), 7.58–7.54 (m, 2H, AA' -Teil eines $\text{AA}'\text{XX}'$ -Spinsystems, $H-2'$, $H-6'$), 7.42 (s_{br} , 1H, $H-5$), 7.30 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, Bodipy CH=CH), 7.20 (s_{br} , 1H, $H-8$), 6.98 (s_{br} , 1H, $H-2$), 6.83

(s_{br}, 1H, *H*-7), 6.81–6.76 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 3.05 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.30 (s, 3H, CH₃-1) ppm.⁸

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CD₃CN): δ = 131.5 (C_q-7a), 162.0 (C_q-3), 152.3 (C_q-4'), 145.3 (BodipyCH=CH), 146.2 (C_q-8a), 119.1 (CH-8), 139.0 (C_q-1), 130.6 (CH-2', CH-6'), 122.5 (C_q-1'), 100.7 (C_q-6), 132.7 (CH-5), 118.8 (CH-2), 121.7 (CH-7), 111.5 (BodipyCH=CH), 112.0 (CH-3', CH-5'), 39.3 (N(CH₃)₂), 10.7 (CH₃-1) ppm.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CD₃CN): δ = -143.7 (q, *J* = 31.5 Hz, BF₂) ppm.

ESI-MS (pos.): 430.3 ([M+H]⁺, ber.: 430.1).

HR-ESI-MS (pos.): 428.0870 ([M]⁺, ber.: 428.0860).

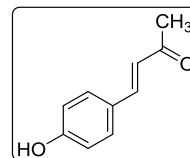
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2926, 2855, 1580, 1553, 1527, 1371, 1294, 1184, 1171, 1150, 928, 814 cm⁻¹.

5.5.11 (3*E*)-4-(4-Hydroxyphenyl)but-3-en-2-on (109)

Nach einer Synthesevorschrift von Wang.^[423]

4-Hydroxybenzaldehyd (1.22 g, 9.99 mmol, 1.0 äq.) wird in Aceton (15 mL) gelöst und mit 10% Natriumhydroxid-Lösung (25 mL) versetzt.

Die Lösung wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit 10% Salzsäure pH 1 eingestellt und mit Dichlormethan (3 × 30 mL)



extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (30 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel (C₆Hex/EtOAc 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.33 g (8.20 mmol, 82%), gelblicher Feststoff, *R*_f = 0.35 (C₆Hex/EtOAc 2:1), Schmelzbereich: 102.1–104.8 °C (C₆Hex/EtOAc 2:1), Schmelzbereich (Lit.^[423]): 109 °C (*n*-Hex/EtOAc 10:1), C₁₀H₁₀O₂, (162.19), [162.0681].

⁸ Der Ringschluss über die N-B-N-Bindung ist aufgrund von 2 verschiedenen Kontakten im ¹H, ¹⁵N-HMBC sehr wahrscheinlich.

^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 10.04 (s, 1H, OH), 7.57–7.51 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-2, H-6), 7.52 (d, J = 16.3 Hz, 1H, ArCH=CH), 6.84–6.78 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-3, H-5), 6.59 (d, J = 16.3 Hz, 1H, ArCH=CH), 2.28 (s, 3H, CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in CDCl_3 gemessen.^[423]

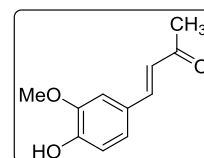
^{13}C -NMR (75.5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 197.8 (CO), 159.9 (C_q -4), 143.6 (ArCH=CH), 130.4 (CH-2, CH-6), 125.4 (C_q -1), 124.1 (ArCH=CH), 115.9 (CH-3, CH-5), 27.1 (CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in CDCl_3 gemessen.^[423]

5.5.12 (3E)-4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-2-on (110)

Nach einer Synthesevorschrift von Wang.^[423]

4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (1.01 g, 6.64 mmol, 1.0 äq.) wird in Aceton (10 mL) gelöst und mit 10% Natriumhydroxid-Lösung (17 mL) versetzt. Die Lösung wird 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit 10% HCl pH 1 eingestellt und mit Dichlormethan (3×30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (30 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 5:1→3:1) gereinigt.



Ausbeute: 910 mg (5.16 mmol, 71%), gelblicher Feststoff, R_f = 0.29 ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 2:1), Schmelzbereich: 125.3–126.6 °C ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 5:1), Schmelzbereich (Lit.^[423]): 127–128 °C (n -Hex/ EtOAc 10:1), $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$, (192.21), [192.0786].

^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9.65 (s, 1H, OH), 7.52 (d, J = 16.3 Hz, 1H, ArCH=CH), 7.30 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-2), 7.13 (dd, J = 8.2 Hz, J = 1.9 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5), 6.67 (d, J = 16.3 Hz, 1H, ArCH=CH), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 2.29 (s, 3H, CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in CDCl_3 gemessen.^[423]

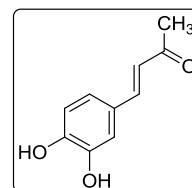
^{13}C -NMR (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 197.9 (CO), 149.4 (C_q -4), 148.0 (C_q -3), 144.0 (ArCH=CH), 125.9 (C_q -1), 124.4 (ArCH=CH), 123.3 (C_q -6), 115.7 (C_q -5), 111.3 (C_q -2), 55.7 (OCH_3), 27.2 (CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in CDCl_3 gemessen.^[423]

5.5.13 (3E)-4-(3,4-Dihydroxyphenyl)but-3-en-2-on (111)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Wang.^[423]

3,4-Dihydroxybenzaldehyd (2.00 g, 14.5 mmol, 1.0 äq.) wird in Aceton (15 mL) gelöst und mit 10% Natriumhydroxid-Lösung (36 mL) versetzt. Die Lösung wird 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit 10% Salzsäure pH 1 eingestellt und mit Dichlormethan (3×100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 2:1) gereinigt.



Ausbeute: 2.15 g (12.1 mmol, 83%), gelber Feststoff, R_f = 0.71 ($\text{EtOAc}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ 17:2:1), Schmelzbereich: 172.0–174.1 °C ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:2), Schmelzbereich (Lit.^[424]): 173–175 °C (n -Hex/ EtOAc), $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$, (178.19), [178.0630].

^1H -NMR (300 MHz, Aceton- d_6): δ = 7.47 (d, J = 16.3 Hz, 1H, ArCH=CH), 7.17 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H -2), 7.06 (dd, J = 8.2 Hz, J = 2.1 Hz, 1H, H -6), 6.87 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H -5), 6.54 (d, J = 16.3 Hz, 1H, ArCH=CH), 2.27 (s, 3H, CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[425]

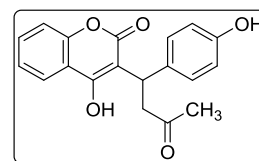
^{13}C -NMR (75.5 MHz, Aceton- d_6): δ = 197.7 (CO), 148.6 (C_q -4), 146.2 (C_q -3), 144.1 (ArCH=CH), 127.9 (C_q -1), 125.3 (ArCH=CH), 122.7 (CH-6), 116.4 (CH-5), 115.2 (CH-2), 27.3 (CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[425]

5.5.14 3-[1-(4-Hydroxyphenyl)-3-oxobutyl]-4-methyl-2H-chromen-2-on (112)

Nach einer modifizierten Synthesevorschrift von Jørgensen.^[426]

4-Hydroxycumarin (106 mg, 0.65 mmol, 1.05 äq.) wird in Dimethylsulfoxid (4.8 mL) gelöst. Dann werden L-Prolin (36 mg, 0.31 mmol, 0.5 äq.) und (3E)-4-(4-Hydroxyphenyl)but-3-en-2-on (**109**) (91 mg, 0.62 mmol, 1.0 äq.) zugegeben. Die Lösung wird 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es werden Diethylether (20 mL) und Wasser (10 mL) hinzugegeben und mit Diethylether (4 × 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Wasser (10 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach zweimaliger säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^CHex/EtOAc 2:1, danach Toluol/EtOAc 3:1) wird ein Isomerengemisch erhalten.



Ausbeute: 77 mg (238 µmol, 42%), gelblicher Feststoff, $R_f = 0.42$ (^CHex/EtOAc 1:1), Schmelzbereich: 208.5–209.9 °C (Chloroform), C₁₉H₁₆O₅, (324.33), [324.0998].

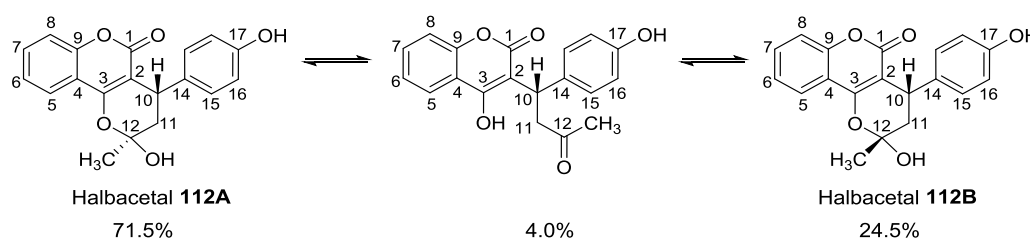


Tabelle 34: ¹H-NMR-Signale (600 MHz, Aceton-d₆) und ¹³C-NMR-Signale (150.9 MHz, Aceton-d₆) der Halbacetale **112A–B**.⁹

Atom-Nr.	¹ H Halbacetal 112A	¹ H Halbacetal 112B	¹³ C Halbacetal 112A	¹³ C Halbacetal 112B
C _q -1	-	-	160.9	161.4
C _q -2	-	-	105.5	103.8
C _q -3	-	-	159.2	159.9
C _q -4	-	-	117.1	116.9
5	7.84	7.85	123.6	123.7
6	7.33	7.35	124.4	124.5
7	7.58	7.61	132.3	132.5
8	7.27	7.29	116.9	117.0

⁹ Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von COSY-, HSQC-, HMBC- und ROESY-Experimenten durchgeführt.

C_q -9	-	-	153.86	153.88
10	4.02	4.02	35.8	36.5
11 (CH ₂ -A)	2.39	2.39	44.0	42.6
11 (CH ₂ -B)	2.00	2.28	-	-
C_q -12	-	-	100.3	101.9
OH-12	6.22	5.89	-	-
C_q -14	-	-	135.6	135.3
15	7.05	7.07	129.0	129.3
16	6.73	6.70	115.9	115.7
C_q -17	-	-	156.5	156.4
OH-17	8.02	7.99	-	-
CH ₃	1.71	1.66	28.0	26.6

ESI-MS (pos.): 325.1 ([M+H]⁺, ber.: 325.3).

HR-ESI-MS (pos.): 347.0887 ([M+Na]⁺, ber.: 347.0895).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3363, 2924, 2853, 1693, 1614, 1515, 1455, 1390, 1237, 1072, 763 cm⁻¹.

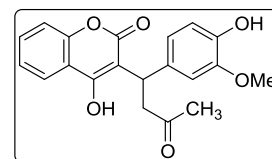
UV-VIS-/Fluoreszenzdaten (Ethanol): $\lambda_{\text{exc, max}}$ = 306 nm. ϵ = 14035 M⁻¹cm⁻¹.

$\lambda_{\text{em, max}}$ = 395 nm.

5.5.15 3-[1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxobutyl]-4-methyl-2H-chromen-2-on (113)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Jørgensen.^[426]

4-Hydroxycumarin (1.69 g, 10.4 mmol, 1.05 äq.) wird in Dimethylsulfoxid (25 mL) gelöst. Anschließend werden L-Prolin (572 mg, 4.97 mmol, 0.5 äq.) und (3E)-4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-2-on (**110**) (1.91 g, 9.93 mmol, 1.0 äq.)



zugegeben. Die Lösung wird 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden Diethylether (40 mL) und Wasser (20 mL) hinzugegeben und mit Diethylether (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Wasser (50 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird zweimal säulenchromatographisch an Kieselgel (C₆Hex/EtOAc 3:1→1:1, danach Toluol/EtOAc 3:1) gereinigt. Es wird ein Isomerengemisch erhalten.

Ausbeute: 2.08 g (5.87 mmol, 59%), farbloser Feststoff, $R_f = 0.36$ ($^C\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:1), Schmelzbereich: 126.8–129.6 °C ($^C\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:1), Schmelzbereich (Lit.^[427]): 181 °C (EtOH), $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$, (354.36), [354.1103].

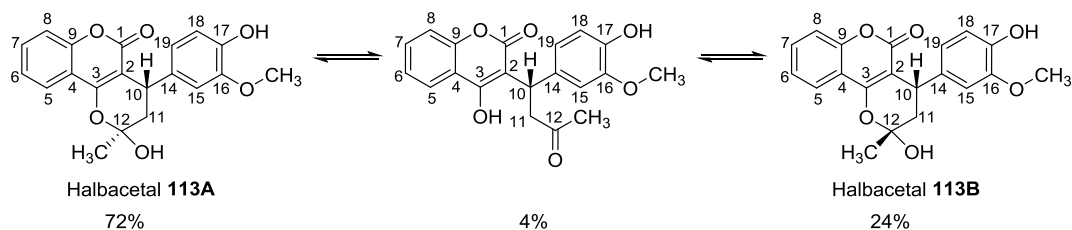


Tabelle 35: ^1H -NMR-Signale (600 MHz, Aceton- d_6) und ^{13}C -NMR-Signale (150.9 MHz, Aceton- d_6) der Halbacetale **113A–B**.¹⁰

Atom-Nr.	^1H Halbacetal 113A	^1H Halbacetal 113B	^{13}C Halbacetal 113A	^{13}C Halbacetal 113B
$\text{C}_q\text{-1}$	-	-	161.0	161.4
$\text{C}_q\text{-2}$	-	-	105.4	103.7
$\text{C}_q\text{-3}$	-	-	159.2	159.9
$\text{C}_q\text{-4}$	-	-	117.1	116.9
5	7.84	7.78	123.65	123.68
6	7.33	7.35	124.3	124.5
7	7.58	7.60	132.3	132.5
8	7.26	7.29	116.9	117.0
$\text{C}_q\text{-9}$	-	-	153.85	153.88
10	4.02	4.03	36.2	37.0
11 (CH ₂ -A)	2.40	2.40	43.9	42.6
11 (CH ₂ -B)	2.04	2.31	-	-
$\text{C}_q\text{-12}$	-	-	100.3	101.9
OH-12	6.30	5.98	-	-
$\text{C}_q\text{-14}$	-	-	136.3	136.0
15	6.87	6.90	111.9	112.3
$\text{C}_q\text{-16}$	-	-	148.2	148.0
$\text{C}_q\text{-17}$	-	-	145.7	145.7
18	6.71	6.68	115.6	115.4
19	6.66	6.68	120.5	120.7
OCH ₃	3.77	3.75	56.2	56.2
CH ₃	1.72	1.66	28.0	26.5

¹⁰ Die NMR-Daten beziehen sich auf die beiden Hauptisomere. Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von COSY-, HSQC-, HMBC- und ROESY-Experimenten durchgeführt.

ESI-MS (pos.): 355.1 ($[M+H]^+$, ber.: 355.4).

HR-ESI-MS (pos.): 355.1172 ($[M+H]^+$, ber.: 355.1182).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3384, 2934, 2850, 1686, 1618, 1515, 1454, 1382, 1239, 1073, 762 cm^{-1} .

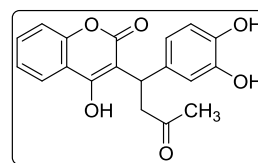
UV-VIS-/Fluoreszenzdaten (Ethanol): $\lambda_{\text{exc, max}} = 307 \text{ nm}$. $\epsilon = 12719 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

$\lambda_{\text{em, max}} = 395 \text{ nm}$.

5.5.16 3-[1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-oxobutyl]-4-methyl-2H-chromen-2-on (114)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Jørgensen.^[426]

4-Hydroxycumarin (1.64 g, 10.1 mmol, 1.05 äq.) wird in Dimethylsulfoxid (24 mL) gelöst. Anschließend werden L-Prolin (556 mg, 4.83 mmol, 0.5 äq.) und (3E)-4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-2-on (**111**) (1.72 g, 9.65 mmol, 1.0 äq.)



zugegeben. Die Lösung wird 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es werden Diethylether (40 mL) und Wasser (20 mL) hinzugegeben und mit Diethylether ($4 \times 25 \text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Wasser (50 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 1:2) und mittels HPLC (HPLC-Methode 1) gereinigt. Es wird ein Isomerengemisch erhalten.

Ausbeute: 287 mg (842 μmol , 9%), gelblicher Feststoff, $R_f = 0.79$ ($\text{EtOAc}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ 17:2:1), Schmelzbereich: 115.4–118.1 $^{\circ}\text{C}$ (Acetonitril/Wasser, 80:20), $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_6$, (340.33), [340.0947].

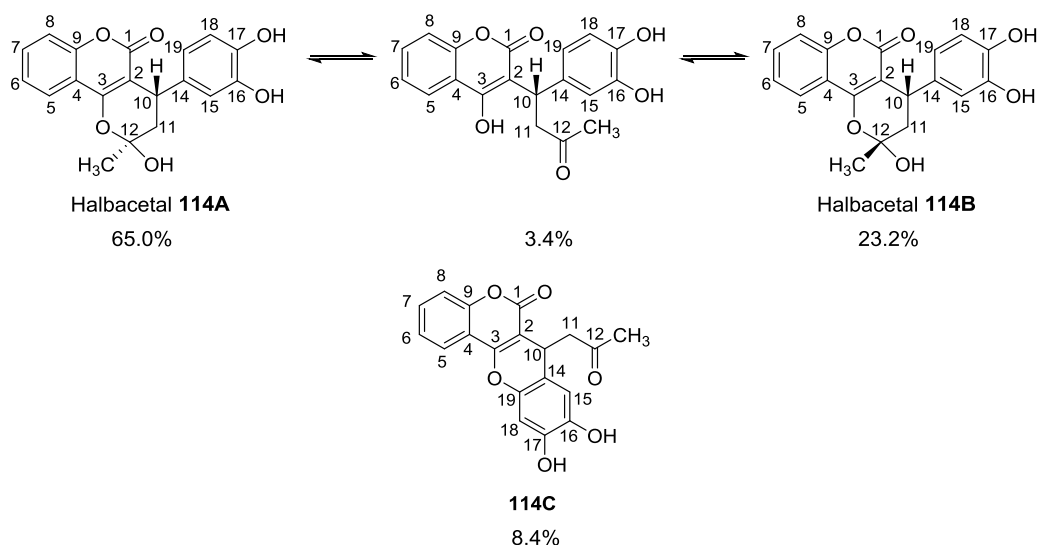


Tabelle 36: ^1H -NMR-Signale (600 MHz, Aceton- d_6) und ^{13}C -NMR-Signale (150.9 MHz, Aceton- d_6) der Halbacetale **114A–B**.¹¹

Atom-Nr.	^1H Halbacetal 114A	^1H Halbacetal 114B	^{13}C Halbacetal 114A	^{13}C Halbacetal 114B
$\text{C}_q\text{-1}$	-	-	160.9	161.4
$\text{C}_q\text{-2}$	-	-	105.5	103.8
$\text{C}_q\text{-3}$	-	-	159.1	159.8
$\text{C}_q\text{-4}$	-	-	117.1	116.9
5	7.84	7.86	123.6	123.7
6	7.33	7.35	124.4	124.5
7	7.59	7.61	132.3	132.5
8	7.27	7.30	116.9	117.0
$\text{C}_q\text{-9}$	-	-	153.8	153.9
10	3.96	3.98	35.9	36.5
11 (CH ₂ -A)	2.39	2.39	44.0	42.6
11 (CH ₂ -B)	1.99	2.29		
$\text{C}_q\text{-12}$	-	-	100.4	102.0
OH-12	6.20	5.78	-	-
$\text{C}_q\text{-14}$	-	-	136.6	136.2
15	6.68	6.71	115.2	115.4
$\text{C}_q\text{-16}$	-	-	145.7	145.6
$\text{C}_q\text{-17}$	-	-	144.2	144.1
18	6.71	6.69	116.0	115.9
19	6.57	6.60	119.5	119.6
CH ₃	1.71	1.65	28.0	26.5

¹¹ Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von COSY-, HSQC-, HMBC- und ROESY-Experimenten durchgeführt.

ESI-MS (pos.): 341.0 ($[M+H]^+$, ber.: 341.1).

HR-ESI-MS (pos.): 341.1019 ($[M+H]^+$, ber.: 341.1020).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3348, 2927, 2855, 1681, 1612, 1519, 1447, 1390, 1073, 736 cm^{-1} .

UV-VIS-/Fluoreszenzdaten (Ethanol): $\lambda_{\text{exc, max}} = 307 \text{ nm}$. $\epsilon = 13307 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

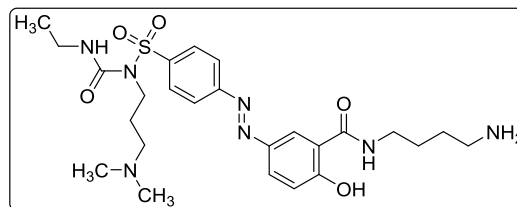
$\lambda_{\text{em, max}} = 385 \text{ nm}$.

5.6 Versuche zur Synthese Boronsäure-funktionalisierter Sulfasalazin-Derivate

5.6.1 N-Sulfonylharnstoff 129

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Fesik.^[385]

Die Sulfonsäure **38** (190 mg, 566 μ mol, 1.0 äq.) wird in absolutem *N,N*-Dimethylformamid (4 mL) suspendiert und Putrescin (499 mg, 5.66 mmol, 10 äq.) hinzugegeben. Die Suspension wird im



Isopropanol-Eisbad gekühlt, mit Hydroxybenzotriazol (76.4 mg, 566 μ mol, 1.0 äq.) versetzt und 20 Minuten gerührt. Es wird EDC-Hydrochlorid (163 mg, 848 μ mol, 1.5 äq.) zugegeben und die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt. Die Suspension wird drei Tage gerührt. Danach wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels CombiFlash-System über Umkehrphase (Methode A) gereinigt.

Ausbeute: 224 mg (72%, verunreinigt), rotorangenes Öl, R_f = 0.65 (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1), C₂₅H₃₇N₇O₅S, (547.68), [547.2577].

¹H-NMR, COSY (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.56 (*s*_{br}, 1H, OH), 8.32–8.29 (m, 1H, H-6), 7.68–7.64 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-3', H-5'), 7.63–7.57 (m, 3H, H-4, H-2', H-6'), 6.34 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-3), 3.34–3.26 (m, 2H, CONHCH₂), 3.20–3.16 (m, 2H, SO₂NCH₂), 3.16–3.12 (m, 2H, NCONHCH₂), 2.78 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂NH₂), 2.27–2.23 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂), 2.14 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.64 (quint, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH₂CH₂N(CH₃)₂), 1.59–1.38 (m, 6H, 2 $\times$ CH₂, NCONH), 1.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 176.9 (C_q-2), 167.7 (CONH), 154.3 (NCONH), 152.9 (C_q-1'), 147.2 (C_q-4'), 138.1 (C_q-5), 130.5 (CH-6), 126.3 (CH-3', CH-5'), 124.4 (CH-4), 123.3 (CH-3), 120.4 (CH-2', CH-6'), 118.5 (C_q-1), 55.4 (CH₂N(CH₃)₂), 44.6 (N(CH₃)₂), 39.6 (SO₂NCH₂), 39.2 (CH₂NH₂), 37.5 (CONHCH₂), 36.0 (NCONHCH₂), 26.2 (CH₂), 25.8 (CH₂), 25.8 (CH₂CH₂N(CH₃)₂), 14.3 (CH₃) ppm.

ESI-MS (pos.): 548.2 ($[M+H]^+$, ber.: 548.3).

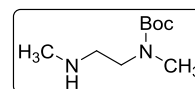
HR-ESI-MS (pos.): 548.2653 ($[M+H]^+$, ber.: 548.2650).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2943, 2866, 1621, 1474, 1343, 1168, 1117, 1030, 1006, 846 cm^{-1} .

5.6.2 N-Boc-geschütztes Diamin 130

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Gilon*.^[428]

N,N'-Dimethylethylendiamin (15 mL, 0.14 mmol, 10 äq.) wird in Chloroform (60 mL) gelöst. Unter Eiskühlung wird in Chloroform (20 mL) gelöstes Di-*tert*-butyldicarbonat (3.07 g, 14.1 mmol, 1.0 äq.) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 16 Stunden gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingengt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (4×20 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



Ausbeute: 2.81 g (14.9 mmol, quant.), farblose Flüssigkeit, R_f = 0.09 (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% NEt₃), C₉H₂₀N₂O₂, (188.27), [188.1525].

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 3.32 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CON(CH₂)), 2.87 (s, 3H, CON(CH₃)), 2.72 (t, J = 6.6 Hz, 2H, NH(CH₂)), 2.44 (s, 3H, NH(CH₃)), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[429]

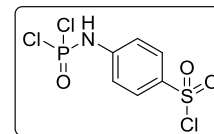
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (125.6 MHz, CDCl₃): δ = 156.1 (CO), 79.6 (C(CH₃)₃), 49.9 (NH(CH₂)), 48.5 (CON(CH₂)), 36.5 (NH(CH₃)), 34.8 (CON(CH₃)), 28.6 (C(CH₃)₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[430]

5.6.3 4-Amino-N-methyl-N-[2-(methylamino)ethyl]benzolsulfonamid (131)

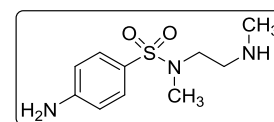
Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Godfroid*^[341] und *Bieber*.^[340]

Sulfanilsäure (**37**) (2.04 g, 11.8 mmol, 1.0 äq.) wird in trockenem Dichlormethan (30 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wird Phosphorpentachlorid (2.70 g, 13.0 mmol, 1.09 äq.) zugegeben. Die Suspension wird 4 Stunden gerührt, während die Reaktionslösung langsam Raumtemperatur erreicht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und ein Eis/Wasser-Gemisch zugegeben. Die Suspension wird mit Ethylacetat (3 × 20 mL) extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Bieber*.^[340]

Benzolsulfonsäurechlorid **50** (39.2 mg, 1.27 mmol, 1.0 äq.) wird in trockenem Acetonitril (15 mL) gelöst. Zu der Lösung wird unter Eiskühlung *N*-Boc-geschütztes Diamin **130** (1.43 g, 7.61 mmol, 6.0 äq.) gegeben. Die Reaktionslösung wird 2.5 Tage gerührt, während die Reaktionslösung langsam Raumtemperatur erreicht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, 1 M Salzsäure (30 mL) hinzugegeben und unter Rückfluss gerührt. Nach 22 Stunden wird durch die Zugabe von Natriumhydrogencarbonat pH 9 eingestellt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels CombiFlash-System (Methode B) über Umkehrphase gereinigt. Die mit Natriumchlorid verunreinigte Fraktion wird in wenig Methanol aufgenommen, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Dieser Vorgang wird siebenmal wiederholt.



Ausbeute: 130 mg (535 µmol, 42%), gelbliches Öl, $R_f = 0.29$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% NEt₃), C₁₅H₂₅N₃O₄S, (343.44), [343.1566].

¹H-NMR, COSY (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.56–7.51 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 6.69–6.65 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 4.20 (s_{br}, 2H, NH₂), 3.05 (t, J = 6.1 Hz, 2H, SN(CH₂)), 2.73 (t, J = 6.1 Hz, 2H, NH(CH₂)), 2.70 (s, 3H, SN(CH₃)), 2.43 (s, 3H, NH(CH₃)), 2.00 (s_{br}, 2H, NH) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (125.6 MHz, CDCl_3): δ = 150.8 (C_q -4), 129.6 (CH-2, CH-6), 125.1 (C_q -1), 114.2 (CH-3, CH-5), 49.8 $\text{SN}(\text{CH}_2)$, 49.2 $\text{NH}(\text{CH}_2)$, 36.1 $\text{NH}(\text{CH}_3)$, 35.6 $\text{SN}(\text{CH}_3)$ ppm.

ESI-MS (pos.): 344.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 344.1).

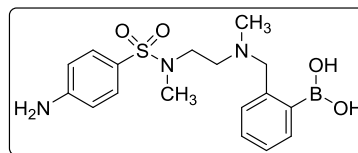
HR-ESI-MS (pos.): 344.1180 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 344.1140).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2963, 1637, 1596, 1317, 1261, 1151, 1033, 725 cm^{-1} .

5.6.4 4-Aminobenzolsulfonamid 132

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Yin.^[431]

Amin **131** (63.2 mg, 0.26 mmol, 1.0 äq.) wird in trockenem Dichlormethan (3.5 mL) gelöst und mit Triethylamin (50 μL , 0.39 mmol, 1.5 äq.) versetzt.



2-Bromomethylphenylboronsäure (55.9 mg, 0.26 mmol, 1.0 äq.) wird in Dichlormethan (2 mL) suspendiert und zu der Reaktionslösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels CombiFlash-System (Methode C) über Umkehrphase gereinigt.

Ausbeute: 53 mg (140 μmol , 54%), farblose Flüssigkeit, R_f = 0.31 (EtOAc/MeOH/ H_2O 7:2:1 + 0.5 Vol% AcOH), $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{BN}_3\text{O}_4\text{S}$, (377.27), [377.1581].

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.89 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H -6'), 7.53–7.49 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H -4, H -6), 7.38–7.30 (m, 2H, H -4', H -5'), 7.17 (d, J = 6.6 Hz, 2H, H -3'), 6.68–6.64 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H -3, H -5), 4.13 (s_{br} , 2H, NH_2), 3.68 (s, 2H, CH_2Ar), 3.09 (t, J = 7.1 Hz, 2H, $\text{SN}(\text{CH}_2)$), 2.69–2.62 (m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_2)$), 2.58 (s, 3H, $\text{SN}(\text{CH}_3)$), 2.34 (s, 3H, $\text{N}(\text{CH}_3)$) ppm.

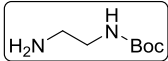
^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 150.7 (C_q -4), 141.2 (C_q -1'), 136.2 (CH-6'), 134.6 (C_q -2'), 130.5 (CH-3'), 130.2 (CH-4'), 129.5 (CH-2, CH-6), 127.6 (CH-5'), 124.9 (C_q -1), 114.1 (CH-3, CH-5), 64.1 (CH_2Ar), 53.1 ($\text{N}(\text{CH}_2)$), 47.2 ($\text{SN}(\text{CH}_2)$), 41.0 ($\text{N}(\text{CH}_3)$), 35.3 ($\text{SN}(\text{CH}_3)$) ppm.

ESI-MS (pos.): 378.2 ($[M+H]^+$, ber.: 378.2).

HR-ESI-MS (pos.): 378.1674 ($[M+H]^+$, ber.: 378.1654).

5.6.5 N-Boc-geschütztes Diamin 121

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Gilon.^[428]

Ethylen-1,2-diamin (3.1 mL, 45.8 mmol, 10.0 äq.) wird in Chloroform (45 mL) gelöst. Unter Eiskühlung wird in Chloroform (25 mL) gelöstes  Di-*tert*-butyldicarbonat (1.00 g, 4.58 mmol, 1.0 äq.) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 26 Stunden gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingengt und mit Wasser (3 × 30 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 526 mg (3.29 mmol, 72%), farblose Flüssigkeit, $R_f = 0.11$ (EtOAc/MeOH/H₂O 4:2:1 + 0.5 Vol% NEt₃), C₇H₁₆N₂O₂, (160.22), [160.1212].

¹H-NMR, COSY (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.89$ (s_{br}, 1H, NH), 3.20–3.13 (m, 2H, CONH(CH₂)), 2.79 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, NH₂CH₂), 1.52 (s_{br}, 2H, NH₂), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

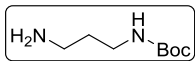
Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[428]

¹³C-NMR, HSQC (125.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 156.7$ (CO), 79.7 (C(CH₃)₃), 43.8 (CONH(CH₂)), 42.3 (NH₂CH₂), 28.8 (C(CH₃)₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[432]

5.6.6 N-Boc-geschütztes Diamin 122

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Gilon.^[428]

Propylen-1,3-diamin (3.9 mL, 45.8 mmol, 10.0 äq.) wird in Chloroform (45 mL) gelöst. Unter Eiskühlung wird in Chloroform (25 mL) gelöstes  Di-*tert*-butyldicarbonat (1.00 g, 4.58 mmol, 1.0 äq.) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 22 Stunden gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingengt und mit Wasser (3 × 30 mL) gewaschen. Die vereinigten

organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 771 mg (4.43 mmol, 97%), farblose Flüssigkeit, $R_f = 0.14$ (EtOAc/MeOH/H₂O 4:2:1 + 0.5 Vol% NEt₃), C₈H₁₈N₂O₂, (174.24), [174.1368].

¹H-NMR, COSY (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.90$ (s_{br}, 1H, NH), 3.24–3.18 (m, 2H, CONH(CH₂)), 2.77 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, NH₂CH₂), 1.65–1.55 (m, 4H, CH₂, NH₂), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[428]

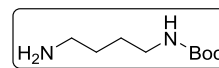
¹³C-NMR, HSQC (125.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 156.3$ (CO), 79.2 (C(CH₃)₃), 39.8 (NH₂CH₂), 38.5 (CONH(CH₂)), 33.4 (CH₂), 28.6 (C(CH₃)₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[433]

5.6.7 N-Boc-geschütztes Putrescin 123

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Gilon.^[428]

Butylen-1,4-diamin (4.04 g, 45.8 mmol, 10.0 äq.) wird in Chloroform (45 mL) gelöst. Unter Eiskühlung wird in Chloroform (25 mL) gelöstes Di-*tert*-butyldicarbonat (1.00 g, 4.58 mmol, 1.0 äq.) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 2 Tage gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingengt und mit Wasser (8 × 30 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



Ausbeute: 861 mg (4.52 mmol, 98%), farblose Flüssigkeit, $R_f = 0.93$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% NEt₃), C₉H₂₀N₂O₂, (188.27), [188.1525].

¹H-NMR, COSY (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.65$ (s_{br}, 1H, NH), 3.16–3.08 (m, 2H, CONH(CH₂)), 2.74–2.68 (m, 2H, NH₂CH₂), 1.55–1.45 (m, 4H, 2 × CH₂), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[428]

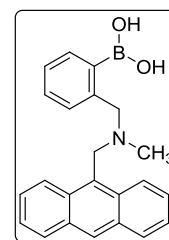
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (125.6 MHz, CDCl_3): δ = 156.1 (CO), 79.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 41.9 (NH_2CH_2), 40.6 ($\text{CONH}(\text{CH}_2)$), 28.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.6 ($2 \times \text{CH}_2$) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[433]

5.6.8 (2-[[*(Anthracen-9-ylmethyl)(methyl)amino*]]methyl]phenyl)boronsäure (124; Shinkai's Reagenz)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Williams.^[434]

2-Formylphenylboronsäure (358 mg, 2.39 mmol, 2.0 äq.), 9-(Methylaminomethyl)anthracen (264 mg, 1.19 mmol, 1.0 äq.) und Kaliumcarbonat (16.5 mg, 119 μmol , 0.1 äq.) werden in Methanol (2.5 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wird 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wird Natriumborhydrid (90 mg, 2.39 mmol, 2.0 äq.) hinzugegeben und 26 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, Wasser (10 mL) zugegeben und mit Dichlormethan (10 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird in Wasser und Methanol (Verhältnis 1:9) gelöst und 3 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt.



Ausbeute: 216 mg (608 μmol , 51%), hellgelbe Kristalle, R_f = 0.68 (EtOAc/MeOH/ H_2O 7:2:1 + 0.5 Vol% NEt_3), Schmelzbereich: 115.1–117.9 °C (Methanol/Wasser 9:1), Schmelzbereich (Lit.^[386]): 147.9–151.9 °C (Ethylacetat), $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{BNO}_2$, (355.24), [355.1744].

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.44 (s, 1H, H_{10}), 8.12–8.04 (m, 2H, ArH), 8.03–7.98 (m, 2H, ArH), 7.52–7.40 (m, 8H, ArH), 4.48 (s, 2H, CH_2), 3.94 (s, 2H, CH_2), 3.74 (s_{br}, 2H, $2 \times \text{OH}$), 2.26 (s, 3H, CH_3) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[386]

^{13}C -NMR (125.6 MHz, CDCl_3): δ = 141.5, 136.0, 131.4, 131.3, 131.2, 130.1, 129.2, 128.3 (C_{10}), 128.0, 127.9, 125.9, 125.0, 124.6, 65.7 (CH_2), 50.5 (CH_2), 42.0 (CH_3) ppm.

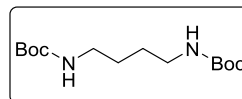
Die spektroskopischen Daten in der Literatur wurden in CD_3OD gemessen.^[434]

^{11}B -NMR (160 MHz, CDCl_3): $\delta = 29.3$ (s_{br} , $\text{ArB}(\text{OH})_2$) ppm.

5.6.9 *N,N'*-Di-Boc-geschütztes Putrescin **134**

Nach einer Synthesevorschrift von *Ehud*.^[435]

Putrescin (2.14 g, 23.4 mmol, 1.0 äq.) wird in Dichlormethan (50 mL) gelöst und Triethylamin (4 mL, 72.9 mmol, 3.0 äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wird auf 0 °C abgekühlt und Di-*tert*-butyldicarbonat (11.66 g, 53.4 mmol, 2.2 äq.) hinzugegeben. Es wird 19 Stunden gerührt, während die Reaktionslösung langsam Raumtemperatur erreicht. Es wird gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung (50 mL) zugegeben und 15 Minuten gerührt. Die organische Phase wird mit 1% HCl, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (je 30 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.



Ausbeute: 4.88 g (16.9 mmol, 70%), farbloser Feststoff, $R_f = 0.76$ (EtOAc + 0.5 Vol% NEt_3), Schmelzbereich: 132.0–133.4 °C (Dichlormethan), Schmelzbereich (Lit.^[436]): 135–137 °C, $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$, (288.39), [288.2049].

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.64$ (s, 2H, $2 \times \text{NH}$), 3.13–3.05 (m, 4H, $2 \times \text{NH}(\text{CH}_2)$), 1.50–1.44 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.40 (s, 18H, $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[437]

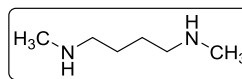
^{13}C -NMR, HMBC (100.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 156.1$ ($2 \times \text{CO}$), 79.3 ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 40.3 ($2 \times \text{NH}(\text{CH}_2)$), 28.5 ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.5 ($2 \times \text{CH}_2$) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[437]

5.6.10 *N,N'*-Dimethylbutylen-1,4-diamin (**133**)

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Axt*.^[438]

Zu einer Suspension von Lithiumaluminiumhydrid (1.20 g, 31.6 mmol, 1.8 äq.) in trockenem Tetrahydrofuran (50 mL) wird unter Eiskühlung langsam eine Lösung von *N,N'*-Di-Boc geschütztem Putrescin **134** (4.95 g, 17.2 mmol, 1.0 äq.) in trockenem Tetrahydrofuran (40 mL) getropft. Die Reaktionslösung



wird 24 Stunden gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Es wird 12 Tage unter Rückfluss gerührt. Dann wird Diethylether (200 mL) zugegeben und auf 0 °C abgekühlt. Die Reaktionslösung wird nacheinander langsam mit Wasser (1.2 mL), 15% Natriumhydroxid-Lösung (1.2 mL) und Wasser (3.6 mL) versetzt und anschließend 30 Minuten gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Es wird Magnesiumsulfat zugegeben und die Lösung filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 1.20 g (10.3 mmol, 60%), gelbliche Flüssigkeit, $R_f = 0.33$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% NEt₃), C₆H₁₆N₂, (116.21), [116.1313].

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 2.55\text{--}2.48$ (m, 4H, 2 $\times$ NH(CH₂)), 2.36 (s, 6H, 2 $\times$ CH₃), 1.48–1.42 (m, 4H, 2 $\times$ CH₂), 1.31 (s_{br}, 2H, 2 $\times$ NH) ppm.

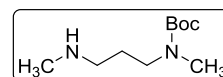
Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[439]

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 52.1$ (2 $\times$ NH(CH₂)), 36.6 (2 $\times$ NH(CH₃)), 27.7 (2 $\times$ CH₂) ppm.

5.6.11 N-Boc-geschütztes Diamin 135

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Gilon*.^[428]

N,N'-Dimethylpropylen-1,3-diamin (5.00 g, 48.9 mmol, 5.0 äq.) wird in Chloroform (60 mL) gelöst. Unter Eiskühlung wird in Chloroform (20 mL) gelöstes Di-*tert*-butyldicarbonat (2.14 g, 9.79 mmol, 1.0 äq.) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 20 Stunden gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingengt und mit Wasser (3 $\times$) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



Ausbeute: 1.98 g (9.79 mmol, quant.), farblose Flüssigkeit, $R_f = 0.22$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% NEt₃), C₁₀H₂₂N₂O₂, (202.30), [202.1681].

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 3.27 (s, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)$), 3.21 (s_{br} , 1H, NH), 2.84 (s_{br} , 3H, $\text{CON}(\text{CH}_3)$), 2.55 (t, J = 6.9 Hz, 2H, $\text{NH}(\text{CH}_2)$), 2.42 (s, 3H, $\text{NH}(\text{CH}_3)$), 1.70 (p, J = 6.9 Hz, 2H, CH_2), 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

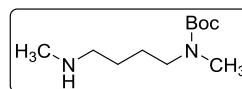
Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[440]

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 155.9 (CO), 79.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 49.3 ($\text{NH}(\text{CH}_2)$), 48.8 ($\text{CON}(\text{CH}_2)$), 36.6 ($\text{NH}(\text{CH}_3)$), 34.1 ($\text{CON}(\text{CH}_3)$), 28.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.6 (CH_2) ppm.

5.6.12 N-Boc-geschütztes Diamin 136

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Gilon.^[428]

N,N'-Dimethylbutylen-1,4-diamin (5.00 g, 43.0 mmol, 4.0 äq.) wird in Chloroform (45 mL) gelöst. Unter Eiskühlung wird in Chloroform (150 mL) gelöstes Di-*tert*-butyldicarbonat (2.35 g, 10.8 mmol, 1.0 äq.) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 18 Stunden gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingeeengt und mit Wasser (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und überschüssiges *N,N'*-Dimethylbutylen-1,4-diamin im Vakuum (2 mbar) bei 75 °C abdestilliert.



Ausbeute: 2.35 g (10.9 mmol, quant.), farblose Flüssigkeit, R_f = 0.23 (EtOAc/MeOH/ H_2O 7:2:1 + 0.5 Vol% NEt_3), $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$, (216.33), [216.1838].

$^1\text{H-NMR}$, COSY (500 MHz, CDCl_3): δ = 3.16 (s_{br} , 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)$), 2.79 (s_{br} , 3H, $\text{CON}(\text{CH}_3)$), 2.54 (t, J = 7.1 Hz, 2H, $\text{NH}(\text{CH}_2)$), 2.38 (s, 3H, $\text{NH}(\text{CH}_3)$), 1.77–1.70 (m, 1H, NH), 1.53–1.46 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2)$), 1.45–1.38 (m, 2H, $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)$), 1.40 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (125.6 MHz, CDCl_3): δ = 155.9 (CO), 79.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 51.9 ($\text{NH}(\text{CH}_2)$), 48.9 ($\text{CON}(\text{CH}_2)$), 36.6 ($\text{NH}(\text{CH}_3)$), 34.2 ($\text{CON}(\text{CH}_3)$), 28.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.1 ($\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2)$), 25.9 ($\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)$) ppm.

ESI-MS (pos.): 117.1 ($[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$, ber.: 117.1).

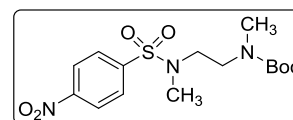
HR-ESI-MS (pos.): 217.1907 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 217.1911).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2929, 2870, 1689, 1480, 1454, 1392, 1365, 1309, 1156, 878, 753 cm^{-1} .

5.6.13 *N'*-Boc-geschütztes Sulfonamid 137

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Wityak.^[441]

Das Amin **130** (1.02 g, 5.42 mmol, 1.0 äq.) wird in Dichlormethan (15 mL) gelöst und mit *N,N*-Diisopropylethylamin (1.4 mL, 8.13 mmol, 1.5 äq.) versetzt.



Unter Eiskühlung wird 4-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid (1.20 g, 5.42 mmol, 1.0 äq.) zugegeben. Die gelbe Reaktionslösung wird 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Hexan/EtOAc 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.63 g (4.37 mmol, 81%), farbloser Feststoff, R_f = 0.19 (*n*-Hexan/EtOAc 3:1), Schmelzbereich: 97.0–99.1 °C (Chloroform), $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, (373.42), [373.1308].

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.39–8.34 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 7.98–7.94 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 3.44–3.37 (m, 2H, $\text{CON}(\text{CH}_2)$), 3.23–3.15 (m, 2H, $\text{SN}(\text{CH}_2)$), 2.91–2.88 (m, 3H, $\text{CON}(\text{CH}_3)$), 2.84 (s, 3H, $\text{SN}(\text{CH}_3)$), 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3): δ = 155.9 (CO), 155.3 (CO), 150.1 (C_q -4), 143.8 (C_q -1), 128.5 (*CH*-2, *CH*-6), 124.5 (*CH*-3, *CH*-5), 80.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 48.2 ($\text{SN}(\text{CH}_2)$), 47.8 ($\text{SN}(\text{CH}_2)$), 47.5 ($\text{CON}(\text{CH}_2)$), 46.6 ($\text{CON}(\text{CH}_2)$), 35.7 ($\text{SN}(\text{CH}_3)$), 35.3 ($\text{SN}(\text{CH}_3)$), 35.2 ($\text{CON}(\text{CH}_3)$), 34.8 ($\text{CON}(\text{CH}_3)$), 28.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

ESI-MS (pos.): 396.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 396.1).

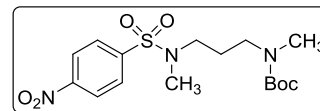
HR-ESI-MS (pos.): 396.1201 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 396.1200).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2975, 2926, 1689, 1530, 1394, 1348, 1160, 1088, 980, 855 cm^{-1} .

5.6.14 *N'*-Boc-geschütztes Sulfonamid 138

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Wityak.^[441]

Das Amin 135 (502 mg, 2.48 mmol, 1.0 äq.) wird in Dichlormethan (8 mL) gelöst und mit *N,N*-Diisopropylethylamin (650 µL, 3.72 mmol, 1.5 äq.) versetzt.



Unter Eiskühlung wird 4-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid (502 mg, 2.48 mmol, 1.0 äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit Dichlormethan (7 mL) verdünnt und mit 1% Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie Wasser (je 1 × 10 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Hexan/EtOAc 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 741 mg (1.91 mmol, 77%), farblose Flüssigkeit, $R_f = 0.34$ (*n*-Hexan/EtOAc 4:1), $C_{16}H_{25}N_3O_6S$, (387.45), [387.1464].

1H -NMR, COSY (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.39$ – 8.35 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 7.98 – 7.94 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 3.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CON(CH_2)), 3.05 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, SN(CH_2)), 2.86 (s, 3H, CON(CH_3)), 2.80 (s, 3H, SN(CH_3)), 1.80 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.45 (s, 9H, C(CH_3)₃) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (125.6 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 155.8$ (CO), 150.2 (C_q -4), 143.5 (C_q -1), 128.6 (CH-2, CH-6), 124.5 (CH-3, CH-5), 79.7 (C(CH_3)₃), 48.2 (SN(CH_2)), 46.3 (CON(CH_2)), 34.9 (SN(CH_3)), 34.6 (CON(CH_3)), 28.6 (C(CH_3)₃), 26.2 (CH_2) ppm.

ESI-MS (pos.): 410.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 410.1).

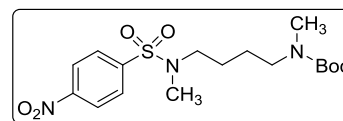
HR-ESI-MS (pos.): 410.1373 ($[M+Na]^+$, ber.: 410.1356).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2974, 2931, 1686, 1530, 1394, 1348, 1310, 1159, 1088, 961, 740$ cm^{-1} .

5.6.15 *N'*-Boc-geschütztes Sulfonamid 139

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Wityak.^[441]

Das Amin **136** (2.35 g, 10.9 mmol, 1.0 äq.) wird in Dichlormethan (25 mL) gelöst und mit *N,N*-Diisopropylethylamin (2.8 mL, 16.3 mmol, 1.5 äq.) versetzt.



Unter Eiskühlung wird 4-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid (2.41 g, 10.9 mmol, 1.0 äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Hexan/EtOAc 4:1→3:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.25 g (8.10 mmol, 75%), gelbliche Flüssigkeit, $R_f = 0.90$ (*n*-Hexan/EtOAc 1:1), $C_{17}H_{27}N_3O_6S$, (401.48), [401.1621].

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.36$ – 8.32 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-5, *H*-3), 7.96 – 7.91 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 3.24 – 3.17 (m, 2H, CON(CH_2)), 3.08 – 3.01 (m, 2H, SN(CH_2)), 2.79 (s, 3H, CON(CH_3)), 2.74 (s, 3H, SN(CH_3)), 1.57 – 1.48 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 1.40 (s, 9H, C(CH_3)₃) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (125.6 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 155.9$ (CO), 150.0 (C_q -4), 143.6 (C_q -1), 128.5 (CH-2, CH-6), 124.4 (CH-3, CH-5), 79.3 (C(CH_3)₃), 49.8 (SN(CH_2)), 47.8 (CON(CH_2)), 34.6 (SN(CH_3)), 34.1 (CON(CH_3)), 28.5 (C(CH_3)₃), 24.6 ($2 \times CH_2$) ppm.

ESI-MS (pos.): 302.1 ([M–Boc+H]⁺, ber.: 302.1), 424.2 ([M+Na]⁺, ber.: 424.2).

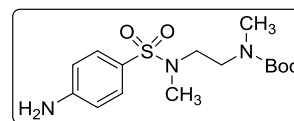
HR-ESI-MS (pos.): 302.1178 ([M–Boc+H]⁺, ber.: 302.1169), 424.1525 ([M+Na]⁺, ber.: 424.1513).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2975, 2933, 1684, 1530, 1397, 1348, 1310, 1159, 1088, 913 \text{ cm}^{-1}$.

5.6.16 N'-Boc-geschütztes Sulfonamid 140

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Liu.^[442]

Die Nitroverbindung **137** (1.62 g, 4.34 mmol, 1.0 äq.) wird in Ethylacetat (15 mL) gelöst. Dann wird Palladium auf Aktivkohle (10wt%, 81 mg, 5wt%) hinzugegeben. Die



Reaktionslösung wird 3 Tage unter Wasserstoff-Atmosphäre bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Kieselgel (Ethylacetat) filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 1.49 g (4.34 mmol, quant.), gelbliche Flüssigkeit, $R_f = 0.40$ (*n*-Hexan/EtOAc 1:1), $C_{15}H_{25}N_3O_4S$, (343.44), [343.1566].

1H -NMR, COSY (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.55$ (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 6.70–6.67 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 4.14 (s_{br} , 2H, NH_2), 3.43–3.34 (m, 2H, $CON(CH_2)$), 3.12–3.05 (m, 2H, $SN(CH_2)$), 2.90 (d, $J = 9.7$ Hz, 3H, $CON(CH_3)$), 2.74 (s, 3H, $SN(CH_3)$), 1.44 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ppm.

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (125.6 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 156.0$ (CO), 155.5 (CO), 150.6 (C_{q-4}), 129.6 (CH-2, CH-6), 125.7 (C_{q-1}), 114.2 (CH-3, CH-5), 79.9 ($C(CH_3)_3$), 79.7 ($C(CH_3)_3$), 48.2 ($SN(CH_2)$), 47.9 ($SN(CH_2)$), 47.7 ($CON(CH_2)$), 46.8 ($CON(CH_2)$), 35.8 ($SN(CH_3)$), 35.6 ($SN(CH_3)$), 35.2 ($CON(CH_3)$), 34.9 ($CON(CH_3)$), 28.5 ($C(CH_3)_3$) ppm.

ESI-MS (pos.): 244.2 ($[M-Boc+H]^+$, ber.: 244.1), 366.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 366.1).

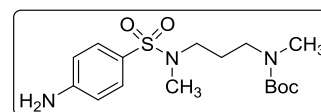
HR-ESI-MS (pos.): 366.1463 ($[M+Na]^+$, ber.: 366.1458).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3476, 3373, 2976, 2926, 1680, 1630, 1596, 1318, 1149, 1048, 887$ cm^{-1} .

5.6.17 N'-Boc-geschütztes Sulfonamid 141

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Liu.^[442]

Die Nitroverbindung **138** (657 mg, 1.76 mmol, 1.0 äq.) wird in Ethylacetat (8 mL) gelöst. Dann wird Palladium auf Aktivkohle (10wt%, 33 mg, 5wt%) hinzugegeben. Die



Reaktionslösung wird 5 Stunden unter Wasserstoff-Atmosphäre bei Raumtemperatur

gerührt und anschließend über Kieselgel (Ethylacetat) filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 620 mg (1.74 mmol, 99%), gelbliche, viskose Flüssigkeit, $R_f = 0.78$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% NEt₃), C₁₆H₂₇N₃O₄S, (357.47), [357.1722].

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.55\text{--}7.51$ (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-2, H-6), $6.71\text{--}6.65$ (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-3, H-5), $3.27\text{--}3.22$ (m, 2H, CON(CH₂)), $2.96\text{--}2.91$ (m, 2H, SN(CH₂)), 2.85 (s, 3H, CON(CH₃)), 2.67 (s, 3H, SN(CH₃)), $1.82\text{--}1.68$ (m, 2H, CH₂), 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 155.8$ (CO), 150.6 (C_q-4), 129.6 (CH-2, CH-6), 125.3 (C_q-1), 114.2 (CH-3, CH-5), 77.4 (C(CH₃)₃), 48.0 (SN(CH₂)), 46.4 (CON(CH₂)), 34.9 (SN(CH₃)), 34.5 (CON(CH₃)), 28.6 (C(CH₃)₃), 26.1 (CH₂) ppm.¹²

ESI-MS (pos.): 380.2 ([M+Na]⁺, ber.: 380.2).

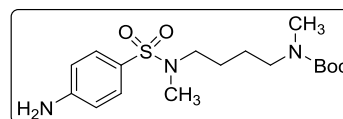
HR-ESI-MS (pos.): 380.1624 ([M+Na]⁺, ber.: 380.1614).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3369, 2972, 2922, 1685, 1635, 1597, 1318, 1154, 1054, 772\text{ cm}^{-1}$.

5.6.18 N'-Boc-geschütztes Sulfonamid 142

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Liu.^[442]

Die Nitroverbindung **139** (3.25 g, 8.10 mmol, 1.0 äq.) wird in Ethylacetat (30 mL) gelöst. Dann wird Palladium auf Aktivkohle (10wt%, 163 mg, 5wt%) hinzugegeben. Die



Reaktionslösung wird 20 Stunden unter Wasserstoff-Atmosphäre bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Kieselgel (Ethylacetat) filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

¹² Das quartäre Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe CO sowie die Kohlenstoffatome CON(CH₂), CON(CH₃), SN(CH₃) sind im ¹³C-Spektrum aufgrund sehr breiter Signale nicht sichtbar. Im HSQC und HMBC sind deutliche Kontakte vorhanden.

Ausbeute: 3.01 g (8.10 mmol, quant.), farblose Flüssigkeit, $R_f = 0.29$ (*n*-Hexan/EtOAc 1:1), $C_{17}H_{29}N_3O_4S$, (371.50), [371.1879].

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.55$ – 7.51 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-2, *H*-6), 6.70 – 6.65 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, *H*-3, *H*-5), 4.17 (s_{br} , 2H, NH_2), 3.24 – 3.18 (m, 2H, $CON(CH_2)$), 2.95 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, $SN(CH_2)$), 2.82 (s_{br} , 3H, $CON(CH_3)$), 2.65 (s, 3H, $SN(CH_3)$), 1.60 – 1.46 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 1.43 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ppm.

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 155.9$ (CO), 150.5 (C_q -4), 129.6 (CH-2, CH-6), 125.6 (C_q -1), 114.2 (CH-3, CH-5), 79.4 ($C(CH_3)_3$), 49.8 ($SN(CH_2)$), 48.4 ($CON(CH_2)$), 34.7 ($SN(CH_3)$), 34.2 ($CON(CH_3)$), 28.6 ($C(CH_3)_3$), 24.8 ($2 \times CH_2$) ppm.

ESI-MS (pos.): 394.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 394.2).

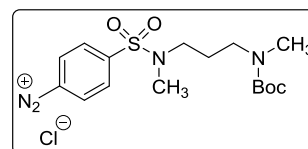
HR-ESI-MS (pos.): 394.1774 ($[M+Na]^+$, ber.: 394.1771).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3466, 3370, 2976, 2931, 1676, 1631, 1596, 1316, 1148, 1091, 831$ cm^{-1} .

5.6.19 *N'*-Boc-geschütztes Amin 145

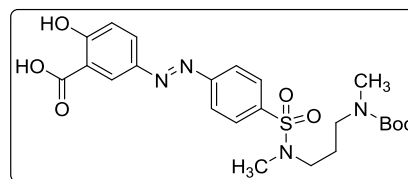
Angelehnt an eine Synthesevorschrift im *Organikum*.^[398]

Das Anilin **141** (330 mg, 924 μ mol, 1.0 äq.) wird in 1 M HCl (2.8 mL, 2.77 mmol, 3.0 äq.) bei 0 °C unter kräftigem Rühren 5 Minuten suspendiert. Die Suspension wird unter kräftigem



Rühren mit einer 2.5 M Natriumnitrit-Lösung (370 μ L, 924 μ mol, 1.0 äq.) versetzt. Nach 5 Minuten wird mit Kaliumiodid-Stärke-Papier auf freies Nitrit geprüft und solange 2.5 M Natriumnitrit-Lösung weiter zugegeben bis der Nachweis 5 Minuten nach der Zugabe positiv ausfällt.

Salicylsäure (**32**) (128 mg, 924 μ mol, 1.0 äq.) wird in 2 M Natriumhydroxid-Lösung (1.4 mL, 2.77 mmol, 3.0 äq.) gelöst und auf 5–10 °C gekühlt. Die Diazonium-



Lösung wird so zugetropft, dass der pH-Wert durch die Zugabe von 2 M Natriumhydroxid-Lösung bei 9–10 und die Temperatur bei 0–5 °C liegt. Nach der Zugabe wird mit 1 M HCl zügig pH 1 eingestellt. Der Niederschlag wird über

einen Büchnertrichter filtriert und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Der Rückstand wird in Ethylacetat (40 mL) gelöst, mit Wasser (2 × 20 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird erneut in Wasser (20 mL) suspendiert, filtriert und weiter umgesetzt.

Ausbeute: 340 mg (verunreinigt mit 30% Salicylsäure (**32**)), roter Feststoff, $R_f = 0.60$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% AcOH), C₂₃H₃₀N₄O₇S, (506.57), [506.1835].

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 11.19$ (s_{br}, 1H, OH), 8.53 (s_{br}, 1H, H-6), 8.09 (s_{br}, 1H, H-4), 8.01–7.86 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.11 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-3), 3.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CON(CH₂)), 3.09–3.04 (m, 2H, SN(CH₂)), 2.89 (s, 3H, CON(CH₃)), 2.79 (s, 3H, SN(CH₃)), 1.82 (s_{br}, 2H, CH₂), 1.48 (s, 9H, (C(CH₃)₃)) ppm.

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 162.3$ (C_q-2), 158.8 (CO, Boc), 154.8 (C_q-1'), 145.3 (C_q-5), 136.9 (C_q-4'), 129.2 (CH-4), 129.0 (CH-6), 128.6 (CH-3', CH-5'), 123.3 (CH-2', CH-6'), 118.9 (CH-3), 112.1 (C_q-1), 80.3 (C(CH₃)₃), 48.1 (SN(CH₂)), 46.5 (CON(CH₂)), 34.9 (SN(CH₃)), 34.8 (CON(CH₃)), 28.6 (C(CH₃)₃), 26.2 (CH₂) ppm.¹³

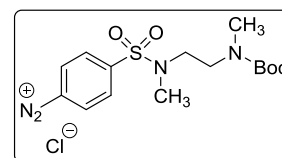
ESI-MS (neg.): 505.2 ([M-H]⁻, ber.: 505.2).

HR-ESI-MS (neg.): 505.1777 ([M-H]⁻, ber.: 505.1762).

5.6.20 N'-Boc geschütztes Amin 143

Angelehnt an eine Synthesevorschrift im *Organikum*.^[398]

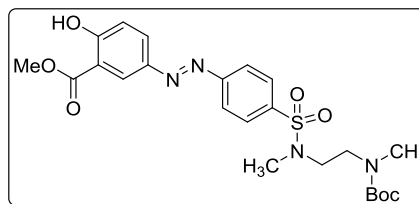
Das Anilin **140** (502 mg, 1.46 mmol, 1.0 äq.) wird in 1 M HCl (4.4 mL, 4.38 mmol, 3.0 äq.) bei 0 °C unter kräftigem Rühren 5 Minuten suspendiert. Die Suspension wird unter kräftigem Rühren mit einer 2.5 M Natriumnitrit-Lösung (585 µL, 1.46



mmol, 1.0 äq.) versetzt. Nach 5 Minuten wird mit Kaliumiodid-Stärke-Papier auf freies Nitrit geprüft und solange 2.5 M Natriumnitrit-Lösung weiter zugegeben bis der Nachweis 5 Minuten nach der Zugabe positiv ausfällt.

¹³ Das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Boc-Schutzgruppe CO sowie die Kohlenstoffatome (C_q-1'), (C_q-5), (C-4), CON(CH₂) sind im ¹³C-Spektrum aufgrund sehr breiter Signale nicht sichtbar. Im HSQC und HMBC sind deutliche Kontakte vorhanden. Für das quartäre Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe ist kein Kontakt im HMBC sichtbar.

Salicylsäuremethylester (**39**) (222 mg, 1.46 mmol, 1.0 äq.) wird in 2 M Natriumhydroxid-Lösung (2.2 mL, 4.38 mmol, 3.0 äq.) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die Diazonium-Lösung wird so zugetropft, dass der pH-Wert durch die Zugabe von 2 M Natriumhydroxid-Lösung bei 9–10 und die Temperatur bei 0 °C liegt. Nach der Zugabe wird mit 1 M HCl zügig pH 1 eingestellt, der Niederschlag über einen Büchnertrichter filtriert und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Der Rückstand wird mittels CombiFlash-System über Umkehrphase (Methode G) gereinigt.



Ausbeute: 363 mg (717 μ mol, 49%), orangener Feststoff, R_f = 0.75 (EtOAc), $C_{23}H_{30}N_4O_7S$, (506.57), [506.1835].

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 11.23 (s, 1H, OH), 8.52 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H -6), 8.12 (dd, J = 9.0 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, H -4), 8.01–7.97 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H -2', H -6'), 7.93–7.90 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, H -3', H -5'), 7.13 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H -3), 4.03 (s, 3H, OCH_3), 3.46–3.39 (m, 2H, $CON(CH_2)$), 3.22–3.16 (m, 2H, $SN(CH_2)$), 2.95–2.91 (m, 3H, $CON(CH_3)$), 2.85 (s, 3H, $SN(CH_3)$), 1.46 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ppm.

^{13}C -NMR (125.6 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.4 ($COOCH_3$), 164.8 (C_{q-2}), 156.0 (CO), 155.5 (CO), 154.7 ($C_{q-1'}$), 145.3 (C_{q-5}), 138.9 ($C_{q-4'}$), 129.0 (CH-4), 128.5 (CH-3', CH-5'), 127.9 (CH-6), 123.3 (CH-2', CH-6'), 118.9 (CH-3), 112.7 (C_{q-1}), 80.1 ($C(CH_3)_3$), 79.9 ($C(CH_3)_3$), 52.9 (OCH_3), 48.3 ($SN(CH_2)$), 47.9 ($SN(CH_2)$), 47.7 ($CON(CH_2)$), 46.8 ($CON(CH_2)$), 35.8 ($SN(CH_3)$), 35.5 ($SN(CH_3)$), 35.3 ($CON(CH_3)$), 34.9 ($CON(CH_3)$), 28.5 ($C(CH_3)_3$) ppm.

ESI-MS (pos.): 529.6 ($[M+Na]^+$, ber.: 529.2).

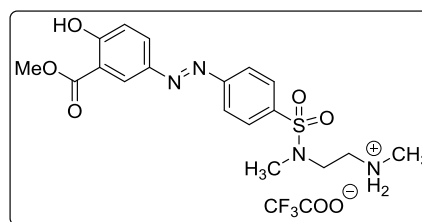
HR-ESI-MS (pos.): 529.1734 ($[M+Na]^+$, ber.: 529.1727).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3005, 2957, 2927, 1678, 1585, 1480, 1348, 1291, 1216, 1087, 972 cm^{-1} .

5.6.21 TFA-Salz des *N'*-Methylethylamins **144**

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Bracher*.^[443]

Das *N'*-Boc geschützte Amin **143** (336 mg, 664 μmol , 1.0 äq.) wird in Dichlormethan (10 mL) gelöst. Die Lösung wird auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und mit Trifluoressigsäure (1.0 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wird 18 Stunden gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.



Ausbeute: 300 mg (576 μmol , 87%), orangerote Flüssigkeit, $R_f = 0.35$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% NEt₃), C₂₀H₂₃F₃N₄O₇S, (520.48), [520.1240].

¹H-NMR, COSY (500 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 11.19$ (s, 1H, OH), 8.58 (s_{br}, 2H, NH), 8.35 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, *H*-6), 8.12 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H, *H*-4), 8.09–8.06 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 8.01–7.96 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 7.22 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, *H*-3), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.25 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, SO₂NCH₂), 3.17–3.11 (m, 2H, CH₂NH), 2.76 (s, 3H, SO₂NCH₃), 2.62 (t, $J = 5.1$ Hz, 3H, NHCH₃) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 167.9$ (COOCH₃), 162.9 (C_q-2), 154.3 (C_q-1'), 144.6 (C_q-5), 137.3 (C_q-4'), 129.1 (CH-4), 128.9 (CH-3', CH-5'), 126.6 (CH-6), 123.3 (CH-2', CH-6'), 119.0 (CH-3), 115.0 (C_q-1), 52.8 (OCH₃), 46.2 (SO₂NCH₂), 45.5 (CH₂NH), 35.4 (SO₂NCH₃), 32.7 (NHCH₃) ppm.

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -74.3$ (s, 3F, CF₃) ppm.

ESI-MS (pos.): 407.1 ([M+H]⁺, ber.: 407.1).

HR-ESI-MS (pos.): 407.1369 ([M+H]⁺, ber.: 407.1384).

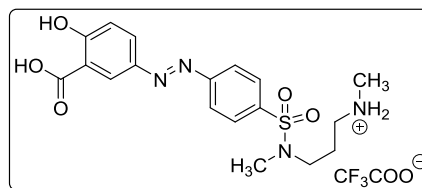
IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3356, 2948, 2836, 1677, 1446, 1261, 1169, 1142, 1017, 801\text{ cm}^{-1}$.

5.6.22 TFA-Salz des *N'*-Methylpropylamins 146

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von Bracher.^[443]

Das rohe *N'*-Boc geschützte Amin 145 (340 mg, 671 μmol , 1.0 äq.) wird in Dichlormethan (15 mL) gelöst.

Die Lösung wird auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und mit Trifluoressigsäure (1.5 mL) versetzt. Die



Reaktionslösung wird 22 Stunden gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels CombiFlash-System über Umkehrphase (Methode D) gereinigt.

Ausbeute: 187 mg (359 μmol , 39% über 2 Stufen), orangefarbener Feststoff, $R_f = 0.46$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% AcOH), Schmelzbereich: $>150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zersetzung), C₂₀H₂₃F₃N₄O₇S, (520.48), [520.1240].

¹H-NMR, COSY (400 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.51$ (d, $J = 2.5\text{ Hz}$, 1H, *H*-6), 8.13 (dd, $J = 8.9\text{ Hz}$, $J = 2.5\text{ Hz}$, 1H, *H*-4), 8.08–8.05 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-2', *H*-6'), 8.01–7.97 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Spinsystems, *H*-3', *H*-5'), 7.11 (d, $J = 8.9\text{ Hz}$, 1H, *H*-3), 3.19 (t, $J = 6.4\text{ Hz}$, 2H, CH₂), 3.16–3.10 (m, 2H, CH₂), 2.82 (s, 3H, CH₃), 2.76–2.73 (m, 3H, CH₃), 1.96 (quint, $J = 6.4\text{ Hz}$, 2H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (100.6 MHz, CD₃OD): $\delta = 173.0$ (COOH), 166.5 (C_q-2), 156.2 (C_q-1'), 146.4 (C_q-5), 139.5 (C_q-4'), 129.7 (CH-3', CH-5'), 129.7 (CH-4), 129.0 (CH-6), 124.3 (CH-2', CH-6'), 119.5 (CH-3), 114.7 (C_q-1), 48.3 (CH₂), 47.8 (CH₂), 35.5 (CH₃), 33.7 (CH₃), 25.3 (CH₂) ppm.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CD₃OD): $\delta = -73.8$ (s, 3F, CF₃) ppm.

ESI-MS (neg.): 405.1 ([M-H]⁻, ber.: 405.1).

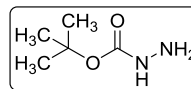
HR-ESI-MS (pos.): 407.1388 ([M+H]⁺, ber.: 407.1384).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3373, 3161, 1595, 1457, 1428, 1383, 1339, 1305, 1160, 1143, 1072, 836\text{ cm}^{-1}$.

5.6.23 N-Boc-geschütztes Hydrazin 148

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Katritzky*.^[444]

Eine 64wt% Lösung von Hydrazin in Wasser (3.12 g, 62.3 mmol, 7.8 äq.) wird in Isopropanol (10 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Zu der Lösung wird in Isopropanol (6 mL) gelöstes Di-*tert*-butyldicarbonat (1.74 g, 7.97 mmol, 1.0 äq.) zugetropft. Die Reaktionslösung wird 3 Tage gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, Dichlormethan (30 mL) zugegeben und die wässrige Phase abgetrennt. Die organische Phase wird mit Wasser (20 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



Ausbeute: 645 mg (4.88 mmol, 61%), farblose Flüssigkeit, $R_f = 0.83$ (EtOAc/MeOH/H₂O 7:2:1 + 0.5 Vol% NEt₃), C₅H₁₂N₂O₂, (132.16), [132.0899].

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.26$ (s, 1H, NH), 3.68 (s, 2H, NH₂), 1.40 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[445]

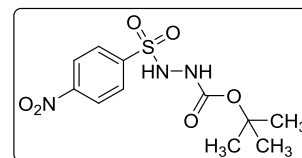
¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = 158.2$ (CO), 80.6 (C(CH₃)₃), 28.4 (C(CH₃)₃) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[444]

5.6.24 N-Boc-geschütztes 4-Nitrobenzolsulfonsäurehydrazid 147

Angelehnt an eine Synthesevorschrift von *Wityak*.^[441]

Das Boc-geschützte Hydrazin **148** (828 mg, 6.27 mmol, 1.0 äq.) wird in Dichlormethan (20 mL) gelöst und mit *N,N*-Diisopropylethylamin (1.64 mL, 9.40 mmol, 1.5 äq.) versetzt. Die Lösung wird auf 0 °C abgekühlt und 4-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid (1.39 g, 6.27 mmol, 1.0 äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 5 Stunden gerührt, während sie langsam Raumtemperatur erreicht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt aus Methanol umkristallisiert. Das Filtrat wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels CombiFlash-System über Umkehrphase (Methode E) gereinigt.



Ausbeute: 294 mg (927 μmol , 15%), farbloser Feststoff, $R_f = 0.82$ (EtOAc, neutrales Aluminiumoxid), Schmelzbereich: 140.1 $^{\circ}\text{C}$ (ab $>141^{\circ}\text{C}$ Zersetzung), $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, (317.32), [317.0682].

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.37\text{--}8.33$ (m, 2H, AA'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-3, H-5), 8.14–8.11 (m, 2H, XX'-Teil eines AA'XX'-Spinsystems, H-2, H-6), 6.82 (s_{br}, 1H, NH), 6.71 (s_{br}, 1H, NH), 1.24 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[446]

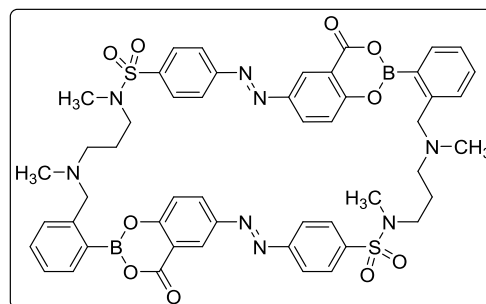
^{13}C -NMR (125.6 MHz, CDCl_3): $\delta = 154.4$ (CO), 150.7 ($\text{C}_q\text{-4}$), 142.8 ($\text{C}_q\text{-1}$), 130.1 (CH-2, CH-6), 124.1 (CH-3, CH-5), 83.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit der Literatur.^[446]

ESI-MS (neg.): 316.1 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, ber.: 316.1).

5.6.25 Dimeres Sulfasalazin-Derivat 154

Das sekundäre Amin **146** (158 mg, 303 μmol , 1.0 äq.) wird in Dimethylformamid (5 mL) gelöst und *N,N*-Diisopropylethylamin (159 μL , 910 μmol , 3.0 äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird 5 Minuten gerührt und 2-Brommethylphenylboronsäurepinakolester



(90 mg, 303 μmol , 1.0 äq.) gelöst in Dimethylformamid (1 mL) zugegeben. Es wird 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels CombiFlash-System über Umkehrphase (Methode F) gereinigt.

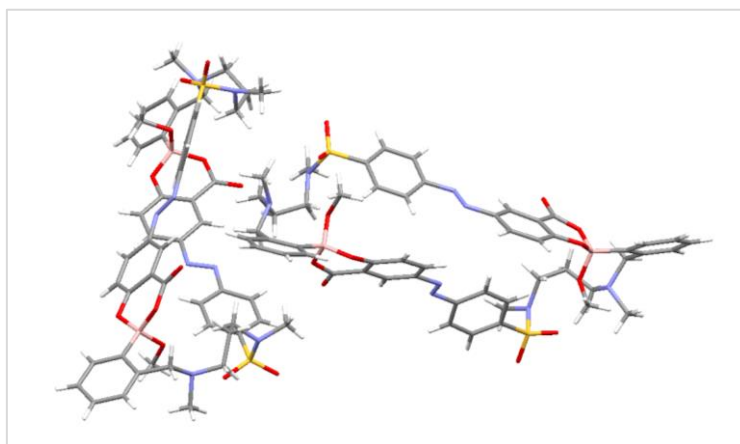
Ausbeute: 98.4 mg (97.5 μmol , 32%), orangefarbener Feststoff, $R_f = 0.28$ (EtOAc + 0.5 Vol% AcOH), $\text{C}_{50}\text{H}_{50}\text{B}_2\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}_2$, (1008.74), [1008.3277].

^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)/ ^{13}C -NMR (125.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).¹⁴

¹⁴ Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren konnten aufgrund sehr breiter Signale nicht ausgewertet werden. Die NMR-spektroskopischen Experimente bei verschiedenen Temperaturen sind unter Abschnitt 7 gezeigt.

ESI-MS (neg.): 1039.2 ($[M+OMe]^-$, ber.: 1039.3).

HR-ESI-MS (pos.): 1009.3402 ($[M+H]^+$, ber.: 1009.3366).



5.7 Biochemische Experimente

5.7.1 Allgemeine Vorschrift für Sättigungsexperimente

Die Farbstoffe **2**, **8**, **96**, **112–114** werden in Ethanol (10 mM) gelöst. Die Stammlösung von HSA wird mit einer Konzentration von 100 μM (66.5 mg HSA/10 mL) in DPBS angesetzt und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Alle Stammlösungen werden bei 20 °C verwendet.

Die 100 μM HSA-Stammlösung wird mit DPBS auf eine Konzentration von 50 μM (oder 25 μM) verdünnt. Dann werden je 35 μL der HSA-Lösung in je ein Well einer farblosen 384-well Mikroplatte ($8 \times 35 \mu\text{L}$) pipettiert.

Die Farbstofflösungen **2**, **8**, **96**, **112–114** werden auf eine Konzentration von 800 μM verdünnt und mit DPBS 1:1 (je 400 μL) in 7 Schritten bis auf eine Konzentration von 6.25 μM gemischt. Anschließend werden je Konzentration 35 μL in ein Well der mit HSA-Lösung vorbereiteten 384-well Mikroplatte pipettiert, gemischt ($6 \times$) und mit einer selbstklebenden Folie der Firma *WhatmanTM GE Healthcare* verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wird ein Aliquot (50 μL) je Well entnommen und in jeweils ein Well einer schwarzen 96-well Mikroplatte pipettiert. Die Fluoreszenzintensitäten werden am Mikroplattenleser *VarioskanTM* bestimmt (für Anregungs- und Emissionswellenlängen siehe Tabelle 33).

Für den Blindwert wird eine 25 μM oder 12.5 μM HSA-Lösung hergestellt und die Fluoreszenzintensität bei den jeweiligen Wellenlängen gemessen.

Jedes Sättigungsexperiment wird mit 8 verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Pro Konzentration werden jeweils 4 Replikate erstellt. Für jedes Experiment wird eine Kontrolle durchgeführt.

5.7.1.1 Vorschrift für Sättigungsexperimente mit 3 μM HSA

Eine 100 μM Stammlösung von HSA (66.5 mg/10 mL) in DPBS wird angesetzt, 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und auf eine Konzentration von 6 μM verdünnt. Die 10 mM Stammlösung des Farbstoffes **8** wird auf 50 μM verdünnt. Anschließend werden 9 weitere Konzentrationen (40 μM , 36 μM , 28 μM , 25 μM , 20 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.13 μM , 1.56 μM) durch Verdünnung mit DPBS hergestellt. Die weitere Vorgehensweise erfolgt analog zu Abschnitt 5.7.1.

5.7.1.2 *Vorschrift für Sättigungsexperimente mit BODIPY-Farbstoffen*

Von den BODIPY-Farbstoffen **99–101** werden Stammlösungen in Ethanol (2.5 mM) bereitgestellt. Die Stammlösung des BODIPY-Farbstoffes **23** wird in Ethanol (10 mM) vorbereitet. Die Stammlösung von HSA wird mit einer Konzentration von 100 μ M (66.5 mg HSA/10 mL) in DPBS angesetzt und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Alle Stammlösungen werden bei 20 °C verwendet.

Die Stammlösung von HSA wird mit DPBS auf eine Konzentration von 25 μ M verdünnt. Dann werden die Stammlösungen der BODIPY-Farbstoffe **23** und **99–101** auf eine Konzentration von 100 μ M verdünnt und mit DPBS 1:1 (je 400 μ L) in 7 Schritten bis auf eine Konzentration von 0.78 μ M gemischt. Die weitere Vorgehensweise erfolgt analog zu Abschnitt 5.7.1.

5.7.2 *Allgemeine Vorschrift für Gleichgewichtsdialysen*

Für die 100 μ M HSA-Lösung wird HSA (66.5 mg) in DPBS (10 mL) gelöst und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Stammlösung von NBD-C₁₂ **8** wird in Ethanol mit einer Konzentration von 10 mM angesetzt.

Die 100 μ M HSA-Stammlösung wird mit DPBS 1:1 (je 1.5 mL) in 11 Schritten auf 50 nM verdünnt. Dann werden je 300 μ L Lösung in je einen Dialysesack pipettiert.

Anschließend wird eine 12.5 μ M Lösung (oder 25 μ M) von NBD-C₁₂ **8** durch die Verdünnung mit DPBS hergestellt und je 500 μ L dieser Lösung in die Dialysekammer pipettiert. Das RED-System wird auf einem Schüttler positioniert (300 rpm, 37 °C). Nach einer Inkubationszeit von 120/180/240/300 Minuten werden jeweils die Lösung in der Dialysekammer und im Dialysesack gemischt (12 $\times$), je ein Aliquot (10 μ L) in je ein Well einer 384-well Mikroplatte pipettiert und die Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{exc}} = 435$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm) am Mikroplattenleser bestimmt. Zur Kontrolle wird NBD-C₁₂ **8** gegen DPBS dialysiert.

Für jede Gleichgewichtsdialyse einer Konzentration werden 4 Replikate durchgeführt.¹⁵

¹⁵ Für die Gleichgewichtsdialyse mit 25 μ M NBD-C₁₂ **8** wurden 3 Replikate durchgeführt.

5.7.2.1 *Vorschrift für Gleichgewichtsdialysen mit radioaktiv markierter Laurin- und Palmitinsäure*

Eine 100 μM HSA-Lösung wird in DPBS (66.5 mg/10 mL) hergestellt und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Stammlösungen der nicht radioaktiv markierten Fettsäuren (**28** und **29**) werden in Ethanol (10 mM) angesetzt.

Die 100 μM HSA-Stammlösung wird auf 12.5 μM verdünnt und dann mit DPBS 1:1 (je 2 mL) in 8 Schritten bis auf eine Konzentration von 50 nM gemischt. Es werden 300 μL je Konzentration in je einen Dialysesack pipettiert.

Dann wird eine 12.5 μM Lösung der nicht radioaktiv markierten Fettsäuren ($^{\text{T}}$ **28** und $^{\text{T}}$ **29**) durch Verdünnung mit DPBS hergestellt, [^3H]-Fettsäure zugegeben (Aktivität: 830 Bq/10 μL ($^{\text{T}}$ **28**) oder 933 Bq/10 μL ($^{\text{T}}$ **29**)) und je 500 μL dieser Lösung in die Dialysekammer pipettiert. Das RED-System wird auf einem Schüttler positioniert (300 rpm, 37 °C). Nach einer Inkubationszeit von 60/180/300 Minuten werden jeweils die Lösung in der Dialysekammer und im Dialysesack gemischt (je 6 $\times$), je ein Aliquot (10 μL) entnommen, in ein Polyethylenvial pipettiert und mit Rotiszint[®] eco plus (15 mL) versetzt. Die Aktivität wird am Szintillator bestimmt. Zur Kontrolle wird die [^3H]-Fettsäure ($^{\text{T}}$ **28** und $^{\text{T}}$ **29**) gegen DPBS dialysiert.

Für jede Gleichgewichtsdialyse einer Konzentration werden jeweils 3 Replikate durchgeführt.

5.7.2.2 *Vorschrift für Gleichgewichtsdialysen mit radioaktiv markierter Myristinsäure*

Es wird eine 100 μM HSA-Lösung in DPBS (66.5 mg/10 mL) hergestellt und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Stammlösung von Myristinsäure (**3**) wird in Ethanol (10 mM) vorbereitet. Dann wird eine 12.5 μM (oder 25 μM) Lösung der nicht radioaktiv markierten Myristinsäure (**3**) durch Verdünnung mit DPBS hergestellt.

Die HSA-Stammlösung (100 μM) wird mit DPBS auf eine Konzentration von 50 μM (25 μM) verdünnt. Anschließend wird diese Lösung durch die Zugabe von DPBS (1:1) in 10 (oder 9) Schritten auf eine Konzentration von 50 nM verdünnt. Es werden 300 μL je Konzentration in je einen Dialysesack pipettiert.

Anschließend wird [^3H]-Myristinsäure ($^{\text{T}}$ **3**) zugegeben (Aktivität: 645 Bq/10 μL bzw. 618 Bq/10 μL (bei 12.5 μM Fettsäure) oder 644 Bq/10 μL bzw. 120 Bq/10 μL (bei 25 μM Fettsäure)). Die weitere Vorgehensweise erfolgt analog zu Abschnitt 5.7.2.1.

5.7.3 Allgemeine Vorschrift zur Erstellung einer Eichgeraden

Die Stammlösungen der Farbstoffe **2, 8, 112–114** werden in Ethanol (10 mM) präpariert. Die Stammlösung der BODIPY-Farbstoffe **99–101** wird in Ethanol (2.5 mM) vorbereitet. Es werden je 35 μL DPBS in je ein Well einer farblosen 384-well Mikroplatte (8 $\times$) pipettiert.

Von den Farbstoffen **2, 8, 99–101, 112–114** wird eine 800 μM Lösung hergestellt und mit DPBS 1:1 (je 400 μL) in 10 Schritten auf eine Konzentration von 0.78 μM verdünnt. Dann werden je Konzentration 35 μL in ein Well der mit DPBS vorbereiteten 384-well Mikroplatte pipettiert und gemischt (6 $\times$). Es wird ein Aliquot (50 μL) je Well entnommen, in jeweils ein Well einer schwarzen 96-well Mikroplatte pipettiert und am Mikroplattenleser VarioskanTM die Fluoreszenzintensität gemessen (für Anregungs- und Emissionswellenlängen siehe Tabelle 33).

Für den Blindwert wird die Fluoreszenzintensität von DPBS bei gleicher Anregungs- und Emissionswellenlänge bestimmt.

Das Experiment wird mit 11 verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Pro Konzentration werden jeweils 4 Replikate erstellt. Für das Experiment wird eine Kontrolle durchgeführt.

5.7.4 Allgemeine Vorschrift für den Job-Plot

Die Stammlösungen der Farbstoffe **2, 8, 23, 96, 112–114** werden in Ethanol (10 mM) hergestellt. Die Stammlösungen der BODIPY-Farbstoffe **99–101** werden in Ethanol (2.5 mM) bereitgestellt. Die HSA-Stammlösung wird mit einer Konzentration von 100 μM (66.5 mg/10 mL) in DPBS vorbereitet und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Alle Stammlösungen werden bei 20 °C verwendet.

Der Job-Plot wird angelehnt an Job^[324] und Huang^[325] durchgeführt.

Zunächst werden die Farbstofflösungen **2, 8, 23, 96, 99–101, 112–114** sowie die HSA-Lösung in der benötigten Konzentration (12.5 μM , 25 μM oder 50 μM) ausgehend von den vorbereiteten Stammlösungen hergestellt. Unter Variation der Volumina bzw. Stoffmengenanteile χ werden die beiden Lösungen miteinander versetzt, gemischt (6 $\times$) und mit einer selbstklebenden Folie der Firma WhatmanTM GE Healthcare verschlossen. Das Pipettierschema ist beispielhaft für ein Job-Plot mit einem Gesamtvolumen von 70 μL gezeigt (Tabelle 37).

Tabelle 37: Allgemeines Pipettierschema für ein Job-Plot.

Well	Stoffmengenanteil χ (HSA)	Stoffmengenanteil χ (Farbstoff)	HSA-Lösung in μL	Farbstofflösung in μL
1	0.0	1.0	0	70
2	0.1	0.9	7	63
3	0.2	0.8	14	56
4	0.3	0.7	21	49
5	0.4	0.6	28	42
6	0.5	0.5	35	35
7	0.6	0.4	42	28
8	0.7	0.3	49	21
9	0.8	0.2	56	14
10	0.9	0.1	63	7
11	1.0	0.0	70	0

Nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten bei Raumtemperatur wird ein Aliquot (50 μL) je Well in je ein Well einer schwarzen 96-Well Mikroplatte pipettiert und die Fluoreszenzintensität am Mikroplattenleser VarioskanTM bestimmt (für Anregungs- und Emissionswellenlängen siehe Tabelle 33).

Für ein Job-Plot werden je Stoffmengenanteil 3 Replikate durchgeführt.¹⁶

5.7.5 Allgemeine Vorschrift für die Konkurrenzexperimente

Die Stammlösungen der Farbstoffe **2**, **8**, **23**, **112–114** werden in Ethanol (10 mM) hergestellt. Für eine 100 μM HSA-Stammlösung wird HSA (66.5 mg) in DPBS (10 mL) gelöst und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Stammlösungen von Ibuprofen (**4**), Ketoprofen (**7**), Naproxen (**95**), Indometacin, Meloxicam, Iophenoxinsäure (**5**), Warfarin (**2**), Myristinsäure (**3**), Cholesterin, Myristinsäuremethylester (**9**), Diclofenac, Paracetamol, Celecoxib, Bumetanid und Salicylsäure (**32**), der Fettsäuren (**25–30**) sowie der Sulfasalazin-Derivate (**33**, **34**, **47**, **80**, **81** und **89**) werden in Ethanol (10 mM) präpariert. Die Stammlösungen der Sulfasalazin-Derivate **35** und **76–79** werden in Ethanol (5 mM) hergestellt. Die Stammlösungen von Sulfasalazin (**6**), Balsalazid (**22**) und den Sulfasalazin-Derivaten (**36**, **40**, **41**, **71**, **73–75** und **82–86**) werden in DPBS (800 μM , max. 5 Vol% DMSO) bereitgestellt. Alle vorbereiteten Stammlösungen werden bei 20 °C verwendet.

¹⁶ Mit NBD- C_{12} **NBCD** wurden 2 (Job-Plot 12.5 μM) und 4 Replikate (Job-Plot 25 μM) durchgeführt.

Zur Herstellung der 50 μM Farbstoff/HSA-(1:1)-Komplexlösung wird das jeweilige Volumen an 100 μM HSA-Lösung und 10 mM Farbstofflösung zusammenpipettiert, mit dem fehlenden Volumen an DPBS versetzt und vorsichtig gemischt ($6 \times$). Die Komplexlösung wird 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend werden je 35 μL der Farbstoff/HSA-Komplexlösung entnommen und in je ein Well einer farblosen 384-well Mikroplatte ($8 \times 35 \mu\text{L}$) pipettiert.

Eine 800 μM Lösung der Testsubstanz wird ausgehend von der Stammlösung hergestellt. Diese Lösung wird mit DPBS 1:1 (je 400 μL) in 7 Schritten bis auf eine Konzentration von 6.25 μM verdünnt. Dann werden je Konzentration 35 μL in ein mit der Komplexlösung vorbereitetes Well einer 384-Well Mikroplatte pipettiert, gemischt ($6 \times$) und mit einer selbstklebenden Folie der Firma *WhatmanTM GE Healthcare* verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wird von der Testsubstanz/Farbstoff/HSA-Lösung ein Aliquot (50 μL) je Well entnommen, in je ein Well einer schwarzen 96-Well Mikroplatte pipettiert und die Fluoreszenzintensität am Mikroplattenleser VarioskanTM analysiert (für Anregungs- und Emissionswellenlängen siehe Tabelle 33). Für den Blindwert wird eine 25 μM Farbstoff/HSA-Komplexlösung durch die Verdünnung mit DPBS hergestellt und die Fluoreszenzintensität gemessen.

Es werden je Konzentration 4 Replikate erstellt. Für jedes Konkurrenzexperiment wird eine Kontrolle durchgeführt. Als Testsubstanzen für die Kontrollexperimente werden Myristinsäure (**3**) für NBD- C_{12} **8**, Ibuprofen (**4**) für die BODIPY-Derivate **23**, **99–101** und Iophenoxinsäure (**5**) für die Warfarin-Derivate **112–114** verwendet.

5.7.5.1 *Vorschrift für ein Konkurrenzexperiment mit einem BODIPY-Farbstoff*

Von den BODIPY-Farbstoffen **99–101** werden 2.5 mM ethanolische Stammlösungen angesetzt. Die 100 μM HSA-Stammlösung wird in DPBS (66.5 mg HSA/10 mL) vorbereitet und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird für die Herstellung der 25 μM BODIPY-Farbstoff/HSA-(1:1)-Komplexlösung das jeweilige Volumen an 100 μM HSA-Lösung und 2.5 mM BODIPY-Farbstofflösung zusammenpipettiert, mit dem fehlenden Volumen an DPBS versetzt, vorsichtig gemischt ($6 \times$) und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die weitere Vorgehensweise ist analog zur allgemeinen Vorschrift für Konkurrenzexperimente (siehe Abschnitt 5.7.5).

5.7.6 Allgemeine Vorschrift zur Aufnahme von Absorptionsspektren

Die Stammlösungen der Farbstoffe **2, 8, 23, 96** und **112–114** werden in Ethanol (10 mM) vorbereitet. Die Stammlösungen der BODIPY-Farbstoffe **99–101** werden als 2.5 mM ethanolische Lösung angesetzt.

5.7.6.1 *Vorschrift zur Aufnahme eines Absorptionsspektrums am Mikroplattenleser*

Für eine 40 μM Farbstofflösung (100 μL) wird das entsprechende Volumen aus der vorbereiteten Stammlösung entnommen, mit DPBS auf das Endvolumen aufgefüllt und gemischt (6 $\times$). Dann werden 50 μL der 40 μM Farbstofflösung in eine schwarze 96-Well Mikroplatte pipettiert und ein Absorptionsspektrum am Mikroplattenleser VarioskanTM aufgenommen (Scanbereich: 200–700 nm).

5.7.6.2 *Vorschrift zur Aufnahme eines Absorptionsspektrums am UV/VIS-Spektralphotometer*

Zur Herstellung einer 40 μM Farbstofflösung (2 mL) wird das benötigte Volumen aus der vorbereiteten Stammlösung entnommen, mit Ethanol oder DPBS auf das Endvolumen aufgefüllt und gemischt (6 $\times$). Die 40 μM Farbstofflösung wird in eine Küvette überführt und an einem UV/VIS-Spektrometer vermessen (Scanbereich: 200–700 nm).

5.7.7 Allgemeine Vorschrift zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Die Stammlösungen der Farbstoffe **2, 8, 23, 96** und **112–114** werden in Ethanol (10 mM) hergestellt. Die Stammlösungen der BODIPY-Farbstoffe **99–101** werden als 2.5 mM ethanolische Lösungen bereitgestellt.

5.7.7.1 *Vorschrift zur Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums am Fluorometer*

Für die Herstellung einer 40 μM Farbstofflösung (2 mL) wird das entsprechende Volumen aus der präparierten Stammlösung entnommen, mit Ethanol oder DPBS auf das Endvolumen aufgefüllt und gemischt (6 $\times$). Dann wird die 40 μM Farbstofflösung in eine Fluoreszenz-Küvette pipettiert und ein Fluoreszenzspektrum am Fluorometer aufgenommen (für Anregungswellenlängen siehe Tabelle 33).

5.7.7.2 *Vorschrift zur Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums am Mikroplattenleser*

HSA wird mit einer Konzentration von 100 μM (66.5 mg/10 mL) in DPBS gelöst und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird die 100 μM HSA-Lösung (80 μL) mit DPBS (20 μL) verdünnt.

Für 100 μL einer 80 μM Farbstofflösung wird das entsprechende Volumen aus der vorbereiteten Stammlösung entnommen, mit DPBS auf das Endvolumen aufgefüllt und gemischt (6 $\times$). Dann wird die 80 μM Farbstofflösung (50 μL) mit 80 μM HSA-Stammlösung (50 μL) versetzt und gemischt (6 $\times$). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur werden 50 μL dieser Farbstoff/HSA-Komplexlösung (je 40 μM) in eine schwarze 96-Well Mikroplatte pipettiert und am Mikroplattenleser VarioskanTM vermessen (für Anregungswellenlängen siehe Tabelle 33).

Zur Aufnahme des Fluoreszenzspektrums ohne HSA wird die 80 μM Farbstofflösung mit DPBS im Verhältnis 1:1 (je 50 μL) verdünnt. Anschließend werden 50 μL der 40 μM Farbstofflösung in eine schwarze 96-Well Mikroplatte pipettiert und das Fluoreszenzspektrum am Mikroplattenleser VarioskanTM aufgenommen.

5.7.8 *Allgemeine Vorschrift für die FRET-Experimente*

Die Stammlösung von Warfarin (**2**) und NBD- C_{12} **8** werden in Ethanol (10 mM) vorbereitet. Für die 100 μM HSA-Stammlösung wird HSA (66.5 mg) in DPBS (10 mL) gelöst und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die HSA-Stammlösung (100 μM) wird mit DPBS auf eine Konzentration von 50 μM verdünnt. Dann werden je 35 μL der HSA-Lösung in je ein Well einer farblosen 384-Well Mikroplatte (8 $\times$) pipettiert.

Es wird eine 800 μM Farbstofflösung hergestellt und mit DPBS 1:1 (je 400 μL) in 7 Schritten bis auf eine Konzentration von 6.25 μM verdünnt. Anschließend werden 35 μL je Konzentration in ein Well der mit HSA-Lösung vorbereiteten 384-Well Mikroplatte pipettiert, gemischt (6 $\times$) und mit einer selbstklebenden Folie der Firma *WhatmanTM GE Healthcare* verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wird ein Aliquot (50 μL) je Well in jeweils ein Well einer schwarzen 96-Well Mikroplatte pipettiert. Es wird je Konzentration ein Fluoreszenzspektrum am Mikroplattenleser VarioskanTM aufgenommen ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$). Für den Blindwert wird das Fluoreszenzspektrum einer 25 μM HSA-Lösung aufgenommen.

5.7.8.1 Vorschrift für ein FRET-Experiment mit einer Ligand/HSA-Komplexlösung

Die Stammlösungen von NBD-C₁₂ **8** und Iophenoxinsäure (**5**) werden in Ethanol (10 mM) hergestellt. Eine 100 µM HSA-Lösung in DPBS (66.5 mg HSA/10 mL) wird angesetzt und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Es wird eine 50 µM Iophenoxinsäure/HSA-(1:1)-Komplexlösung (1 mL) präpariert, 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und je 35 µL dieser Komplexlösung in je ein Well einer farblosen 384-Well Mikroplatte (8 ×) pipettiert. Dann wird eine 800 µM Lösung von NBD-C₁₂ **8** hergestellt (736 µL DPBS/64 µL 10 mM Stammlösung) und mit DPBS 1:1 (je 400 µL) in 7 Schritten bis auf eine Konzentration von 6.25 µM gemischt. Es werden je Konzentration 35 µL in ein Well der mit Iophenoxinsäure/HSA-(1:1)-Komplexlösung vorbereiteten 384-Well Mikroplatte pipettiert, gemischt (6 ×) und mit einer selbstklebenden Folie der Firma *Whatman*TM *GE Healthcare* verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wird ein Aliquot (50 µL) je Well in jeweils ein Well einer schwarzen 96-Well Mikroplatte pipettiert und ein Fluoreszenzspektrum je Konzentration am Mikroplattenleser VarioskanTM aufgenommen ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$). Für den Blindwert wird die 50 µM Iophenoxinsäure-(**5**)-/HSA-(1:1)-Komplexlösung mit DPBS 1:1 verdünnt und ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen.

5.7.9 Vorschrift zur Cokristallisation nach dem Hanging-Drop-Verfahren

Die Stammlösung von NBD-C₁₂ **8** wird in Ethanol (500 mM) vorbereitet.

Essentiell fettfreies humanes Serum-Albumin (98 mg) wird in 2.2 mL Pufferlösung (50 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.5) gelöst, mittels GPC gereinigt und mit einem Vivaspin Concentrator (Volumen 6 mL, MWCO 30000) der Firma *Vivascience* unter Verwendung einer Zentrifuge (3000 rpm) auf eine Konzentration von 2.14 mM (142 mg/mL) konzentriert. Die HSA-Lösung wird mit NBD-C₁₂ **8** im NBD-C₁₂-**8**/HSA-Verhältnis 6:1 (totale NBD-C₁₂-**8**-Konzentration: 12 mM) versetzt und 4 Stunden bei 4–5 °C inkubiert.

Zur Herstellung der Präzipitanslösungen werden 2 unterschiedliche Phosphatpuffer (pH 7.0 oder pH 7.5), verschieden konzentrierte, wässrige PEG-3350-Lösungen (21.5–38.0 wt%), Glycerol (5wt%) und MilliQ-Wasser in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt (Tabelle 38).

Je 500 µL Präzipitanslösung werden in je ein Well einer 24-Well Kristallisationsplatte VDX Plate with sealant HR3-170 von der Firma *Hampton Research* vorgelegt.

Anschließend wird je 1 μL der inkubierten NBD-C₁₂-8/HSA-Lösung auf je eine silikonisierte Glasplatte (HR3-231, Durchmesser 22 mm) pipettiert und mit Präzipitanslösung (1 μL) überschichtet.

Für die Kristallkeimlösung wird 1 μL einer konzentrierten Lösung mit kleinen Kristallen einer beliebigen Protein/Ligand-Zusammensetzung mit 1 μL Präzipitanslösung verdünnt und mit einem Seed Bead aus PTFE von der Firma *Hampton Research* zerkleinert. Es wird ein Schnurbarthaar einer Katze in die Kristallkeimlösung getaucht und durch den Tropfen hindurch gestreift. Anschließend wird jeweils ein Well der 24-Well Kristallisationsplatte mit je einer silikonisierten Glasplatte, auf der sich der Tropfen befindet, kopfüber verschlossen. Die Kristallisationsplatte wird an einem vibrationsfreien, klimatisierten Ort bei 20 °C gelagert.

Nach 7 Tagen werden in Well B6 (Reservoirlösung: Phosphatpuffer mit pH 7.0, 0.3% Glycerol, ~30% PEG-3350) leicht orangefarbene Kristalle in Form von gestapelten Plättchen (stacked plates) erhalten. Der zu untersuchende Kristall wird mit einer Nylonschleife aus dem Kristallisationstropfen gefischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und röntgenkristallographisch untersucht.

Tabelle 38: Pipettierschema zur Herstellung der Präzipitanslösungen.

Well	50 mM Phosphat-puffer in μL	PEG-3350 in μL (wt%)	5wt% Glycerol in μL	MilliQ-Wasser in μL
A1	50 (pH 7.0)	430 (21.5)	62.5	457.5
A2	50 (pH 7.0)	460 (23.0)	62.5	427.5
A3	50 (pH 7.0)	490 (24.5)	62.5	397.5
A4	50 (pH 7.0)	520 (26.0)	62.5	367.5
A5	50 (pH 7.0)	550 (27.5)	62.5	337.5
A6	50 (pH 7.0)	580 (29.0)	62.5	307.5
B1	50 (pH 7.0)	610 (30.5)	62.5	277.5
B2	50 (pH 7.0)	640 (32.0)	62.5	247.5
B3	50 (pH 7.0)	670 (33.5)	62.5	217.5
B4	50 (pH 7.0)	700 (35.0)	62.5	187.5
B5	50 (pH 7.0)	730 (36.5)	62.5	157.5
B6	50 (pH 7.0)	760 (38.0)	62.5	127.5
C1	50 (pH 7.5)	430 (21.5)	-	520
C2	50 (pH 7.5)	460 (23.0)	-	490
C3	50 (pH 7.5)	490 (24.5)	-	460
C4	50 (pH 7.5)	520 (26.0)	-	430
C5	50 (pH 7.5)	550 (27.5)	-	400

C6	50 (pH 7.5)	580 (29.0)	-	370
D1	50 (pH 7.5)	610 (30.5)	-	340
D2	50 (pH 7.5)	640 (32.0)	-	310
D3	50 (pH 7.5)	670 (33.5)	-	280
D4	50 (pH 7.5)	700 (35.0)	-	250
D5	50 (pH 7.5)	730 (36.5)	-	220
D6	50 (pH 7.5)	760 (38.0)	-	190

Die Röntgenstrukturdaten werden mit XDS^[447] prozessiert und mit autoproc^[448] unter Verwendung von Aimless^[449] und STARANISO^[450] skaliert. Die anisotropische Skalierung wird aufgrund der anisotropen Streuung verwendet. Die Bestimmung der Struktur erfolgt durch molekulares Replacement mit Hilfe der Software Phaser^[451]. Als Ausgangsmodell wurde eine Sanofi-interne Kristallstruktur von HSA mit Myristinsäure (**3**) verwendet. Da die Elektronendichte des zentralen Teils von HSA gut, die des N- und C-Terminus schlecht ist, wird mit dem N-terminalen Fragment 3–192 und dem C-terminalen Fragment 489–584 jeweils das molekulare Replacement wiederholt. Das Modell wird mit Coot^[452] manuell verbessert und mit Buster^[453] verfeinert. Die Aminosäuren 500–513 konnten aufgrund sehr schwacher Elektronendichte nicht gemodelt werden. Die finale Struktur besteht daher aus den Aminosäuren 3–78, 83–499 und 514–583. Es befindet sich ein HSA-Molekül in der asymmetrischen Einheit.

5.7.10 Vorschrift für bichromatische Konkurrenzexperimente

Die Stammlösungen der Farbstoffe **8** und **112** werden in Ethanol (10 mM) bereitgestellt. Die Stammlösung des Dimethylamino-BODIPYs **100** wird in Ethanol (2.5 mM) hergestellt. Für eine 200 μ M HSA-Stammlösung wird HSA (133 mg) in DPBS (10 mL) gelöst und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Zur Herstellung der 2-Farbstoff/HSA-Komplexlösung wird zunächst eine 150 μ M HSA-Lösung vorbereitet. Von den beiden Farbstoffen wird ausgehend von der Stammlösung jeweils eine 48 μ M Lösung bereitgestellt. Anschließend werden die 150 μ M HSA-Lösung und die beiden 48 μ M Farbstofflösungen miteinander gemischt, 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und je 35 μ L der 2-Farbstoff/HSA-Komplexlösung in je ein Well einer farblosen 384-Well Mikroplatte (8 $\times$) pipettiert.

Die Stammlösungen von Myristinsäure (**3**), Warfarin (**2**), Iophenoxinsäure (**5**), Ibuprofen (**4**), Ketoprofen (**7**), Naproxen (**95**) und Cholesterin werden in Ethanol (10 mM)

bereitgestellt. Die Stammlösung von Sulfasalazin (**6**) wird in DPBS (800 μM , max. 5 Vol% DMSO) vorbereitet. Es wird eine 800 μM Testsubstanz-Lösung ausgehend von der Stammlösung durch Verdünnung mit DPBS hergestellt. Diese Lösung wird mit DPBS 1:1 (je 400 μL) in 7 Schritten bis auf eine Konzentration von 6.25 μM verdünnt. Anschließend werden 35 μL je Konzentration in je ein mit 2-Farbstoff/HSA-Komplexlösung vorbereitetes Well einer 384-Well Mikroplatte pipettiert, gemischt (6 $\times$) und mit einer selbstklebenden Folie der Firma *WhatmanTM GE Healthcare* verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wird ein Aliquot (50 μL) je Well in jeweils ein Well einer schwarzen 96-Well Mikroplatte pipettiert und die Fluoreszenzintensität am Mikroplattenleser VarioskanTM bestimmt (für Anregungs- und Emissionswellenlängen siehe Tabelle 33). Die Endkonzentration von HSA liegt bei 25 μM , die der Farbstoffe jeweils bei 8 μM . Für den Blindwert wird die vorbereitete 2-Farbstoff/HSA-Komplexlösung mit DPBS (1:1) gemischt und die Fluoreszenzintensität gemessen.

Es werden je Konzentration 4 Replikate erstellt. Für jedes Wettbewerbsexperiment wird eine Kontrolle durchgeführt. Als Testsubstanzen für die Kontrollexperimente werden Myristinsäure (**3**) für NBD- C_{12} **8**, Ibuprofen (**4**) für das Dimethylamino-BODIPY **100** und Iophenoxinsäure (**5**) für das 4-Hydroxywarfarin **112** verwendet.

5.7.11 Vorschrift für trichromatische Wettbewerbsexperimente

Die Stammlösungen der Farbstoffe **2**, **23**, **8** und **112** werden in Ethanol (10 mM) bereitgestellt. Die Stammlösung des BODIPY-Farbstoffes **100** wird in Ethanol (2.5 mM) vorbereitet. Zur Herstellung der 200 μM HSA-Stammlösung wird HSA (133 mg) in DPBS (10 mL) gelöst und 10–15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Für die 3-Farbstoff/HSA-Komplexlösung wird von den drei Farbstoffen jeweils eine 64 μM Lösung angesetzt. Anschließend werden die 200 μM HSA-Stammlösung und die drei Farbstofflösungen (64 μM) zu gleichen Teilen miteinander versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach werden je 35 μL der 3-Farbstoff/HSA-Komplexlösung in jeweils ein Well einer farblosen 384-Well Mikroplatte (8 $\times$) pipettiert. Die Stammlösungen von Myristinsäure (**3**), Warfarin (**2**), Iophenoxinsäure (**5**), Myristinsäuremethylester (**9**), Ibuprofen (**4**), Ketoprofen (**7**), Naproxen (**95**), Paracetamol, Meloxicam, Celecoxib, Indometacin, Diclofenac, Bumetanid und Cholesterin werden in

Ethanol (10 mM) bereitgestellt. Die Stammlösungen von Sulfasalazin (**6**) und Balsalazid (**22**) werden in DPBS (800 μ M, max. 5 Vol% DMSO) bereitgestellt.

Es wird eine 400 μ M Lösung der Testsubstanz ausgehend von der Stammlösung durch Verdünnung mit DPBS hergestellt. Diese Lösung wird mit DPBS 1:1 (je 400 μ L) in 7 Schritten bis auf eine Konzentration von 3.13 μ M verdünnt. Es werden 35 μ L je Konzentration in das mit 3-Farbstoff/HSA-Komplexlösung vorbereitete Well einer 384-Well Mikroplatte pipettiert, gemischt (6 $\times$) und mit einer selbstklebenden Folie der Firma *Whatman*TM *GE Healthcare* verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wird ein Aliquot (50 μ L) je Well in jeweils ein Well einer schwarzen 96-Well Mikroplatte pipettiert und die Fluoreszenzintensität am Mikroplattenleser VarioskanTM bestimmt (für Anregungs- und Emissionswellenlängen siehe Tabelle 33). Die Endkonzentration von HSA liegt bei 25 μ M, die der drei Farbstoffe liegt jeweils bei 8 μ M. Zur Messung des Blindwertes wird die vorbereitete 3-Farbstoff/HSA-Komplexlösung mit DPBS (1:1) verdünnt und die Fluoreszenzintensität bestimmt.

Es werden je Konzentration 4 Replikate erstellt. Für jedes Konkurrenzexperiment wird eine Kontrolle durchgeführt. Als Testsubstanzen für die Kontrollexperimente werden Myristinsäure (**3**) für NBD- C_{12} **8**, Ibuprofen (**4**) für das Dimethylamino-BODIPY **100** und Iophenoxinsäure (**5**) für das 4-Hydroxywarfarin **112** verwendet.

5.7.12 Vorschrift für Titrationsexperimente an glykierter HSA

Die Stammlösungen von Warfarin (**2**) und NBD- C_{12} **8** werden in Ethanol (10 mM) vorbereitet. Die Stammlösung des Dimethylamino-BODIPYs **100** wird als 2.5 mM ethanolische Lösung bereitgestellt.

Es wird eine 166 mM D-Glucoselösung in DPBS angesetzt. HSA wird in dieser Glucoselösung gelöst (200 μ M) und 1 Tag, 1 Woche bzw. 1 Monat bei 37 °C in einem temperierten Schüttler (300 rpm) inkubiert, mit einem Vivaspin Concentrator (Volumen 6 mL, MWCO 30000) unter Verwendung einer Zentrifuge (3000 rpm) konzentriert, mit DPBS gewaschen (3 $\times$) und auf eine Konzentration von 245 μ M (163 mg HSA/10 mL) konzentriert. Alle vorbereiteten Lösungen werden bei 20 °C verwendet.

Die 245 μ M HSA-Lösung wird mit DPBS auf eine Konzentration von 50 μ M (oder 25 μ M) verdünnt. Dann werden je 35 μ L der HSA-Lösung in je ein Well einer farblosen 384-Well Mikroplatte (8 $\times$) pipettiert.

Die Farbstofflösungen **2**, **8** und **100** werden mit DPBS auf eine Konzentration von 800 μM verdünnt und mit DPBS 1:1 (je 400 μL) in 7 Schritten bis auf eine Konzentration von 6.25 μM gemischt. Anschließend werden 35 μL je Konzentration in ein Well der mit HSA-Lösung vorbereiteten 384-Well Mikroplatte überführt, gemischt (6 $\times$), mit einer selbstklebenden Folie der Firma *WhatmanTM GE Healthcare* verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wird ein Aliquot (50 μL) je Well in jeweils ein Well einer schwarzen 96-Well Mikroplatte pipettiert und die Fluoreszenzintensität am Mikroplattenleser VarioskanTM bestimmt (für Anregungs- und Emissionswellenlängen siehe Tabelle 33). Für den Blindwert wird eine 25 μM (bzw. 12.5 μM) Lösung an glykierter HSA hergestellt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Jedes Sättigungsexperiment wird mit 8 verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Pro Konzentration werden jeweils 4 Replikate erstellt. Für jedes Experiment wird eine Kontrolle durchgeführt.

5.7.13 Vorschrift zur Ringöffnung der dimeren Verbindung

Es werden Stammlösungen von D-Glucose, L-Milchsäure, D-Fructose und Glycerol in Wasser (10 mM) vorbereitet. Zusätzlich werden eine 5 mM und eine 1 mM Lösung von jeder Stammlösung durch Verdünnung mit Wasser hergestellt.

Eine wässrige Lösung mit pH 3 wird durch die Zugabe von konzentrierter Salzsäure präpariert. Die basische Lösung (pH 10–11) wird mit Hilfe von 2 M Natriumhydroxid-Lösung angesetzt.

Es wird je 1 mg Dimer **154** mit je einer der vorbereiteten Lösungen (1 mL) versetzt und bei 20 °C auf einem temperierten Schüttler gerührt (300 rpm). Nach verschiedenen Zeitpunkten (1 Tag, 7 Tage, 14 Tage) wird ein Aliquot (50 μL) entnommen, mit Acetonitril (0.5 mL) verdünnt, filtriert und mittels LC/MS analysiert.

5.7.14 Vorschrift zur Bestimmung des freien Thiol-Gehalts von HSA

Angelehnt an eine Methode von Kowol.^[454]

Eine 100 μM HSA-Lösung in DPBS (66.5 mg/10 mL) wird hergestellt. Die Stammlösung von 2,2'-Dithiopyridin (0.97 mg) wird in DPBS/5 Vol% DMSO (800 μM , 5228 μL DPBS + 275 μL DMSO) präpariert. Die 800 μM Stammlösung von 2,2'-Dithiopyridin wird mit DPBS 1:1 in 5 Schritten auf 12.5 μM verdünnt. Anschließend wird 1 mL je Konzentration

mit je 1 mL der HSA-Lösung versetzt, gemischt ($8 \times$) und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wird in eine Küvette überführt. Es wird für jede Konzentration das Absorptionsspektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$) aufgenommen. Für den Blindwert wird das Absorptionsspektrum einer $50 \mu\text{M}$ HSA-Lösung gemessen.

Das Experiment wird mit 6 Konzentrationen durchgeführt. Für das Experiment wird eine Kontrolle durchgeführt.

6. Literaturverzeichnis

- [1] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Mol. Aspects Med.* **2012**, 33, 209-290.
- [2] J. Nicholson, M. Wolmarans, G. Park, *Brit. J. Anaesth.* **2000**, 85, 599-610.
- [3] G. J. Quinlan, G. S. Martin, T. W. Evans, *Hepatology* **2005**, 41, 1211-1219.
- [4] S. Curry, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2009**, 24, 342-357.
- [5] J. J. Vallner, *J. Pharm. Sci.* **1977**, 66, 447-465.
- [6] W. E. Müller, U. Wollert, *Pharmacology* **1979**, 19, 59-67.
- [7] U. Kragh-Hansen, *Dan. Med. Bull.* **1990**, 37, 57-84.
- [8] K. Oettl, R. E. Stauber, *Brit. J. Pharmacol.* **2007**, 151, 580-590.
- [9] U. Kragh-Hansen, V. T. G. Chuang, M. Otagiri, *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 695-704.
- [10] J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, *J. Mol. Biol.* **2005**, 353, 38-52.
- [11] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, *IUBMB Life* **2005**, 57, 787-796.
- [12] C. Bertucci, E. Domenici, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1463-1481.
- [13] J. R. Simard, P. A. Zunszain, J. A. Hamilton, S. Curry, *J. Mol. Biol.* **2006**, 361, 336-351.
- [14] D. C. Carter, J. X. Ho, in *Advances in protein chemistry*, Vol. 45, Elsevier, **1994**, S. 153-203.
- [15] T. Peters Jr., in *Advances in protein chemistry*, Vol. 37, Elsevier, **1985**, S. 161-245.
- [16] F. Kratz, *J. Controlled Release* **2008**, 132, 171-183.
- [17] S. Curry, P. Brick, N. P. Franks, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1441, 131-140.
- [18] D. A. Smith, L. Di, E. H. Kerns, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 929.
- [19] S. Schmidt, D. Gonzalez, H. Derendorf, *J. Pharm. Sci.* **2010**, 99, 1107-1122.
- [20] U. Kragh-Hansen, *Pharmacol. Rev.* **1981**, 33, 17-53.
- [21] H. Ansell, *The Lancet* **1839**, 32, 363-368.
- [22] K. Sterling, *J. Clin. Invest.* **1951**, 30, 1228.
- [23] T. Peters Jr., *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*, Academic press, New York, **1995**, S. 24-103.
- [24] M. A. Rothschild, M. Oratz, S. S. Schreiber, *N. Engl. J. Med.* **1972**, 286, 816-821.
- [25] Y. Ingenbleek, H.-G. Van Den Schrieck, P. De Nayer, M. De Visscher, *Clin. Chim. Acta* **1975**, 63, 61-67.
- [26] F. W. Ahnefeld, H. Bergmann, C. Burri, W. Dick, M. Halmágyi, G. Hossli, E. Rügheimer, *Therapie mit Blutkomponenten*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, **1980**.
- [27] N. A. Kratochwil, W. Huber, F. Müller, M. Kansy, P. R. Gerber, *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 64, 1355-1374.
- [28] J. E. Schnitzer, P. Oh, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 6072-6082.
- [29] C. Tiruppathi, A. Finnegan, A. B. Malik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 250-254.
- [30] A. M. Merlot, D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, *Front. Physio.* **2014**, 5, 299.
- [31] C. Tiruppathi, W. Song, M. Bergenfeldt, P. Sass, A. B. Malik, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 25968-25975.
- [32] A. N. Friedman, S. Z. Fadem, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, 21, 223-230.

- [33] W. L. Beeken, W. Volwiler, P. D. Goldsworthy, L. E. Garby, W. E. Reynolds, R. Stogsdill, R. S. Stemler, *J. Clin. Invest.* **1962**, *41*, 1312-1333.
- [34] B. Elsadek, F. Kratz, *J. Controlled Release* **2012**, *157*, 4-28.
- [35] C. Chaudhury, S. Mehnaz, J. M. Robinson, W. L. Hayton, D. K. Pearl, D. C. Roopenian, C. L. Anderson, *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 315-322.
- [36] C. Chaudhury, C. L. Brooks, D. C. Carter, J. M. Robinson, C. L. Anderson, *Biochemistry* **2006**, *45*, 4983-4990.
- [37] B. Meloun, L. Morávek, V. Kostka, *Febs Lett.* **1975**, *58*, 134-137.
- [38] D. R. Babin, S. M. Goos, *Eur. J. Biochem.* **1973**, *34*, 409-414.
- [39] P. Behrens, A. Spiekerman, J. Brown, *Fed. Proc.* **1975**, *34*, 591.
- [40] K. Gambhir, R. McMenemy, *Fed. Proc.* **1973**, *32*, 457.
- [41] J. R. Brown, P. Shockley, in *Lipid-Protein Interaction* (Eds.: P. Jost, O. H. Griffith), Wiley, New York, **1982**, S. 26-68.
- [42] D. M. Pederson, J. F. Foster, *Biochemistry* **1969**, *8*, 2357-2365.
- [43] S. R. Anderson, G. Weber, *Biochemistry* **1969**, *8*, 371-377.
- [44] V. Bloomfield, *Biochemistry* **1966**, *5*, 684-689.
- [45] X. M. He, D. C. Carter, *Nature* **1992**, *358*, 209-215.
- [46] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242.
- [47] D. C. Carter, X.-M. He, S. H. Munson, P. D. Twigg, K. M. Gernert, M. B. Broom, T. Y. Miller, *Science* **1989**, *244*, 1195-1198.
- [48] D. C. Carter, X.-M. He, *Science* **1990**, *249*, 302-303.
- [49] A. Andersson, A. Isaksson, L. Brattström, B. Hultberg, *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 1590-1597.
- [50] M. A. Mansoor, A. M. Svardal, P. M. Ueland, *Anal. Biochem.* **1992**, *200*, 218-229.
- [51] M. J. Torres, L. Turell, H. Botti, L. Antmann, S. Carballal, G. Ferrer-Sueta, R. Radi, B. Alvarez, *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *521*, 102-110.
- [52] R. Marley, R. P. Patel, N. Orie, E. Ceaser, V. Darley-Usmar, K. Moore, *Free Radicals Biol. Med.* **2001**, *31*, 688-696.
- [53] J. S. Stamler, *Am. Heart Assoc.* **2004**, 414-417.
- [54] Y. Zhang, N. Hogg, *Free Radicals Biol. Med.* **2005**, *38*, 831-838.
- [55] D. Jourda'heuil, K. Hallén, M. Feelisch, M. B. Grisham, *Free Radicals Biol. Med.* **2000**, *28*, 409-417.
- [56] J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Osborne, D. I. Simon, J. Keaney, J. Vita, D. Singel, C. R. Valeri, J. Loscalzo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 7674-7677.
- [57] J. F. Keaney, D. I. Simon, J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Scharfstein, J. A. Vita, J. Loscalzo, *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 1582-1589.
- [58] S. Carballal, B. Alvarez, L. Turell, H. Botti, B. Freeman, R. Radi, *Amino acids* **2007**, *32*, 543-551.
- [59] W. Dröge, *Exp. Gerontol.* **2002**, *37*, 1333-1345.
- [60] D. Giustarini, I. Dalle-Donne, S. Lorenzini, A. Milzani, R. Rossi, *J. Gerontol., Ser. A* **2006**, *61*, 1030-1038.
- [61] E. Mohorko, R. Glockshuber, M. Aebl, *J. Inherited Metab. Dis.* **2011**, *34*, 869-878.
- [62] S. H. Shakin-Eshleman, S. L. Spitalnik, L. Kasturi, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6363-6366.
- [63] N. Taniguchi, in *Significance of protein glycation reaction in a living body* (Eds.: Y. Shigeta, N. Taniguchi), Igaku-Shoin, Tokyo (Japan), **1997**, S. 2-8.

-
- [64] M. Anraku, K. Yamasaki, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 632-639.
- [65] J. R. Olivieril, A. F. Craievich, *Eur. Biophys. J.* **1995**, *24*, 77-84.
- [66] J. Reščič, V. Vlady, A. Jamnik, O. Glatter, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *239*, 49-57.
- [67] H. Durchschlag, P. Zipper, in *Analytical Ultracentrifugation IV*, Springer-Verlag, **1997**, S. 43-57.
- [68] L. Feng, J. Andrade, C. Hu, *Scanning Microsc.* **1989**, *3*, 399-410.
- [69] M. L. Ferrer, R. Duchowicz, B. Carrasco, J. G. de la Torre, A. U. Acuna, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2422-2430.
- [70] I. Petitpas, C. E. Petersen, C.-E. Ha, A. A. Bhattacharya, P. A. Zunszain, J. Ghuman, N. V. Bhagavan, S. Curry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 6440-6445.
- [71] A. A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 721-732.
- [72] P. A. Zunszain, J. Ghuman, A. F. McDonagh, S. Curry, *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 394-406.
- [73] S. Lejon, I.-M. Frick, L. Björck, M. Wikström, S. Svensson, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 42924-42928.
- [74] G. I. Loeb, H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.* **1956**, *60*, 1633-1644.
- [75] P. G. Squire, P. Moser, C. T. O'Konski, *Biochemistry* **1968**, *7*, 4261-4272.
- [76] T. Kosa, T. Maruyama, M. Otagiri, *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 449-454.
- [77] G. Pico, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1995**, *36*, 1017-1023.
- [78] A. Shrake, P. Ross, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 15392-15399.
- [79] L. Feng, J. Andrade, *J. Biomed. Mater. Res. A* **1994**, *28*, 735-743.
- [80] O. K. Abou-Zied, O. I. K. Al-Shihi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10793-10801.
- [81] G. E. Hastings, P. G. Wolf, *Arch. Fam. Med.* **1992**, *1*, 281.
- [82] G. Haynes, R. Navickis, M. Wilkes, *Eur. J. Anaesthesiol.* **2003**, *20*, 771-793.
- [83] P. Alderson, F. Bunn, A. Li Wan Po, L. Li, M. Pearson, I. Roberts, G. Schierhout, *Cochrane Db. Syst. Rev.* **2004**, 1-40.
- [84] A. Liberati, L. Moja, I. Moschetti, G. F. Gensini, R. Gusinu, *Intern. Emerg. Med.* **2006**, *1*, 243-245.
- [85] A. J. Stewart, C. A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep, D. Tooth, P. J. Sadler, *Febs J.* **2005**, *272*, 353-362.
- [86] E. Bourdon, N. Loreau, L. Lagrost, D. Blache, *Free Radical Res.* **2005**, *39*, 15-20.
- [87] M. Otagiri, V. T. G. Chuang, *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 527-534.
- [88] M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, *Febs Lett.* **2008**, *582*, 1783-1787.
- [89] Z. Drmanovic, S. Voyatzi, D. Kouretas, D. Sahpazidou, A. Papageorgiou, O. Antonoglou, *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 4113-4124.
- [90] D. Hawkins, R. N. Pinckard, R. S. Farr, *Science* **1968**, *160*, 780-781.
- [91] J. E. Walker, *Febs Lett.* **1976**, *66*, 173-175.
- [92] F. Yang, C. Bian, L. Zhu, G. Zhao, Z. Huang, M. Huang, *J. Struct. Biol.* **2007**, *157*, 348-355.
- [93] B. B. Levine, Z. Ovary, *J. Exp. Med.* **1961**, *114*, 875-940.
- [94] S.-F. Ma, M. Anraku, Y. Iwao, K. Yamasaki, U. Kragh-Hansen, N. Yamaotsu, S. Hirono, T. Ikeda, M. Otagiri, *Drug Metab. Dispos.* **2005**.
- [95] K. J. Fehske, W. E. Müller, U. Wollert, *Biochem. Pharmacol.* **1981**, *30*, 687-692.
- [96] A. A. Spector, *J. Lipid Res.* **1975**, *16*, 165-179.
- [97] W. H. Daughaday, *Physiol. Rev.* **1959**, *39*, 885-902.

- [98] I. Petitpas, T. Grüne, A. A. Bhattacharya, S. Curry, *J. Mol. Biol.* **2001**, 314, 955-960.
- [99] K. Laskar, P. Alam, R. H. Khan, A. Rauf, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 122, 72-78.
- [100] S. Wanwimolruk, D. J. Birkett, P. M. Brooks, *Mol. Pharmacol.* **1983**, 24, 458-463.
- [101] A. Sułkowska, *J. Mol. Struct.* **2002**, 614, 227-232.
- [102] Y.-J. Hu, Y. Liu, R.-M. Zhao, S.-S. Qu, *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, 37, 122-126.
- [103] C. E. Petersen, C.-E. Ha, K. Harohalli, J. B. Feix, N. V. Bhagavan, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 20985-20995.
- [104] R. Brodersen, *J. Clin. Invest.* **1974**, 54, 1353-1364.
- [105] C. J. Bowmer, W. E. Lindup, *Biochem. Pharmacol.* **1982**, 31, 319-323.
- [106] T. Sakai, A. Takadate, M. Otagiri, *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, 18, 1755-1761.
- [107] M. S. Dennis, M. Zhang, Y. G. Meng, M. Kadkhodayan, D. Kirchhofer, D. Combs, L. A. Damico, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35035-35043.
- [108] R. L. Gundry, Q. Fu, C. A. Jelinek, J. E. Van Eyk, R. J. Cotter, *Proteomics: Clin. Appl.* **2007**, 1, 73-88.
- [109] P. J. Sadler, J. H. Viles, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 4490-4496.
- [110] A. J. Stewart, C. A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep, P. J. Sadler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 3701-3706.
- [111] W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.* **1998**, 70, 33-39.
- [112] C. A. Blindauer, I. Harvey, K. E. Bunyan, A. J. Stewart, D. Sleep, D. J. Harrison, S. Berezenko, P. J. Sadler, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 23116-23124.
- [113] E. L. Giroux, R. I. Henkin, *Bioinorg. Chem.* **1973**, 2, 125-133.
- [114] M. K. Grandison, F. D. Boudinot, *Clin. Pharmacokinet.* **2000**, 38, 271-290.
- [115] J. Stange, S. Mitzner, W. Ramlow, T. Gliesche, H. Hickstein, R. Schmidt, *ASAIO J.* **1993**, 39, M621-625.
- [116] S. R. Mitzner, J. Stange, S. Klammt, T. Risler, C. M. Erley, B. D. Bader, E. D. Berger, W. Lauchart, P. Peszynski, J. Freytag, *Liver Transplantation* **2000**, 6, 277-286.
- [117] G. Novelli, M. Rossi, R. Pretagostini, L. Poli, D. Peritore, P. Berloco, A. Di Nicuolo, M. Iappelli, R. Cortesini, *Use of MARS in the treatment of acute liver failure: preliminar monocentric experience*, 33. Auflage, Elsevier, **2001**, S. 1942-1944.
- [118] H. M. Solomon, J. J. Schrogie, D. Williams, *Biochem. Pharmacol.* **1968**, 17, 143-151.
- [119] T. Sjödin, N. Roosdorp, I. Sjöholm, *Biochem. Pharmacol.* **1976**, 25, 2131-2140.
- [120] T. Itoh, Y. Saura, Y. Tsuda, H. Yamada, *Chirality* **1997**, 9, 643-649.
- [121] A. Kluczevska, K. Michalik, Z. Drzazga, M. Kaszuba, *Polish J. of Environ. Stud* **2006**, 15, 59-61.
- [122] A. Roda, G. Cappelleri, R. Aldini, E. Roda, L. Barbara, *J. Lipid Res.* **1982**, 23, 490-495.
- [123] D. S. Lukas, A. G. De Martino, *J. Clin. Invest.* **1969**, 48, 1041-1053.
- [124] J. D. Ashbrook, A. A. Spector, E. C. Santos, J. E. Fletcher, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 2333-2338.
- [125] D. S. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 3892-3898.
- [126] J. Anguizola, E. Debolt, D. Suresh, D. S. Hage, *J. Chromatogr. B* **2015**, 1021, 175-181.
- [127] G. V. Richieri, A. Anel, A. M. Kleinfeld, *Biochemistry* **1993**, 32, 7574-7580.

-
- [128] J. A. Jansen, *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1977**, *41*, 401-416.
- [129] K. Turnheim, *Exp. Gerontol.* **2003**, *38*, 843-853.
- [130] S. W. Soobis, *Clin. Pharmacol. Ther.* **1977**, *22*, 147-153.
- [131] W. Lindup, M. Orme, *Br. Med. J.* **1981**, *282*, 212.
- [132] N. Shaklai, R. L. Garlick, H. F. Bunn, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3812-3817.
- [133] H. Koyama, N. Sugioka, A. Uno, S. Mori, K. Nakajima, *Biopharm. Drug Dispos.* **1997**, *18*, 791-801.
- [134] C. F. Chignell, *Mol. Pharmacol.* **1969**, *5*, 244-252.
- [135] A. A. Spector, E. C. Santos, J. D. Ashbrook, J. E. Fletcher, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1973**, *226*, 247-258.
- [136] J. Równicka-Zubik, A. Sulkowska, J. Pozycka, K. Gazdzicka, B. Bojko, M. Maciazek-Jurczyk, W. Sulkowski, *J. Mol. Struct.* **2009**, *924*, 371-377.
- [137] K. K. Stewart, R. F. Doherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1973**, *70*, 2850-2852.
- [138] I. Fitos, M. Simonyi, Z. Tegyei, L. Ötvös, J. Kajtar, M. Kajtar, *J. Chromatogr. A* **1983**, *259*, 494-498.
- [139] C. Bertucci, E. Domenici, P. Salvadori, *Chirality* **1990**, *2*, 167-174.
- [140] G. A. Ascoli, C. Bertucci, P. Salvadori, *Biomed. Chromatogr.* **1998**, *12*, 248-254.
- [141] T. A. G. Noctor, I. W. Wainer, D. S. Hage, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1992**, *577*, 305-315.
- [142] D. S. Hage, *J. Chromatogr. B* **2002**, *768*, 3-30.
- [143] I. W. Wainer, *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 221-234.
- [144] D. S. Hage, T. A. G. Noctor, I. W. Wainer, *J. Chromatogr. A* **1995**, *693*, 23-32.
- [145] T. A. Noctor, M. J. Diaz-Perez, I. W. Wainer, *J. Pharm. Sci.* **1993**, *82*, 675-676.
- [146] I. Sjöholm, B. Ekman, A. Kober, I. Ljungsted-Pahlman, B. Seiving, T. Sjödin, *Mol. Pharmacol.* **1979**, *16*, 767-777.
- [147] K. Valko, S. Nunhuck, C. Bevan, M. H. Abraham, D. P. Reynolds, *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2236-2248.
- [148] E. Domenici, C. Bertucci, P. Salvadori, S. Motellier, I. W. Wainer, *Chirality* **1990**, *2*, 263-268.
- [149] E. Domenici, C. Bertucci, P. Salvadori, G. Felix, I. Cahagne, S. Motellier, I. Wainer, *Chromatographia* **1990**, *29*, 170-176.
- [150] M. Dockal, M. Chang, D. C. Carter, F. Rüker, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1455-1465.
- [151] T. Turmen, P. Thom, A. Louridas, P. L. Morvan, J. V. Aranda, *J. Clin. Pharmacol.* **1982**, *22*, 551-556.
- [152] Y. Fang, G. C. Tong, G. E. Means, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1764*, 285-291.
- [153] P. Ascenzi, A. Bocedi, S. Notari, E. Menegatti, M. Fasano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 481-486.
- [154] T. T. Herskovits, M. Laskowski, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 2481-2492.
- [155] K. Zakrzewski, H. Goch, *Biochemistry* **1968**, *7*, 1835-1842.
- [156] J. Steinhardt, J. G. Leidy, J. P. Mooney, *Biochemistry* **1972**, *11*, 1809-1817.
- [157] V. Maes, J. Hoebeke, A. Vercruysse, L. Kanarek, *Mol. Pharmacol.* **1979**, *16*, 147-153.
- [158] Y.-J. Hu, Y. Liu, X.-H. Xiao, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 517-521.
- [159] O. K. Abou-Zied, N. Al-Lawatia, *Chemphyschem* **2011**, *12*, 270-274.
- [160] G. V. Richieri, R. Ogata, A. Kleinfeld, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 23495-23501.
- [161] V. Maes, Y. Engelborghs, J. Hoebeke, Y. Maras, A. Vercruysse, *Mol. Pharmacol.* **1982**, *21*, 100-107.
- [162] C. F. Chignell, *Mol. Pharmacol.* **1970**, *6*, 1-12.
- [163] C. B. Berde, B. S. Hudson, R. D. Simoni, L. Sklar, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 391-400.

- [164] J. Wilting, W. F. van der Giesen, L. Janssen, M. Weideman, M. Otagiri, J. Perrin, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 3032-3037.
- [165] M. H. Rahman, T. Maruyama, T. Okada, K. Yamasaki, M. Otagiri, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 46, 1721-1731.
- [166] M. H. Rahman, K. Yamasaki, Y.-H. Shin, C. C. Lin, M. Otagiri, *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, 16, 1169-1174.
- [167] K. Yamasaki, T. Maruyama, K. Yoshimoto, Y. Tsutsumi, R. Narazaki, A. Fukuhara, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1999**, 1432, 313-323.
- [168] D. Buttar, N. Colclough, S. Gerhardt, P. A. MacFaul, S. D. Phillips, A. Plowright, P. Whittamore, K. Tam, K. Maskos, S. Steinbacher, H. Steuber, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 7486-7496.
- [169] Y.-R. Zheng, K. Suntharalingam, T. C. Johnstone, H. Yoo, W. Lin, J. G. Brooks, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 8790-8798.
- [170] W. He, Y. Li, C. Xue, Z. Hu, X. Chen, F. Sheng, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 1837-1845.
- [171] C. Dufour, O. Dangles, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2005**, 1721, 164-173.
- [172] D. J. Birkett, S. P. Myers, G. Sudlow, *Mol. Pharmacol.* **1977**, 13, 987-992.
- [173] G. Sudlow, D. Birkett, D. Wade, *Mol. Pharmacol.* **1975**, 11, 824-832.
- [174] G. Sudlow, D. Birkett, D. Wade, *Mol. Pharmacol.* **1976**, 12, 1052-1061.
- [175] J. Min, X. Meng-Xia, Z. Dong, L. Yuan, L. Xiao-Yu, C. Xing, *J. Mol. Struct.* **2004**, 692, 71-80.
- [176] J. Kang, Y. Liu, M.-X. Xie, S. Li, M. Jiang, Y.-D. Wang, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2004**, 1674, 205-214.
- [177] S. Bi, L. Ding, Y. Tian, D. Song, X. Zhou, X. Liu, H. Zhang, *J. Mol. Struct.* **2004**, 703, 37-45.
- [178] Y. Zhang, S. Wu, Y. Qin, J. Liu, J. Liu, Q. Wang, F. Ren, H. Zhang, *Food Chem.* **2018**, 240, 1072-1080.
- [179] D. C. Wilton, *Biochem. J.* **1990**, 270, 163-166.
- [180] A. E. Thumser, A. G. Buckland, D. C. Wilton, *J. Lipid Res.* **1998**, 39, 1033-1038.
- [181] J. C. Er, M. Vendrell, M. K. Tang, D. Zhai, Y.-T. Chang, *ACS Comb. Sci.* **2013**, 15, 452-457.
- [182] K. L. Diehl, M. A. Ivy, S. Rabidoux, S. M. Petry, G. Müller, E. V. Anslyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, 112, E3977-E3986.
- [183] R. F. Steiner, J. Roth, J. Robbins, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 560-567.
- [184] J. Tang, F. Luan, X. Chen, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3210-3217.
- [185] P. B. Kandagal, S. Ashoka, J. Seetharamappa, S. M. T. Shaikh, Y. Jadegoud, O. B. Ijare, *J. Pharmaceut. Biomed.* **2006**, 41, 393-399.
- [186] G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.* **1973**, 9, 649-657.
- [187] P. Das, A. Mallick, B. Haldar, A. Chakrabarty, N. Chattopadhyay, *J. Chem. Sci.* **2007**, 119, 77-82.
- [188] U. Wollert, *Mol. Pharmacol.* **1975**, 11, 52-60.
- [189] K. J. Fehske, W. E. Müller, U. Wollert, L. M. Velden, *Mol. Pharmacol.* **1979**, 16, 778-789.
- [190] A. Rosen, *Biochem. Pharmacol.* **1970**, 19, 2075-2081.
- [191] M. Dockal, D. C. Carter, F. Rüker, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 29303-29310.
- [192] W. Müller, U. Wollert, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1974**, 283, 67-82.
- [193] F. Zsila, *Mol. Pharmaceutics* **2013**, 10, 1668-1682.

-
- [194] H. Watanabe, S. Tanase, K. Nakajou, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, *Biochem. J.* **2000**, 349, 813-819.
- [195] O. J. M. Bos, J. P. M. Remijn, M. J. E. Fischer, J. Wilting, L. H. M. Janssen, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37, 3905-3909.
- [196] S. Gaudreau, J. F. Neault, H. A. Tajmir-Riahi, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2002**, 19, 1007-1014.
- [197] J. Wilting, B. J. T. Hart, J. J. De Gier, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.* **1980**, 626, 291-298.
- [198] M. A. Kenyon, J. A. Hamilton, *J. Lipid Res.* **1994**, 35, 458-467.
- [199] G. Jürgens, M. Müller, P. Garidel, M. H. Koch, H. Nakakubo, A. Blume, K. Brandenburg, *J. Endotoxin Res.* **2002**, 8, 115-126.
- [200] R. Narayanan, P. Balaram, *Bioorg. Chem.* **1980**, 9, 352-362.
- [201] Y. Wang, Z. Luo, X. Shi, H. Wang, L. Nie, M. Huang, *Protein Sci.* **2011**, 20, 2095-2101.
- [202] A. J. Ryan, J. Ghuman, P. A. Zunszain, C.-W. Chung, S. Curry, *J. Struct. Biol.* **2011**, 174, 84-91.
- [203] H. Jun, R. Mayer, C. Himel, L. Luzzi, *J. Pharm. Sci.* **1971**, 60, 1821-1825.
- [204] J. Rohacova, M. L. Marin, M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 4710-4716.
- [205] S. Nagataki, I. Matsunaga, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **1985**, 26, 1175-1178.
- [206] C. B. Huang, K. Zhang, X. L. Liu, S. F. Wang, *Luminescence* **2007**, 22, 393-400.
- [207] I. Vlasova, A. Saletsky, *Laser Phys. Lett.* **2008**, 5, 834.
- [208] I. Vlasova, A. Saletsky, *Laser Phys. Lett.* **2008**, 5, 384-389.
- [209] E. Vass, S. Holly, Z. Majer, J. Samu, I. Laczko, M. Hollosi, *J. Mol. Struct.* **1997**, 408, 47-56.
- [210] S. Cai, B. R. Singh, *Biophys. Chem.* **1999**, 80, 7-20.
- [211] M. Purcell, J. Neault, H. Tajmir-Riahi, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1478, 61-68.
- [212] M. Purcell, J. Neault, H. Malonga, H. Arakawa, R. Carpentier, H. Tajmir-Riahi, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2001**, 1548, 129-138.
- [213] V. A. Sirotkin, A. N. Zinatullin, B. N. Solomonov, D. A. Faizullin, V. D. Fedotov, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2001**, 1547, 359-369.
- [214] H. Mao, A. H. Gunasekera, S. W. Fesik, *Protein Expression Purif.* **2000**, 20, 492-499.
- [215] H. Mao, P. J. Hajduk, R. Craig, R. Bell, T. Borre, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10429-10435.
- [216] J. Simard, P. Zunszain, C.-E. Ha, J. Yang, N. Bhagavan, I. Petitpas, S. Curry, J. Hamilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 17958-17963.
- [217] M. Dockal, D. C. Carter, F. Rüker, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 29303-29310.
- [218] M. Dockal, D. C. Carter, F. Rüker, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 3042-3050.
- [219] D. S. Park, C. E. Petersen, C. E. Ha, K. Harohalli, J. B. Feix, N. V. Bhagavan, *IUBMB life* **1999**, 48, 169-174.
- [220] T. Kjeldsen, A. F. Pettersson, L. Drube, P. Kurtzhals, I. Jonassen, S. Havelund, P. H. Hansen, J. Markussen, *Protein Expression Purif.* **1998**, 13, 163-169.
- [221] K. K. Gambhir, R. H. McMenamy, F. Watson, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 6711-6719.
- [222] C. Kuenzle, N. Gitzelmann-Cumarasamy, K. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 801-807.
- [223] V. T. G. Chuang, M. Otagiri, *Pharm. Res.* **2002**, 19, 1458-1464.
- [224] C. E. Petersen, C. E. Ha, S. Curry, N. V. Bhagavan, *Proteins* **2002**, 47, 116-125.

- [225] U. Kragh-Hansen, H. Watanabe, K. Nakajou, Y. Iwao, M. Otagiri, *J. Mol. Biol.* **2006**, 363, 702-712.
- [226] D. P. Cistola, D. M. Small, *J. Clin. Invest.* **1991**, 87, 1431-1441.
- [227] E. S. Krenzel, Z. J. Chen, J. A. Hamilton, *Biochemistry* **2013**, 52, 2382-2382.
- [228] N. Jafari, R. Ahmed, M. Gloyd, J. Bloomfield, P. Britz-McKibbin, G. Melacini, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 7457-7465.
- [229] A. I. Ivanov, J. Christodoulou, J. A. Parkinson, K. J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, P. J. Sadler, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 14721-14730.
- [230] U. Kragh-Hansen, *Biochem. J.* **1983**, 209, 135-142.
- [231] D. Rudman, T. J. Bixler, A. E. Del Rio, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1971**, 176, 261-272.
- [232] H. Vorum, B. Honoré, *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, 48, 870-875.
- [233] A. O. Pedersen, R. Brodersen, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 10236-10239.
- [234] J. D. Ashbrook, A. A. Spector, J. E. Fletcher, *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 7038-7042.
- [235] G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1975**, 2, 129-140.
- [236] R. Steiner, J. Roth, J. Robbins, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 560-567.
- [237] A. Pingoud, C. Urbanke, *Arbeitsmethoden der Biochemie*, Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York, **1997**.
- [238] Instructions - Single-Use RED Plate with Inserts, Thermo Scientific, Pub. Part. No. 2162034.7, **2017**.
- [239] L. Wenskowsky, H. Schreuder, V. Derdau, H. Matter, J. Volkmar, M. Nazaré, T. Opatz, S. Petry, *Angew. Chem.* **2018**, 130, 1056-1060.
- [240] W. Müller, U. Wollert, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1973**, 280, 229-237.
- [241] J. Krieglstein, G. Kuschinsky, *Arzneim. Forsch.* **1968**, 18, 287.
- [242] G. H. Mudge, G. R. Stibitz, M. S. Robinson, M. Gemborys, *Drug Metab. Dispos.* **1978**, 6, 440-451.
- [243] U. Kragh-Hansen, *Biochem. J.* **1985**, 225, 629.
- [244] I. Nowak, L. M. Shaw, *Clin. Chem.* **1995**, 41, 1011-1017.
- [245] A. Kober, I. Sjöholm, *Mol. Pharmacol.* **1980**, 18, 421-426.
- [246] O. Borga, B. Borga, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1997**, 25, 63-77.
- [247] H. Aki, M. Yamamoto, *J. Pharm. Pharmacol.* **1989**, 41, 674-679.
- [248] Å. Frostell-Karlsson, A. Remaeus, H. Roos, K. Andersson, P. Borg, M. Härmäläinen, R. Karlsson, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1986-1992.
- [249] D. S. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 3887-3892.
- [250] S. Wanwimolruk, D. Birkett, P. Brooks, *Mol. Pharmacol.* **1983**, 24, 458-463.
- [251] U. Kragh-Hansen, *Mol. Pharmacol.* **1988**, 34, 160-171.
- [252] B. X. Huang, D. Chhabil, K. Hee-Yong, *Biochem. J.* **2005**, 387, 695-702.
- [253] D. P. Bright, S. D. Adham, L. C. J. M. Lemaire, R. Benavides, M. Gruss, G. W. Taylor, E. H. Smith, N. P. Franks, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 12038-12047.
- [254] L. Zhu, F. Yang, L. Chen, E. J. Meehan, M. Huang, *J. Struct. Biol.* **2008**, 162, 40-49.
- [255] A. A. Bhattacharya, S. Curry, N. P. Franks, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 38731-38738.
- [256] P. A. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, S. Curry, *BMC Struct. Biol.* **2003**, 3, 6.
- [257] I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, S. Twine, M. East, S. Curry, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 22804-22809.

-
- [258] A. J. Ryan, C.-w. Chung, S. Curry, *BMC Struct. Biol.* **2011**, *11*, 18.
- [259] S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 827-835.
- [260] M. A. Dessau, Y. Modis, *J. Visualized Exp.* **2011**.
- [261] S. Gerhardt, Dissertation, Technische Universität München (München), **2001**.
- [262] Hanging Drop Vapor Diffusion Crystallization - Crystal Growth 101, Hampton Research.
- [263] Sitting Drop Vapor Diffusion Crystallization - Crystal Growth 101, Hampton Research.
- [264] E. Estrada, E. Uriarte, E. Molina, Y. Simón-Manso, G. W. Milne, *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 2709-2724.
- [265] S. Curry, P. Brick, N. P. Franks, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1441*, 131-140.
- [266] R. S. Gordon Jr, A. Cherkes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1958**, *97*, 150-151.
- [267] J. E. White, F. L. Engel, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1958**, *99*, 375-378.
- [268] E. D. Korn, *J. Biol. Chem.* **1955**, *215*, 1-14.
- [269] E. D. Korn, *J. Biol. Chem.* **1955**, *215*, 15-26.
- [270] A. Saifer, L. Goldman, *J. Lipid Res.* **1961**, *2*, 268-270.
- [271] S. Laurell, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1956**, *8*, 81.
- [272] W. Reitsma, *J. Intern. Med.* **1967**, *182*, 353-361.
- [273] E. L. Bierman, V. P. Dole, T. N. Roberts, *Diabetes* **1957**, *6*, 475-479.
- [274] Y. Zhang, P. Lee, S. Liang, Z. Zhou, X. Wu, F. Yang, H. Liang, *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *86*, 1178-1184.
- [275] S. Liu, D. Li, Z. Zhang, G. S. Prakash, P. S. Conti, Z. Li, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7371-7373.
- [276] J. B. Swaney, I. M. Klotz, *Biochemistry* **1970**, *9*, 2570-2574.
- [277] I. Sjöholm, I. Ljungstedt, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 8434-8441.
- [278] N. Roosdorp, B. Wänn, I. Sjöholm, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3876-3880.
- [279] N. Roosdorp, Ph.D. thesis, University of Uppsala (Uppsala), **1977**.
- [280] K. J. Fehske, U. Schläfer, U. Wollert, W. E. Müller, *Mol. Pharmacol.* **1982**, *21*, 387-393.
- [281] U. Mathias, Dissertation, Albert-Ludwig-Universität Freiburg im Breisgau (Freiburg), **2008**.
- [282] P. D'Arcy, J. McElnay, *Pharmacol. Ther.* **1982**, *17*, 211-220.
- [283] F. P. Nicoletti, B. D. Howes, M. Fittipaldi, G. Fanali, M. Fasano, P. Ascenzi, G. Smulevich, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11677-11688.
- [284] G. Wilding, R. C. Feldhoff, E. S. Vesell, *Biochem. Pharmacol.* **1977**, *26*, 1143-1146.
- [285] S. K. Chakrabarti, *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 739-743.
- [286] P. G. Dayton, Z. H. Israili, J. M. Perel, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1973**, *226*, 172-194.
- [287] J. McElnay, P. D'Arcy, *Drugs* **1983**, *25*, 495-513.
- [288] L. N. Sansom, A. M. Evans, *Drug Safety* **1995**, *12*, 227-233.
- [289] P. Rolan, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1994**, *37*, 125-128.
- [290] A. Kawachi, T. Motoya, M. Miyashita, *J. Appl. Ther. Res.* **1998**, *2*, 101-108.
- [291] H. Takahashi, T. Kashima, S. Kimura, N. Murata, T. Takaba, K. Iwade, T. Abe, H. Tainaka, T. Yasumori, H. Echizen, *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 1179-1186.
- [292] L. Laine, *Rev. Gastroenterol. Disord.* **2004**, *4*, S33-41.
- [293] Y. Hatakeyama, S. Niwano, H. Niwano, T. Kosukegawa, T. Izumi, *Int. Heart J.* **2010**, *51*, 399-403.
- [294] S. Harder, P. Thürmann, *Clin. Pharmacokinet.* **1996**, *30*, 416-444.
- [295] B. Seville, N. Thuaud, J.-P. Tillement, *J. Chromatogr. A* **1978**, *167*, 159-170.
- [296] J. Prandota, A. W. Pruitt, *Clin. Pharmacol. Ther.* **1975**, *17*, 159-166.

- [297] N. Takamura, T. Maruyama, E. Chosa, K. Kawai, Y. Tsutsumi, Y. Uryu, K. Yamasaki, T. Deguchi, M. Otagiri, *Drug Metab. Dispos.* **2005**.
- [298] T. Nishio, N. Takamura, R. Nishii, J. Tokunaga, M. Yoshimoto, K. Kawai, *Nephrol., Dial., Transplant.* **2008**, 23, 2304-2310.
- [299] B. Sekula, K. Zielinski, A. Bujacz, *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 60, 316-324.
- [300] A. Bujacz, K. Zielinski, B. Sekula, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2014**, 82, 2199-2208.
- [301] B. Sekula, A. Bujacz, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 82-89.
- [302] J. S. Parks, D. Cistola, D. Small, J. Hamilton, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 9262-9269.
- [303] D. P. Cistola, D. Small, J. Hamilton, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 10971-10979.
- [304] K. B. Handing, I. G. Shabalina, K. Szlachta, K. A. Majorek, W. Minor, *Mol. Immunol.* **2016**, 71, 143-151.
- [305] F. Karush, M. Sonenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 1369-1376.
- [306] F. Karush, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 2705-2713.
- [307] A. Jonas, G. Weber, *Biochemistry* **1971**, 10, 1335-1339.
- [308] A. A. Spector, K. M. John, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, 127, 65-71.
- [309] J. E. Fletcher, A. A. Spector, J. D. Ashbrook, *Biochemistry* **1971**, 10, 3229-3232.
- [310] J. D. Morrisett, H. Pownall, A. Gotto, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 2487-2494.
- [311] T. Kosa, T. Maruyama, M. Otagiri, *Pharm. Res.* **1997**, 14, 1607-1612.
- [312] C. J. Kubarych, M. M. Adams, E. V. Anslyn, *Org. Lett.* **2010**, 12, 4780-4783.
- [313] S. C. Penchala, M. R. Miller, A. Pal, J. Dong, N. R. Madadi, J. Xie, H. Joo, J. Tsai, P. Batoon, V. Samoshin, A. Franz, T. Cox, J. Miles, W. K. Chan, M. S. Park, M. M. Alhamadsheh, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 793-800.
- [314] P. Kremer, M. Fardanesh, R. Ding, M. Pritsch, S. Zoubaa, E. Frei, *Operative Neurosurgery* **2009**, 64, ONS53-ONS61.
- [315] F. J. van Hemert, H. van Lenthe, K. J. Schimmel, B. L. van Eck-Smit, *Ann. Nucl. Med.* **2005**, 19, 345-349.
- [316] K. Kawai, N. Takamura, R. Nishi, S. Jinnouchi, S. Nagamachi, S. Tamura, K. Arimori, M. Otagiri, (Eds.: M. Otagiri, Y. Sugiyama, B. Testa, J.-P. Tillement), *Proceedings of the International Symposium on Serum Albumin & α_1 -Acid Glycoprotein*, Kumamoto (Japan), **2001**, S. 181-192.
- [317] E. Sbarouni, P. Georgiadou, V. Voudris, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2011**, 49, 177-184.
- [318] J. Lu, A. J. Stewart, P. J. Sadler, T. J. Pinheiro, C. A. Blindauer, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4425-4430.
- [319] S. M. Petry, unveröffentlichte Ergebnisse, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (Frankfurt).
- [320] J. Volkmar, Bachelorarbeit, Proxadis School of International Management & Technology (Frankfurt), **2011**.
- [321] P. Ghosh, M. W. Whitehouse, *Biochem. J.* **1968**, 108, 155.
- [322] P. Ghosh, *J. Chem. Soc. B* **1968**, 334-338.
- [323] G. M. Edelman, W. O. McClure, *Accounts Chem. Res.* **1968**, 1, 65-70.
- [324] P. Job, *Ann. Chim. Appl.* **1928**, 9, 113-203.
- [325] C. Y. Huang, *Methods Enzymol.* **1982**, 87, 509-525.
- [326] L. Wenskowsky, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2014**.
- [327] W.-C. Sun, K. R. Gee, R. P. Haugland, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3107-3110.
- [328] A. Fonin, I. Kuznetsova, K. Turoverov, *J. Mol. Struct.* **2015**, 1090, 107-111.
- [329] J. González-Jiménez, M. Cortijo, *Protein J.* **2004**, 23, 351-355.

-
- [330] *Technical Resource Guide – Fluorescence Polarization*, 4th ed., Invitrogen Corporation, Madison, WI (USA), **2006**.
- [331] GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.
- [332] J. A. Hamilton, D. P. Cistola, J. D. Morrisett, J. T. Sparrow, D. M. Small, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 3718-3722.
- [333] H. K. Biesalski, S. C. Bischoff, C. Puchstein, *Ernährungsmedizin: nach dem neuen Curriculum Ernährungsmedizin der Bundesärztekammer*, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2010**, S. 86.
- [334] C. McAuliffe, *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 1267-1275.
- [335] P. W. Atkins, J. d. Paula, *Physikalische Chemie*, 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2006**, S. 943-944.
- [336] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, *Protein Eng.* **1999**, *12*, 439-446.
- [337] E. A. Stura, I. A. Wilson, *J. Cryst. Growth* **1991**, *110*, 270-282.
- [338] R. Guenther, E. Jaehne, H. Hartmann, M. Schulze, *J. Prakt. Chem.* **1987**, *329*, 945-954.
- [339] C.-H. Yang, W.-W. Fan, G.-Q. Liu, L. Duan, L. Li, Y.-M. Li, *RSC Advances* **2015**, *5*, 61081-61093.
- [340] T. Bieber, B. Kane, *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 1198-1199.
- [341] C. Binisti, L. Assogba, E. Touboul, C. Mounier, J. Huet, J.-E. Ombetta, C. Z. Dong, C. Redeuilh, F. Heymans, J.-J. Godfroid, *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 809-828.
- [342] J.-S. Lee, N.-y. Kang, Y. K. Kim, A. Samanta, S. Feng, H. K. Kim, M. Vendrell, J. H. Park, Y.-T. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10077-10082.
- [343] W. Siegenthaler, H. E. Blum, *Klinische Pathophysiologie*, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, **2006**.
- [344] F. Li, D. Zhou, X. Guo, *J. Chromatogr. Sci.* **2003**, *41*, 137-141.
- [345] N. Seedher, S. Bhatia, *Pharmacological research* **2006**, *54*, 77-84.
- [346] J. Anguizola, R. Matsuda, O. S. Barnaby, K. Hoy, C. Wa, E. DeBolt, M. Koke, D. S. Hage, *Clin. Chim. Acta* **2013**, *425*, 64-76.
- [347] N. Iberg, R. Flückiger, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13542-13545.
- [348] R. L. Garlick, J. S. Mazer, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 6142-6146.
- [349] D. M. Nathan, J. Kuenen, R. Borg, H. Zheng, D. Schoenfeld, R. J. Heine, *Diabetes Care* **2008**.
- [350] E. Bourdon, N. Loreau, D. Blache, *The FASEB journal* **1999**, *13*, 233-244.
- [351] K. Nakajou, H. Watanabe, U. Kragh-Hansen, T. Maruyama, M. Otagiri, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2003**, *1623*, 88-97.
- [352] M. Nauck, A. Petermann, D. Müller-Wieland, W. Kerner, U. A. Müller, R. Landgraf, G. Freckmann, L. Heinemann, *Diabetologie und Stoffwechsel* **2017**, *12*, S94-S100.
- [353] M. W. A. Khan, Z. Rasheed, W. A. Khan, R. Ali, *Biochemistry (Moscow)* **2007**, *72*, 146-152.
- [354] R. Dolhofer, O. Wieland, *Diabetes* **1980**, *29*, 417-422.
- [355] H. V. Roohk, A. R. Zaidi, *J. Diabetes Sci. Technol.* **2008**, *2*, 1114-1121.
- [356] P. Rondeau, E. Bourdon, *Biochimie* **2011**, *93*, 645-658.
- [357] N. Sattarahmady, A. A. Moosavi-Movahedi, F. Ahmad, G. H. Hakimelahi, M. Habibi-Rezaei, A. A. Saboury, N. Sheibani, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 933-942.
- [358] A. Mohamadi-Nejad, A. Moosavi-Movahedi, G. Hakimelahi, N. Sheibani, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, *34*, 1115-1124.

- [359] D. L. Mendez, R. A. Jensen, L. A. McElroy, J. M. Pena, R. M. Esquerra, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *444*, 92-99.
- [360] P. R. Gwilt, R. R. Nahhas, W. G. Tracewell, *Clin. Pharmacokinet.* **1991**, *20*, 477-490.
- [361] R. Matsuda, J. Anguizola, K. S. Joseph, D. S. Hage, *J. Chromatogr. A* **2012**, *1265*, 114-122.
- [362] N. Okabe, N. Hashizume, *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, *17*, 16-21.
- [363] J. A. Anguizola, S. B. Basiaga, D. S. Hage, *Curr. Metabolomics* **2013**, *1*, 239.
- [364] S. Tsuchiya, T. Sakurai, S.-I. Sekiguchi, *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 2967-2971.
- [365] R. J. Koenig, C. M. Peterson, R. L. Jones, C. Saudek, M. Lehrman, A. Cerami, *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295*, 417-420.
- [366] H. F. Bunn, K. H. Gabbay, P. M. Gallop, *Science* **1978**, *200*, 21-27.
- [367] S. Takahashi, H. Uchino, T. Shimizu, A. Kanazawa, Y. Tamura, K. Sakai, H. Watada, T. Hirose, R. Kawamori, Y. Tanaka, *Endocr. J.* **2007**, *54*, 139-144.
- [368] F. E. Vos, J. B. Schollum, R. J. Walker, *NDT Plus* **2011**, *4*, 368-375.
- [369] T. Zhang, E. V. Anslyn, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1627-1629.
- [370] B. E. Collins, S. Sorey, A. E. Hargrove, S. H. Shabbir, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4055-4060.
- [371] A. E. Hargrove, A. D. Ellington, E. V. Anslyn, J. L. Sessler, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 388-396.
- [372] B. M. Chapin, P. Metola, S. L. Vankayala, H. L. Woodcock, T. J. Mooibroek, V. M. Lynch, J. D. Larkin, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5568-5578.
- [373] S. Shinkai, M. Takeuchi, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1996**, *15*, 188-194.
- [374] T. Kawanishi, M. Romey, P. Zhu, M. Holody, S. Shinkai, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 499-512.
- [375] T. D. James, K. S. Sandanayake, S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1910-1922.
- [376] T. D. James, K. S. Sandanayake, S. Shinkai, *Nature* **1995**, *374*, 345.
- [377] K. R. A. Samankumara Sandanayake, K. Nakashima, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1621-1622.
- [378] X. Sun, T. D. James, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8001-8037.
- [379] D. Zhai, S.-C. Lee, M. Vendrell, L. P. Leong, Y.-T. Chang, *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 81-84.
- [380] S. A. Asher, V. L. Alexeev, A. V. Goponenko, A. C. Sharma, I. K. Lednev, C. S. Wilcox, D. N. Finegold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3322-3329.
- [381] C. W. Gray, T. A. Houston, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5426-5428.
- [382] S. L. Wiskur, J. J. Lavigne, A. Metzger, S. L. Tobey, V. Lynch, E. V. Anslyn, *Chem. – Eur. J.* **2004**, *10*, 3792-3804.
- [383] K. Swamy, Y. J. Jang, M. S. Park, H. S. Koh, S. K. Lee, Y. J. Yoon, J. Yoon, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3453-3456.
- [384] G. Zhang, Y. Li, J. Liu, *RSC Advances* **2017**, *7*, 34959-34962.
- [385] A. G. Waterson, J. P. Kennedy, J. D. Patrone, N. F. Pelz, M. D. Feldkamp, A. O. Frank, B. Vangamudi, E. M. Souza-Fagundes, O. W. Rossanese, W. J. Chazin, S. W. Fesik, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *6*, 140-145.
- [386] T. D. James, K. S. Sandanayake, R. Iguchi, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8982-8987.
- [387] C.-Y. Lee, S.-J. Ahn, C.-H. Cheon, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12154-12160.
- [388] H. G. Kuivila, J. F. Reuwer Jr, J. A. Mangravite, *Can. J. Chem.* **1963**, *41*, 3081-3090.

-
- [389] J. Lozada, Z. Liu, D. M. Perrin, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 5365-5368.
- [390] A. D. Ainley, F. Challenger, *J. Chem. Soc.* **1930**, 2171-2180.
- [391] J. J. Lavigne, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3666-3669.
- [392] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed., Pergamon, New York, **1988**.
- [393] G. R. Fulmer, A. J. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, 29, 2176-2179.
- [394] S. C. Gill, P. H. Von Hippel, *Anal. Biochem.* **1989**, 182, 319-326.
- [395] K. Harveer, S. Jasmeen, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2014**, 28, 475-480.
- [396] S. Saphier, Y. Karton, *J. Pharm. Sci.* **2010**, 99, 804-815.
- [397] J. T. Hewitt, F. G. Pope, *J. Chem. Soc.* **1896**, 69, 1265-1269.
- [398] R. Beckert, E. Fanghänel, W. D. Habicher, P. Metz, D. Pavel, K. Schwetlick, *Organikum*, 22. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2004**, S. 633, 644.
- [399] D. Hofmann, E. Gans, J. Krüll, M. R. Heinrich, *Chem. – Eur. J.* **2017**, 23, 4042-4045.
- [400] C. C. P. Laria, L.M.Clauzel, A. Z. Olarte, S. G. Vicente, A. Mian, United States Patent Application, US2012/0149769A1, **2012**.
- [401] B. B. Snider, J. J. Patricia, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 38-46.
- [402] M. T. Clark, R. A. Coburn, R. T. Evans, R. J. Genco, *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 25-29.
- [403] R. Rossi, A. Carpito, P. Cossi, *Synth. Commun.* **1993**, 23, 143-152.
- [404] L. Lu, J. Ma, P. Qu, F. Li, *Org. Lett.* **2015**, 17, 2350-2353.
- [405] H. R. Lawrence, A. Kazi, Y. Luo, R. Kendig, Y. Ge, S. Jain, K. Daniel, D. Santiago, W. C. Guida, S. M. Sebt, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 5576-5592.
- [406] A. R. M. P.G. Baraldi, P.A. Borea, WO2005/028489A2, **2005**.
- [407] G.-B. Wang, L.-F. Wang, C.-Z. Li, J. Sun, G.-M. Zhou, D.-C. Yang, *Res. Chem. Intermed.* **2012**, 38, 77-89.
- [408] W. H. Gray, G. A. H. Buttle, D. Stephenson, *Biochem. J.* **1937**, 31, 724.
- [409] H. A. Staab, K. Wendel, *Chem. Ber.* **1960**, 93, 2902-2915.
- [410] P. Gelmo, *J. Prakt. Chem.* **1908**, 77, 369-382.
- [411] V. Turcotte, S. b. Fortin, F. Vevey, Y. Coulombe, J. Lacroix, M.-F. Côté, J.-Y. Masson, R. C.-Gaudreault, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 6194-6208.
- [412] X. Zheng, H. Oda, K. Takamatsu, Y. Sugimoto, A. Tai, E. Akaho, H. I. Ali, T. Oshiki, H. Kakuta, K. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 1014-1021.
- [413] S. Shekhar, T. B. Dunn, B. J. Kotecki, D. K. Montavon, S. C. Cullen, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 4552-4563.
- [414] J. K. Seydel, *Mol. Pharmacol.* **1966**, 2, 259-265.
- [415] N. D. Smith, C. Bonnefous, J. E. Payne, T. Z. Hoffman, P. L. Wash, C. H. Hassig, S. A. Scranton, United States Patent Application, US2007/0135431A1, **2007**.
- [416] X. Wang, Y.-M. Ahn, A. G. Lentscher, J. S. Lister, R. C. Brothers, M. M. Kneen, B. Gerratana, H. I. Boshoff, C. S. Dowd, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 4426-4430.
- [417] S. Shrestha, B. R. Bhattarai, B. Kafle, K.-H. Lee, H. Cho, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 8643-8652.
- [418] J. B. Bialecki, L.-H. Yuan, B. Gong, *Tetrahedron* **2007**, 63, 5460-5469.
- [419] Q. Feng, Q. Song, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 1867-1871.
- [420] X. Li, S. J. Qian, Q. J. He, B. Yang, J. Li, Y. Z. Hu, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3627-3630.

- [421] T. H. Walls, S. C. Grindrod, D. Beraud, L. Zhang, A. R. Baheti, S. Dakshanamurthy, M. K. Patel, M. L. Brown, L. H. MacArthur, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 5269-5276.
- [422] J. K. Laha, C. Muthiah, M. Taniguchi, B. E. McDowell, M. Ptaszek, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4092-4102.
- [423] P.-Y. Chen, Y.-H. Wu, M.-H. Hsu, T.-P. Wang, E.-C. Wang, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 653-657.
- [424] T. Chuprajob, C. Changtam, R. Chokchaisiri, W. Chunglok, N. Sornkaew, A. Suksamrarn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2839-2844.
- [425] A. Baranovsky, B. Schmitt, D. J. Fowler, B. Schneider, *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 1019-1045.
- [426] N. Halland, T. Hansen, K. A. Jørgensen, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5105-5107.
- [427] M. Ikawa, M. A. Stahmann, K. P. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 902-906.
- [428] D. Muller, I. Zeltser, G. Bitan, C. Gilon, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 411-416.
- [429] N. Fomina, C. McFearn, M. Sermsakdi, O. Edigin, A. Almutairi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9540-9542.
- [430] H. Ji, H. Li, P. Martásek, L. J. Roman, T. L. Poulos, R. B. Silverman, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 779-797.
- [431] P. Zhao, Y. W. Yin, *J. Heterocycl. Chem.* **2004**, *41*, 157-160.
- [432] X. Elduque, E. Pedroso, A. Grandas, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2843-2853.
- [433] A. Milelli, C. Marchetti, M. L. Greco, F. Moraca, G. Costa, E. Turrini, E. Catanzaro, N. Betari, C. Calcabrini, C. Sissi, S. Alcado, F. Camilla, V. Tumiatto, A. Minarini, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *128*, 107-122.
- [434] W. M. Ma, T. D. James, J. M. Williams, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4850-4853.
- [435] E. Keinan, United States Patent Application, US2010/016610A1, **2010**.
- [436] R. Geiger, *Liebigs Ann. Chem.* **1971**, *750*, 165-170.
- [437] S. Xiong, X. Zhang, L.-B. Meng, J. Jiang, C. Lin, L. Wang, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6504-6507.
- [438] S. M. Axt, T. J. Church, W. Hruzewicz, J. R. Jacobsen, T. E. Jenkins, Y.-H. Ji, J. K. Judice, United States Patent Application, US6337423B1, **2002**.
- [439] F. Devínský, I. Lacko, L. Krasnec, *Synthesis* **1980**, *1980*, 303-305.
- [440] S. W. Garrett, O. R. Davies, D. A. Milroy, P. J. Wood, C. W. Pouton, M. D. Threadgill, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1779-1797.
- [441] M. E. Prime, F. A. Brookfield, S. M. Courtney, S. Gaines, R. W. Marston, O. Ichihara, M. Li, D. Vaidya, H. Williams, A. Pedret-Dunn, L. Reed, S. Schaertl, L. Toledo-Sherman, M. Beconi, D. McDonald, I. Munoz-Sanjuan, C. Dominguez, J. Wityak, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 731-735.
- [442] Z. Liu, D. Pagé, M. Tremblay, C. Walpole, H. Yang, WO2006/033632A1, **2006**.
- [443] M. Keller, A. Wolfgardt, C. Mueller, R. Wilcken, F. M. Boeckler, S. Oliaro-Bosso, T. Ferrante, G. Balliano, F. Bracher, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *109*, 13-22.
- [444] P. Vertesaljai, I. O. Lebedyeva, A. A. Oliferenko, X. Qi, J. Fu, D. A. Ostrov, A. M. Asiri, C. D. Hall, A. Katritzky, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6653-6655.
- [445] Y. Shi, T. Yi, H. Lan, Y. Wen, WO2015/139263A1, **2015**.
- [446] F. J. Bihel, M. Hellal, J.-J. Bourguignon, *Synthesis* **2007**, *24*, 3791.
- [447] W. Kabsch, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125-132.
- [448] C. Vonnrhein, C. Flensburg, P. Keller, A. Sharff, O. Smart, W. Paciorek, T. Womack, G. Bricogne, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 293-302.
- [449] P. Evans, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 72-82.

-
- [450] I. Tickle, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, A. Sharff, C. Vonnrhein, G. Bricogne, *Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd* **2017**.
- [451] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658-674.
- [452] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486-501.
- [453] G. Bricogne, E. Blanc, M. Brandl, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, P. Roversi, A. Sharff, O. Smart, C. Vonnrhein, *Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd* **2011**.
- [454] V. Pichler, J. Mayr, P. Heffeter, O. Dömötör, É. A. Enyedy, G. Hermann, D. Groza, G. Köllensperger, M. Galanksi, W. Berger, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2249-2251.

7. Spektrenanhang

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren unbekannter Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden, sind auf den folgenden Seiten abgebildet.

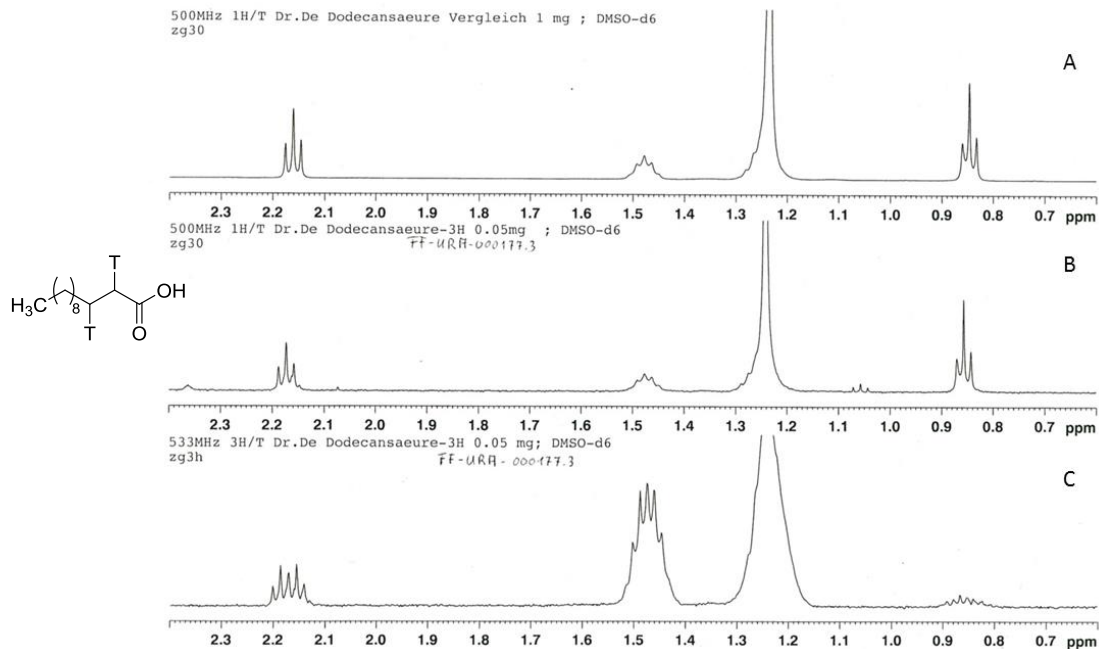


Abbildung 155: A) ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) von 28. B) ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) von $T28$. C) ^3H -NMR (533 MHz, DMSO-d_6) von $T28$.

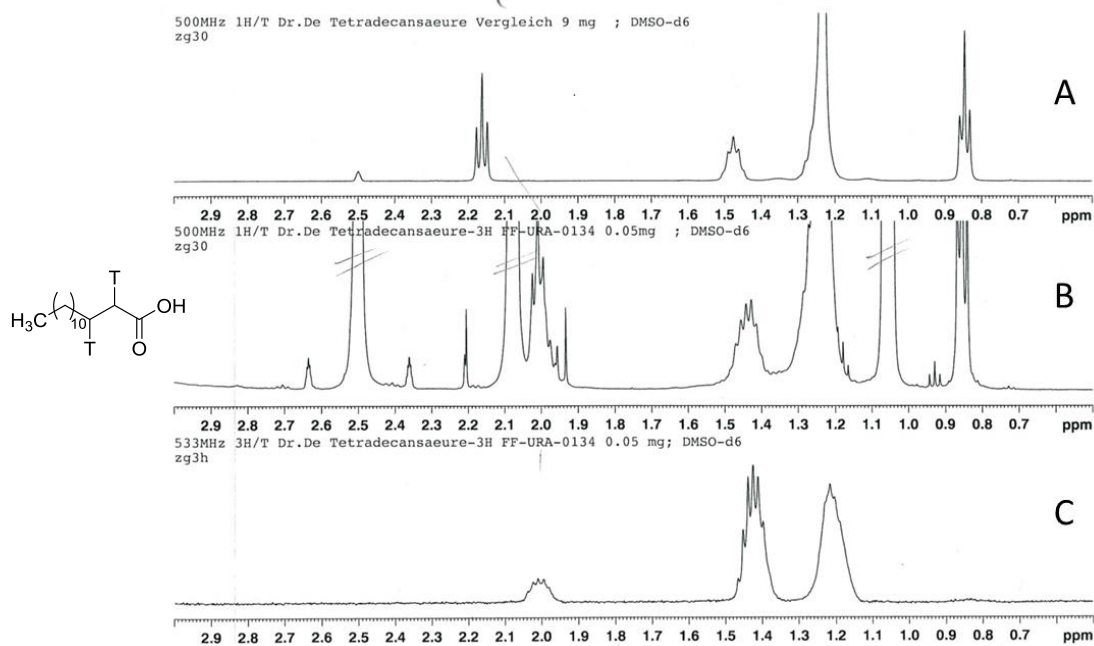


Abbildung 156: A) ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) von 3. B) ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) von $T3$. C) ^3H -NMR (533 MHz, DMSO-d_6) von $T3$.

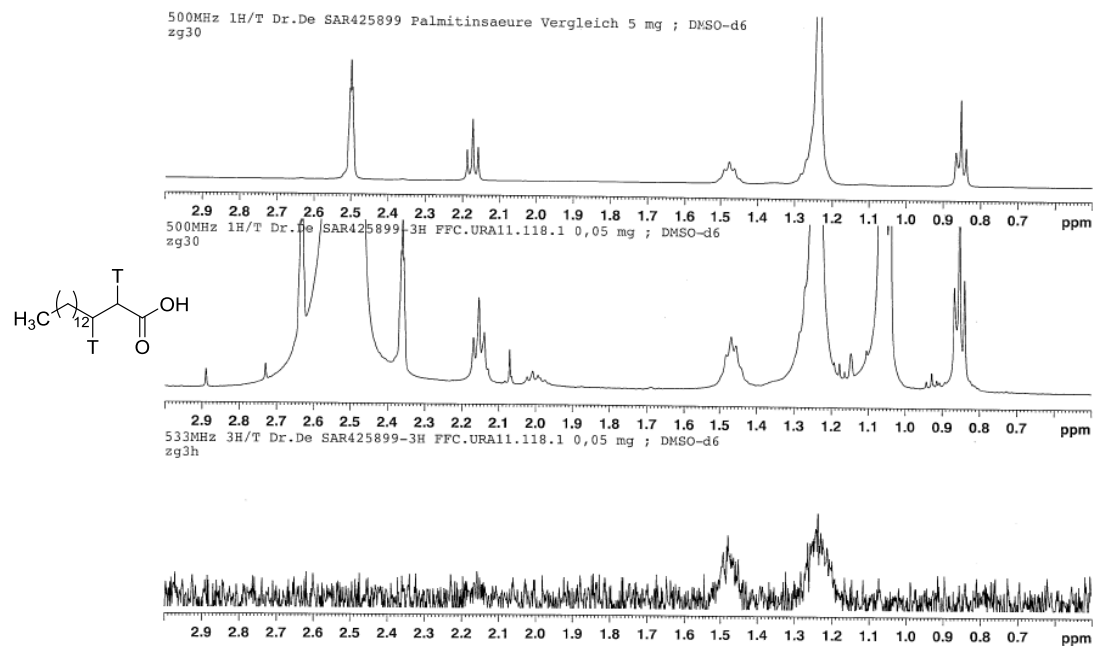


Abbildung 157: A) ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) von 29. B) ^1H -NMR (500 MHz, DMSO-d_6) von T 29. C) ^3H -NMR (533 MHz, DMSO-d_6) von T 29.

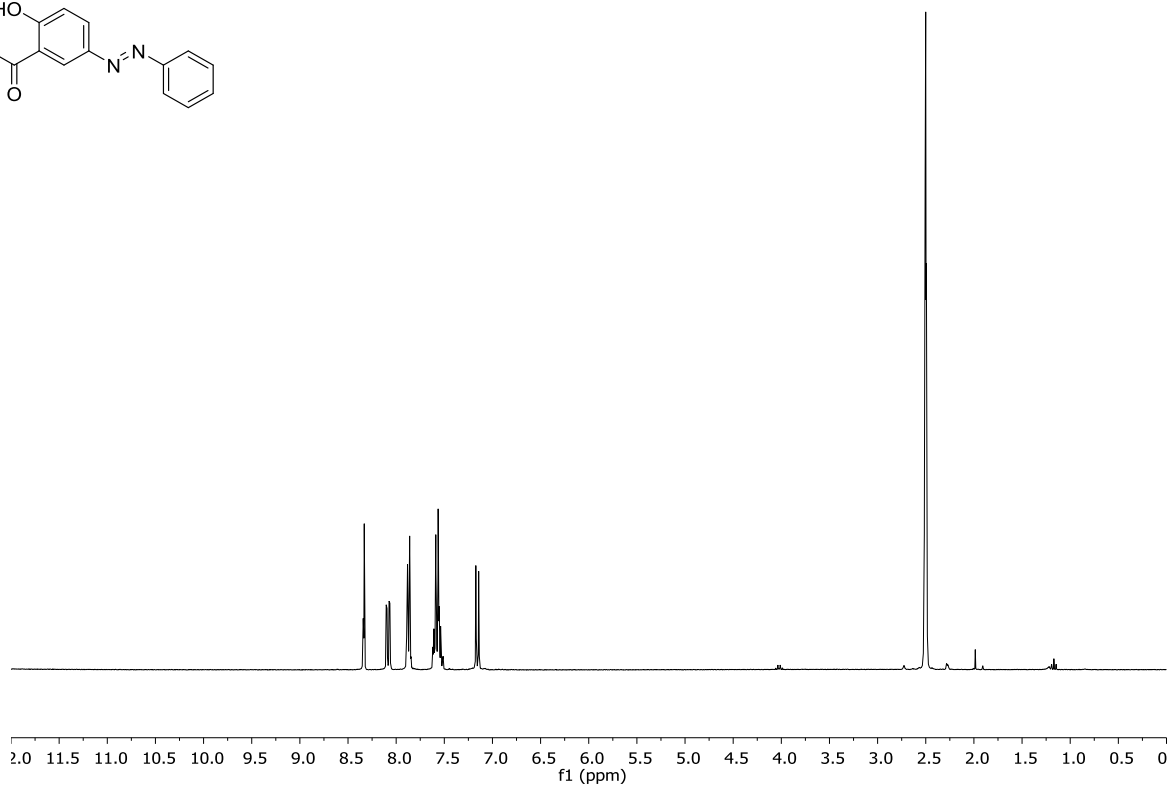
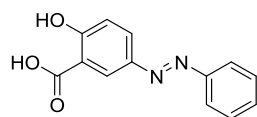


Abbildung 158: ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) von 33.

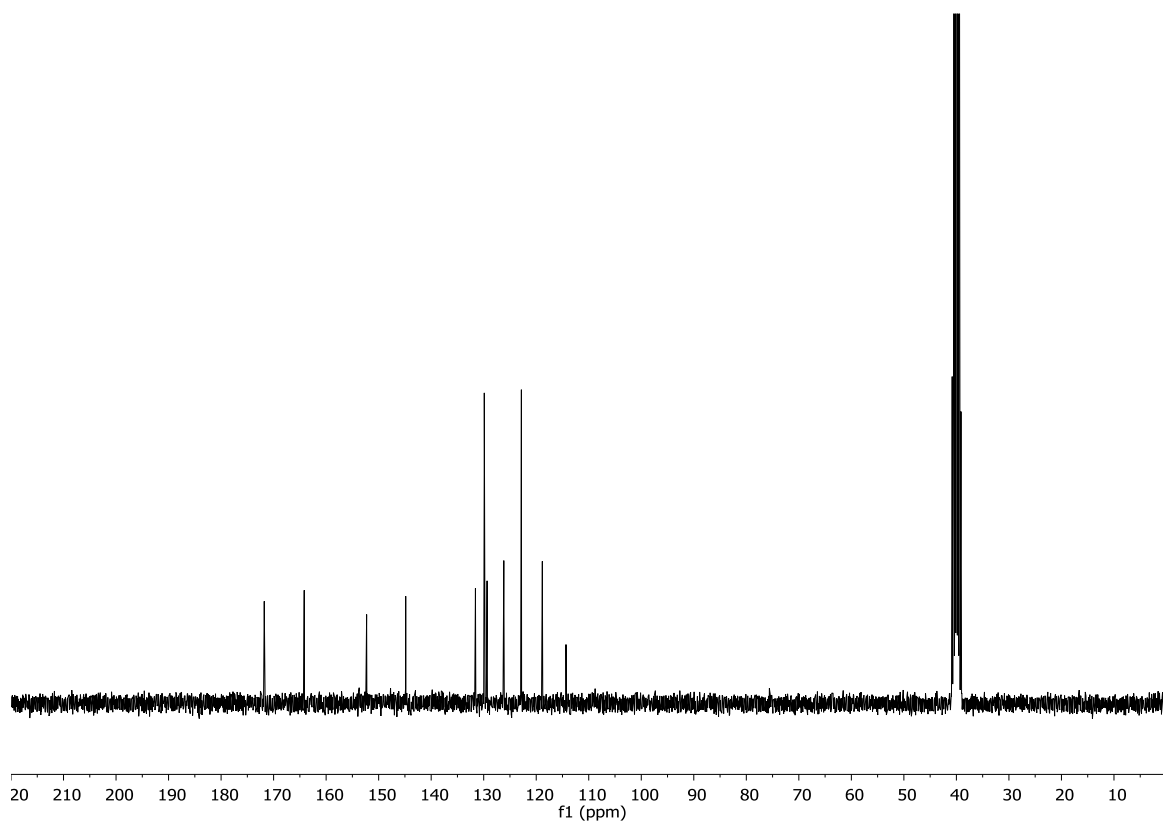


Abbildung 159: ¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) von 33.

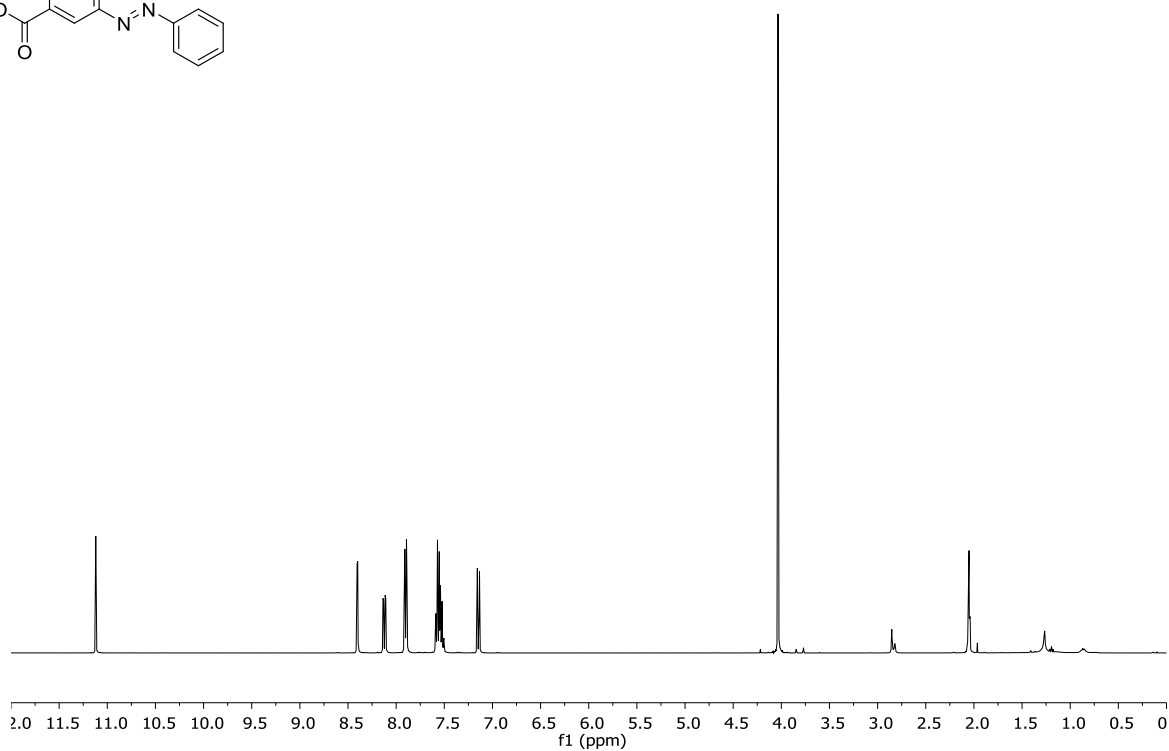
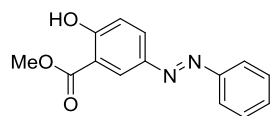


Abbildung 160: ¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆) von 34.

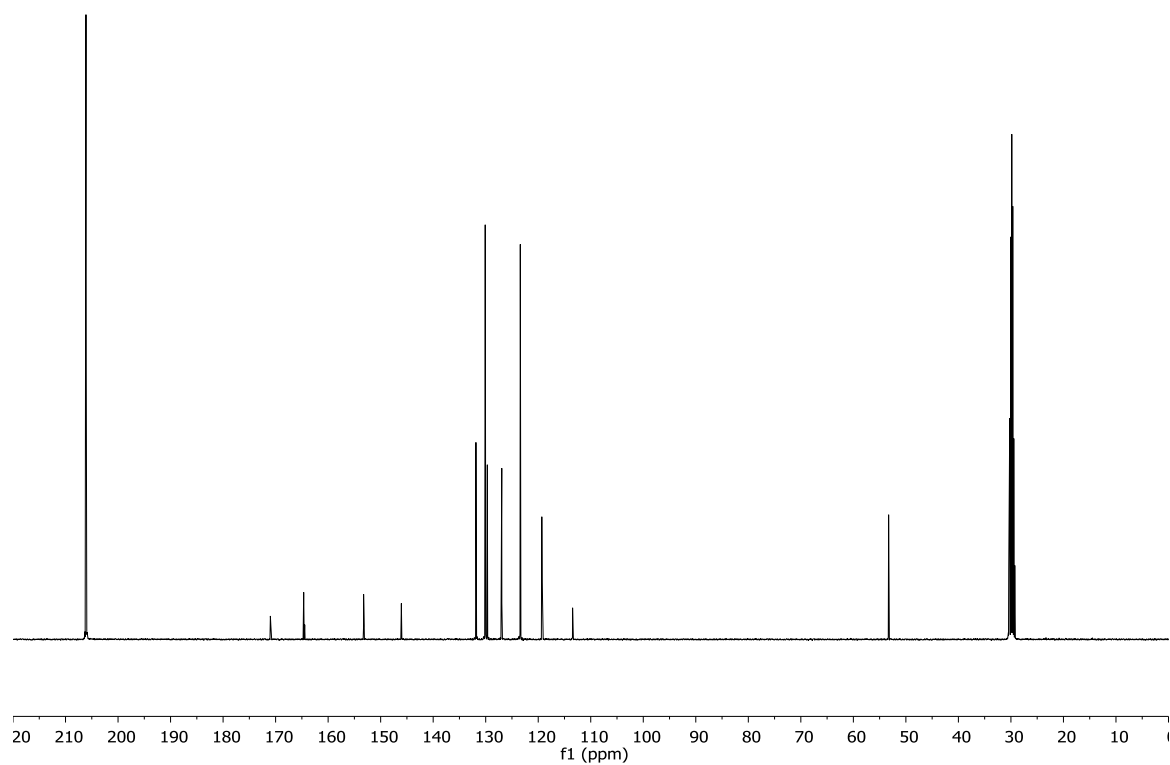


Abbildung 161: ¹³C-NMR (100.6 MHz, Aceton-d₆) von 34.

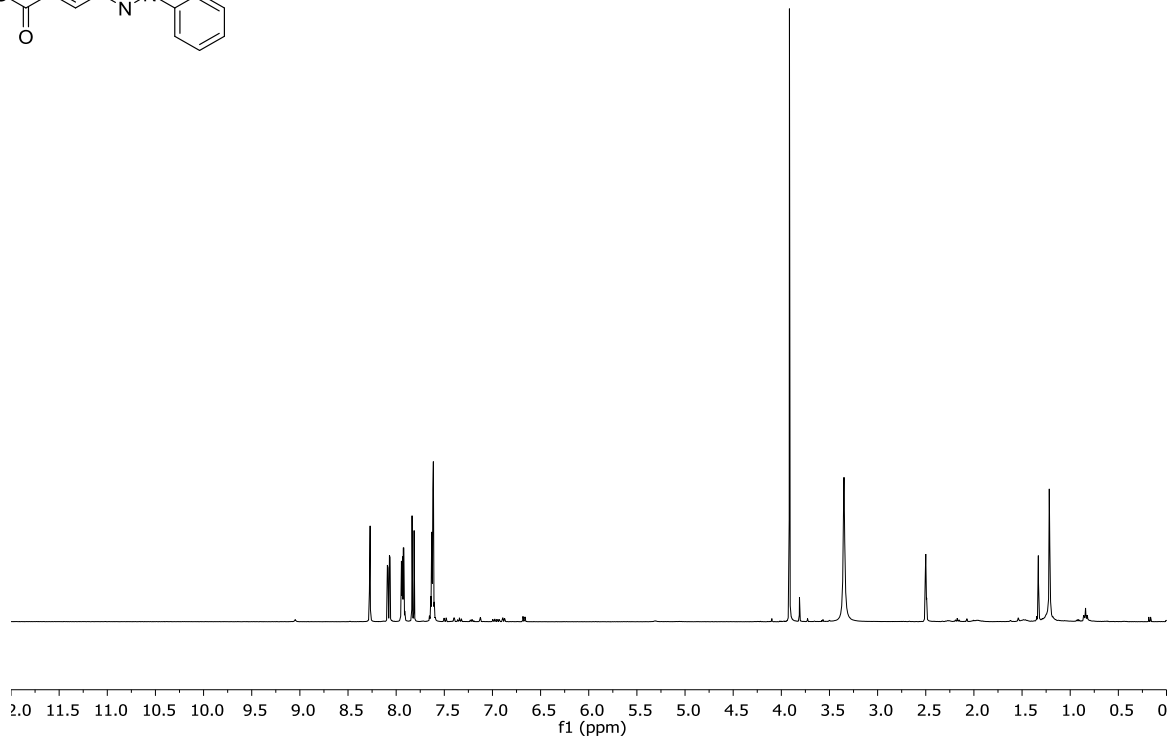
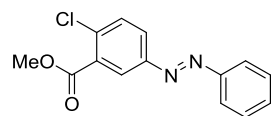


Abbildung 162: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) von 35.

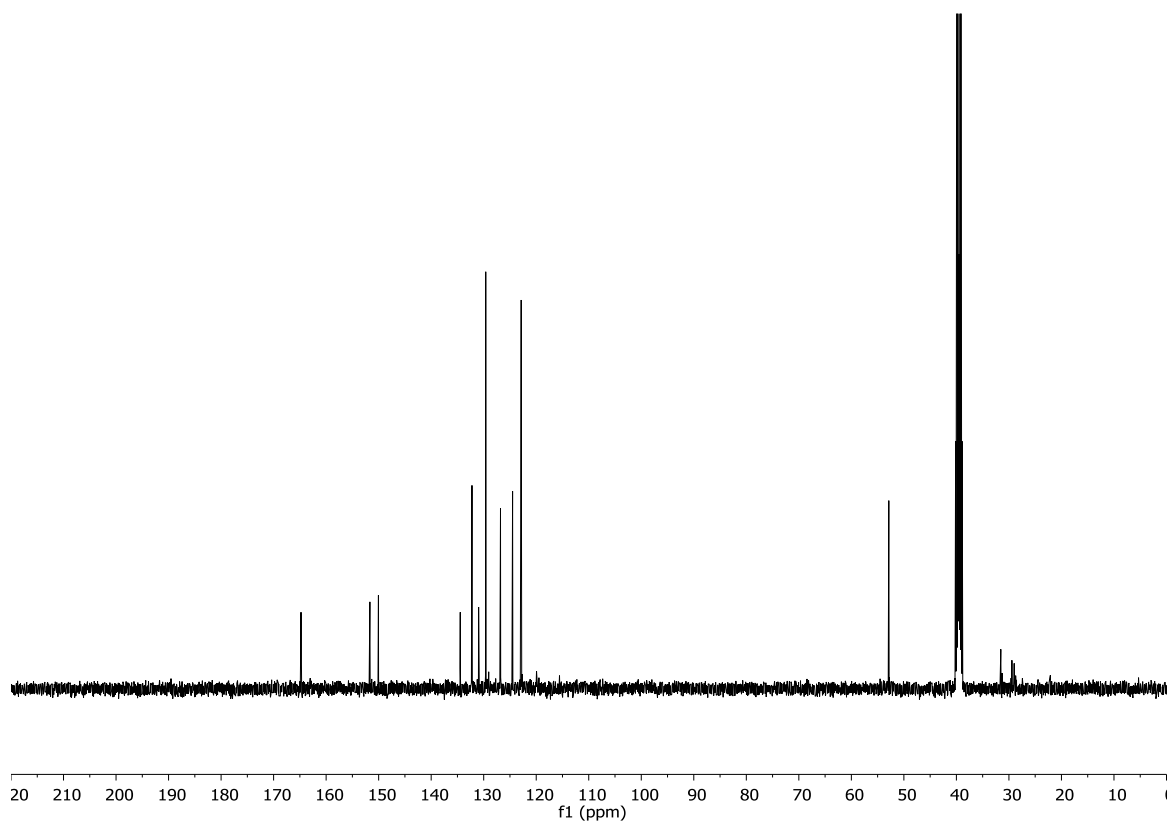
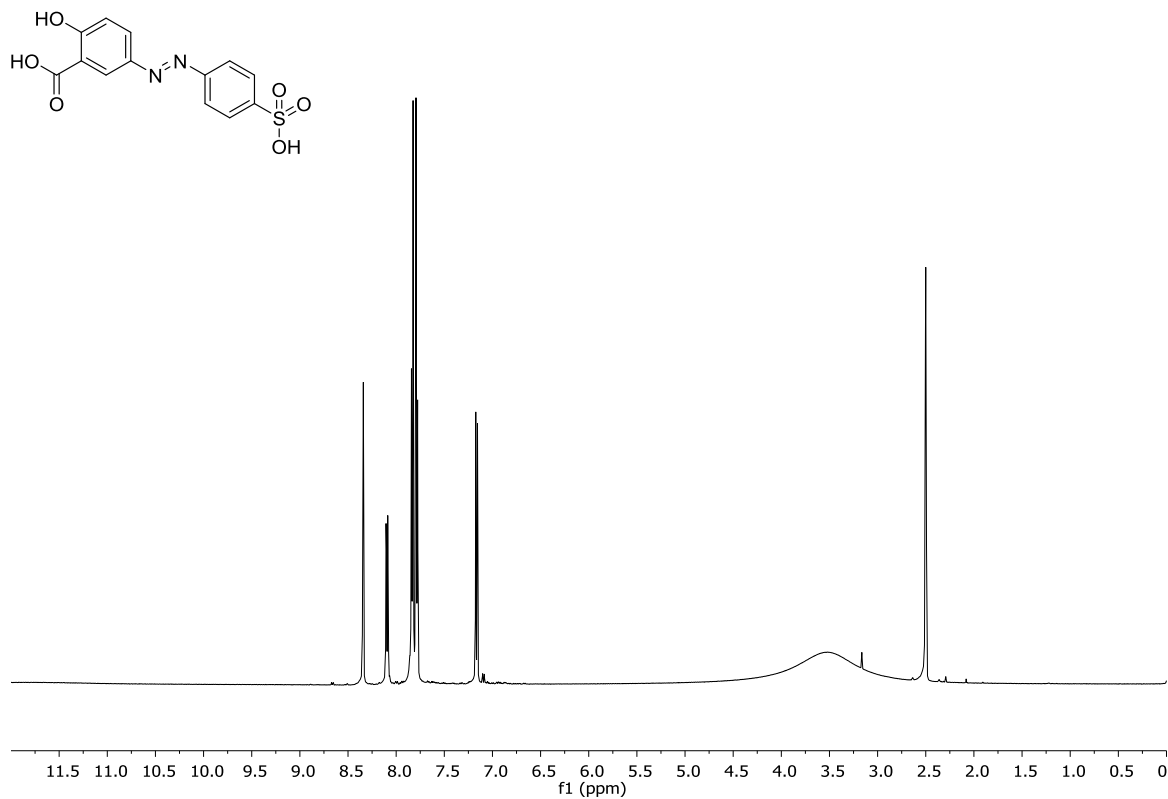
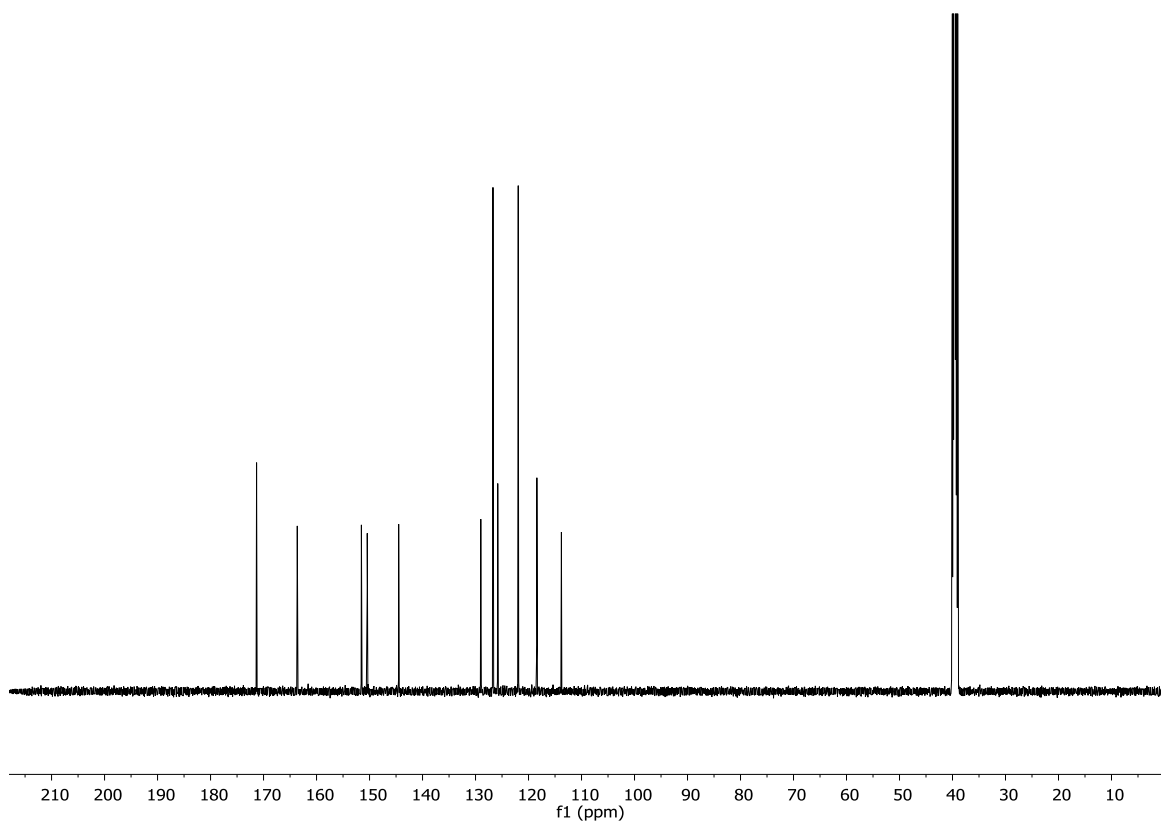


Abbildung 163: ¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃) von 35.

Abbildung 164: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) von **36**.Abbildung 165: $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO-d_6) von **36**.

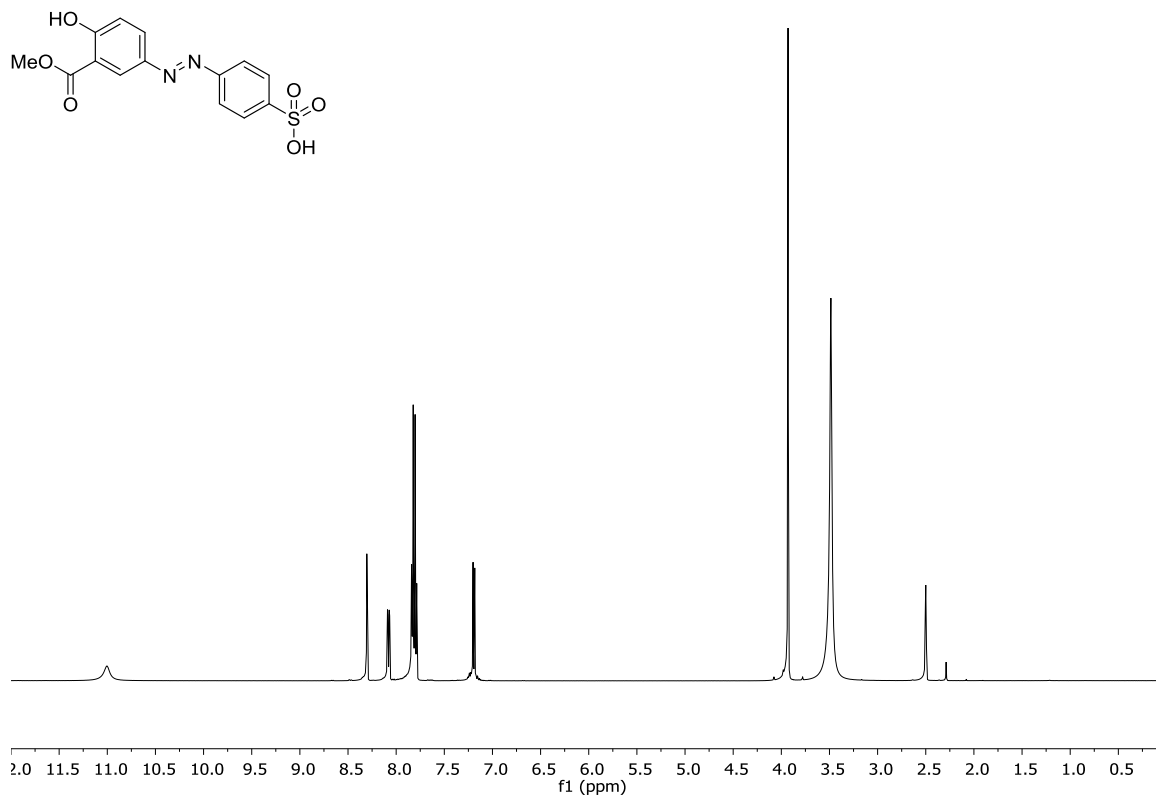


Abbildung 166: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) von **38**.

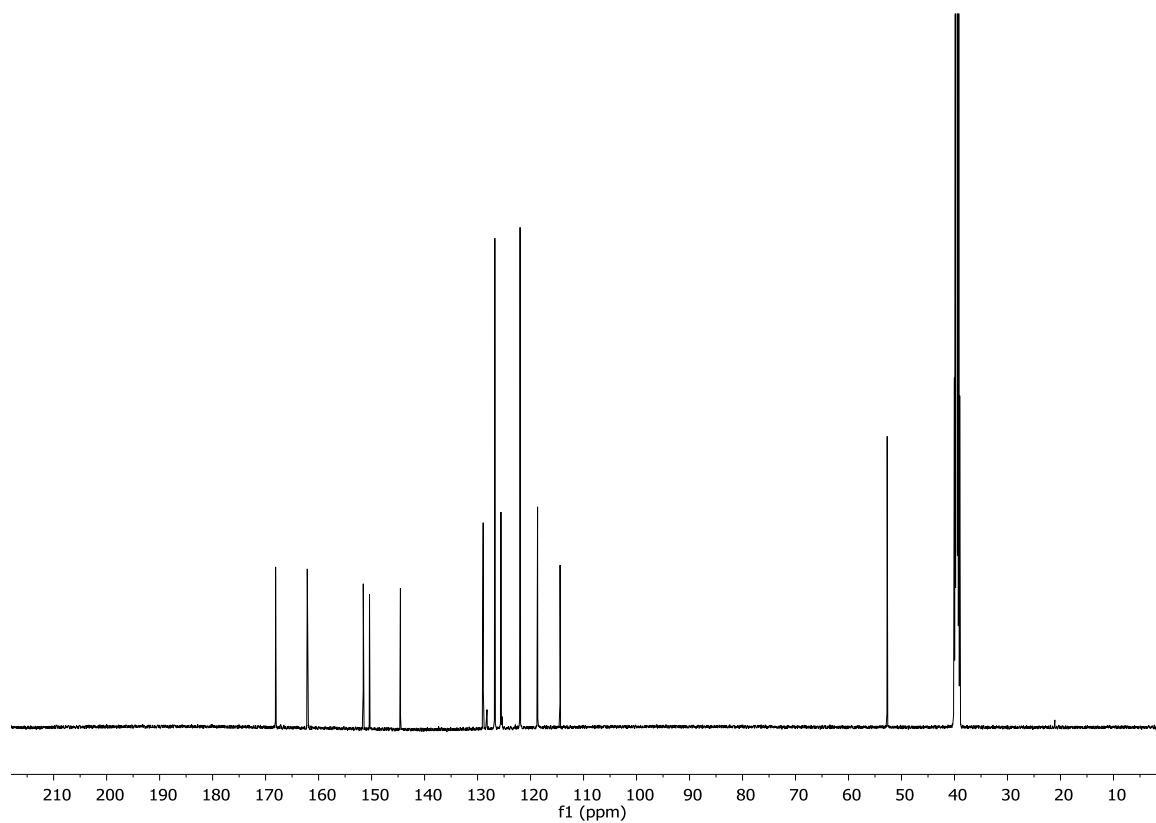


Abbildung 167: $^{13}\text{C-NMR}$ (125.6 MHz, DMSO-d_6) von **38**.

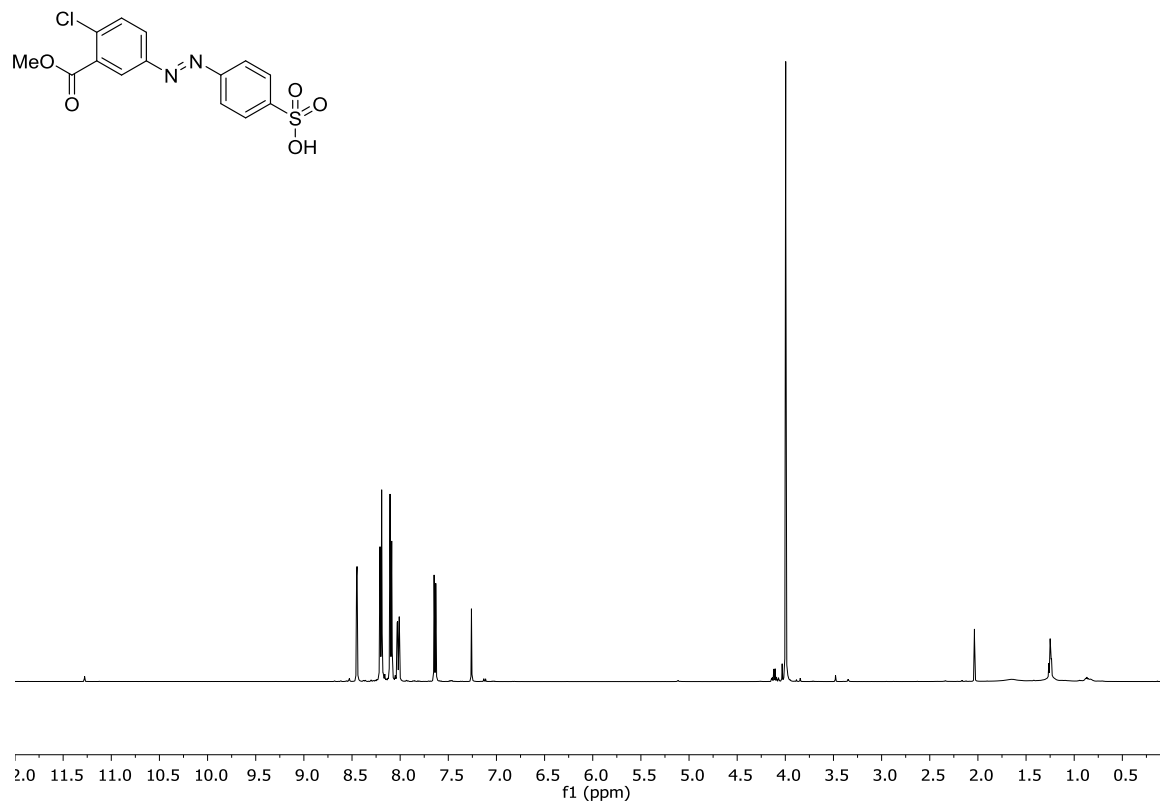


Abbildung 168: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) von **40**.

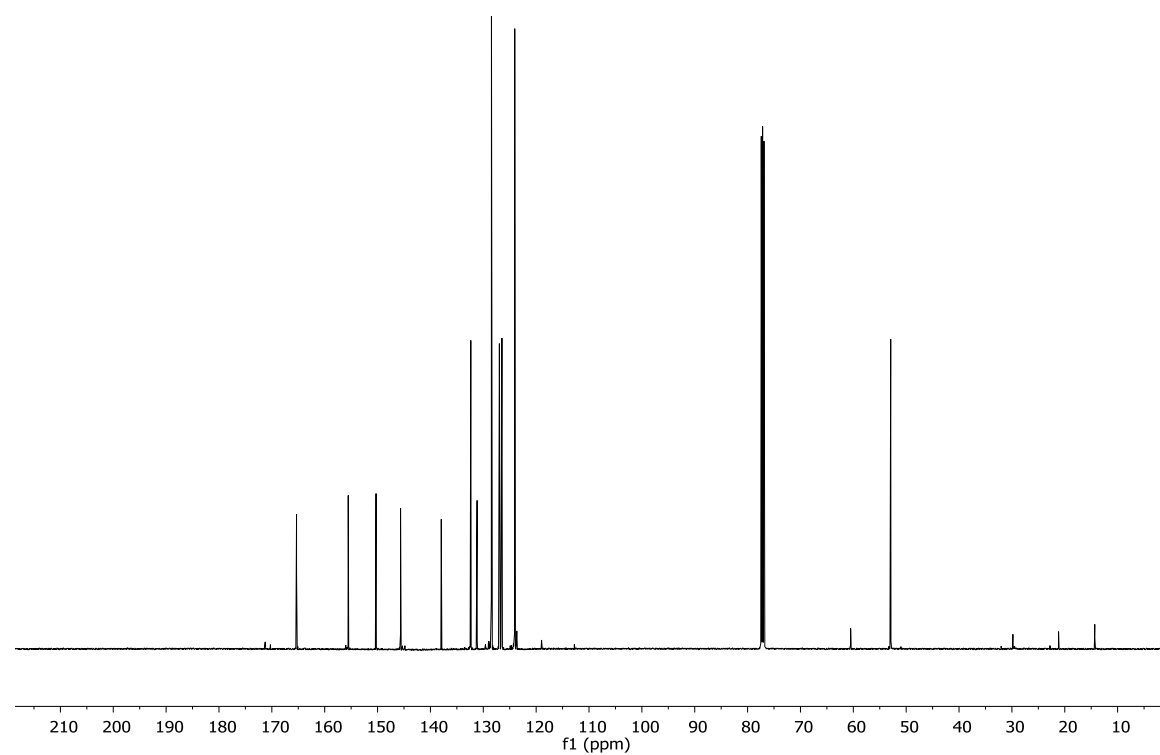


Abbildung 169: ^{13}C -NMR (125.6 MHz, CDCl_3) von **40**.

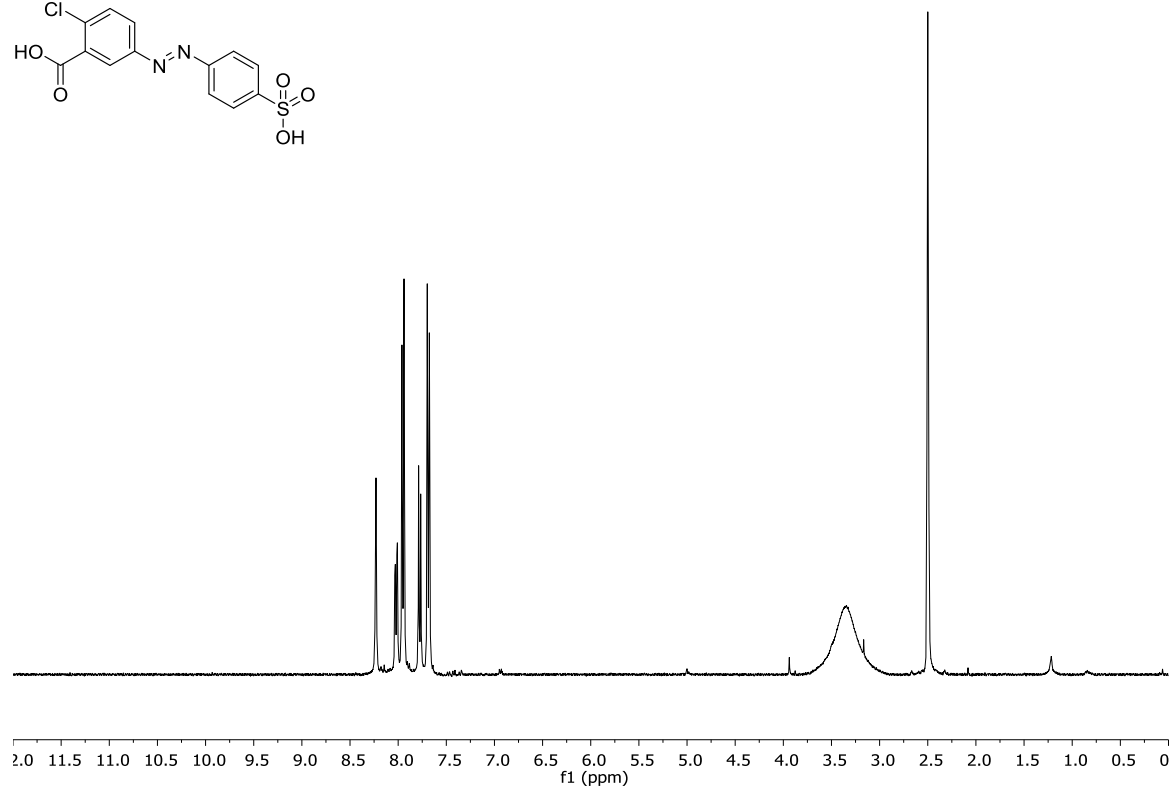
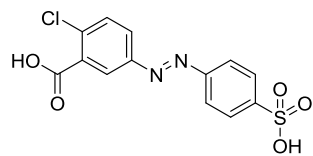


Abbildung 170: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) von **41**.

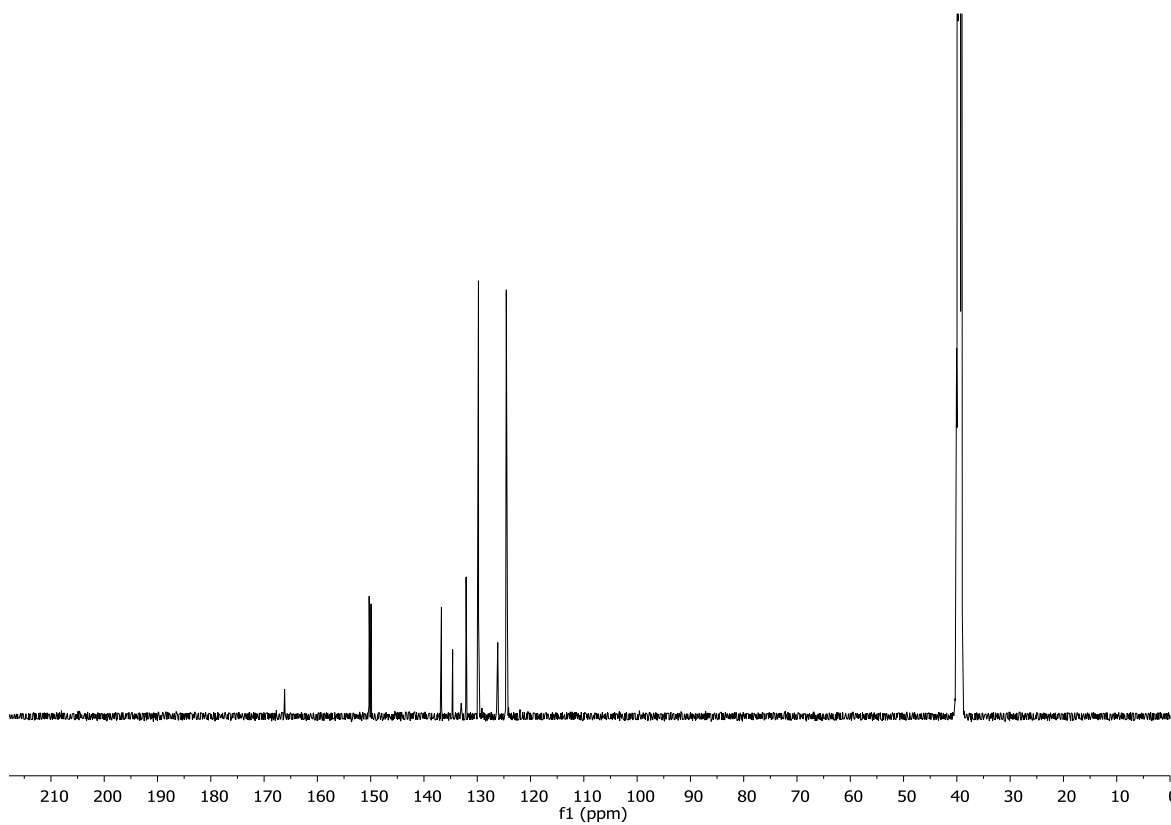
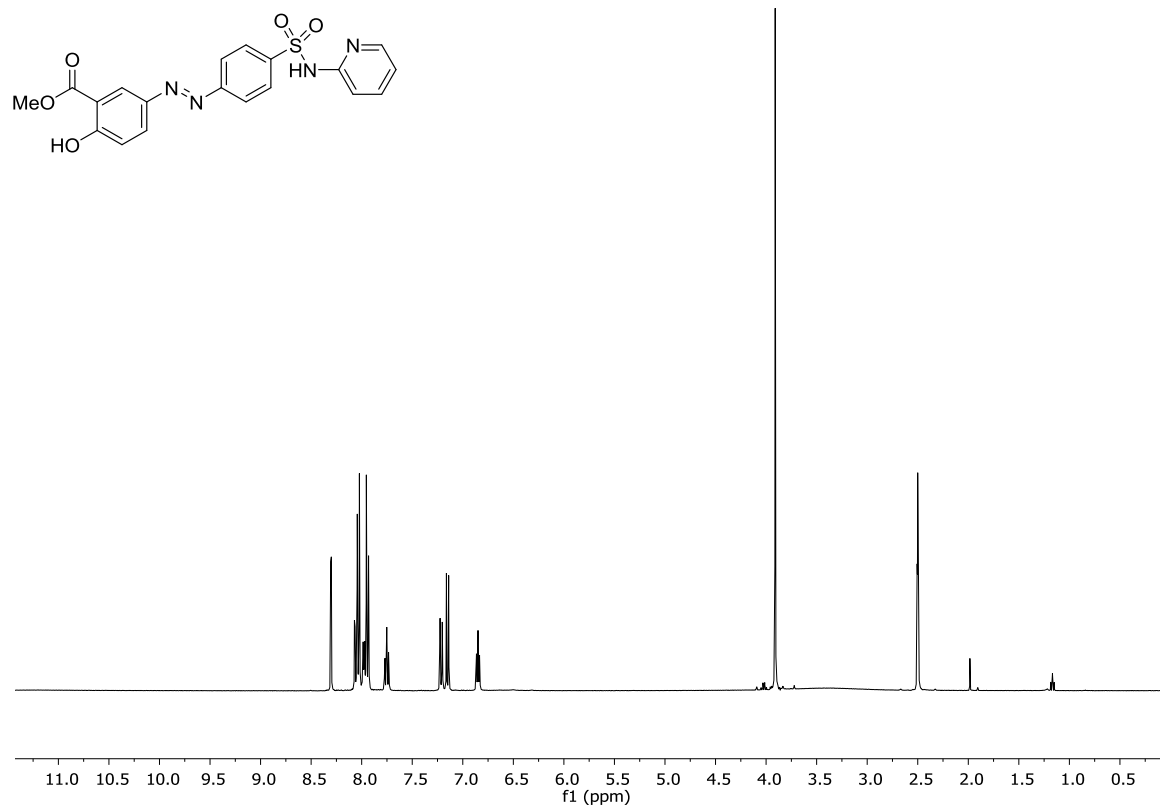
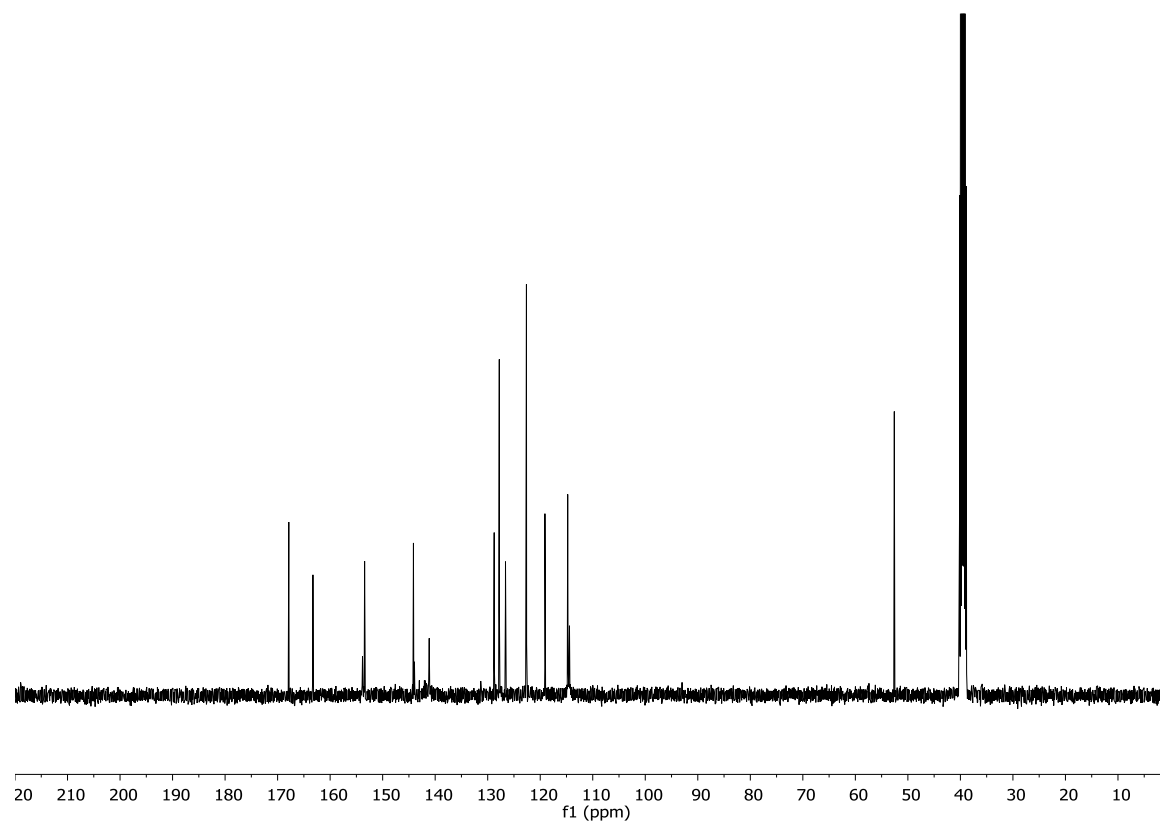


Abbildung 171: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO-d_6) von **41**.

Abbildung 172: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) von 42.Abbildung 173: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO-d_6) von 42.

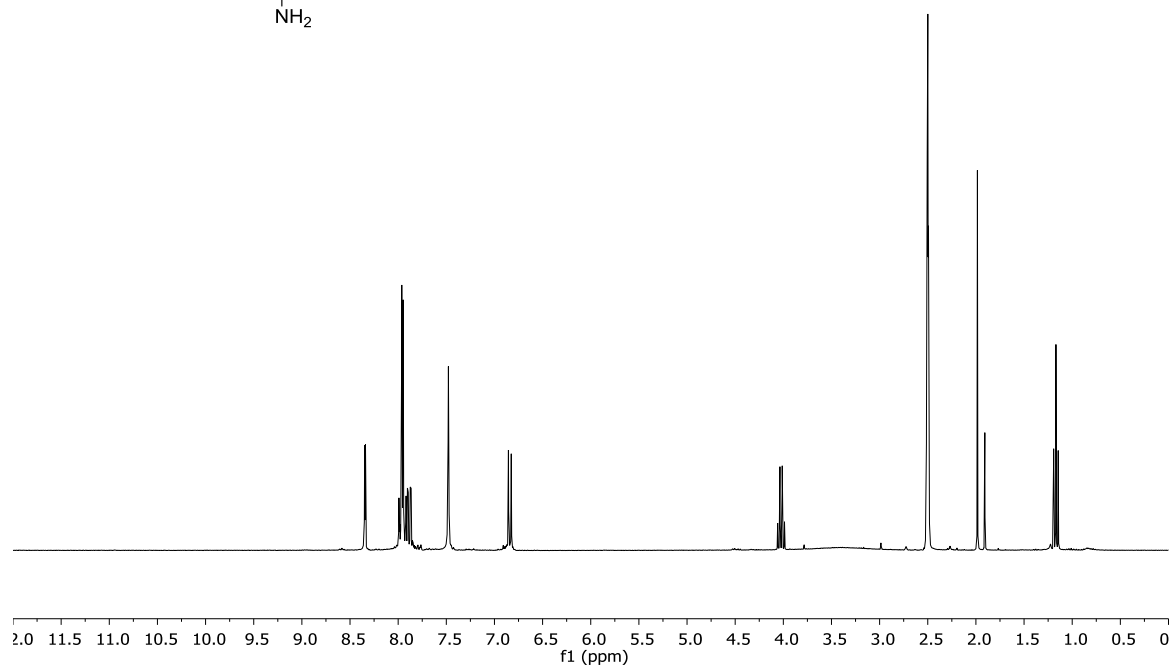
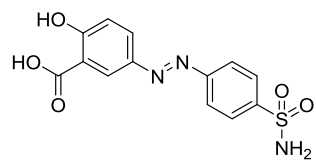


Abbildung 174: ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) von 47.

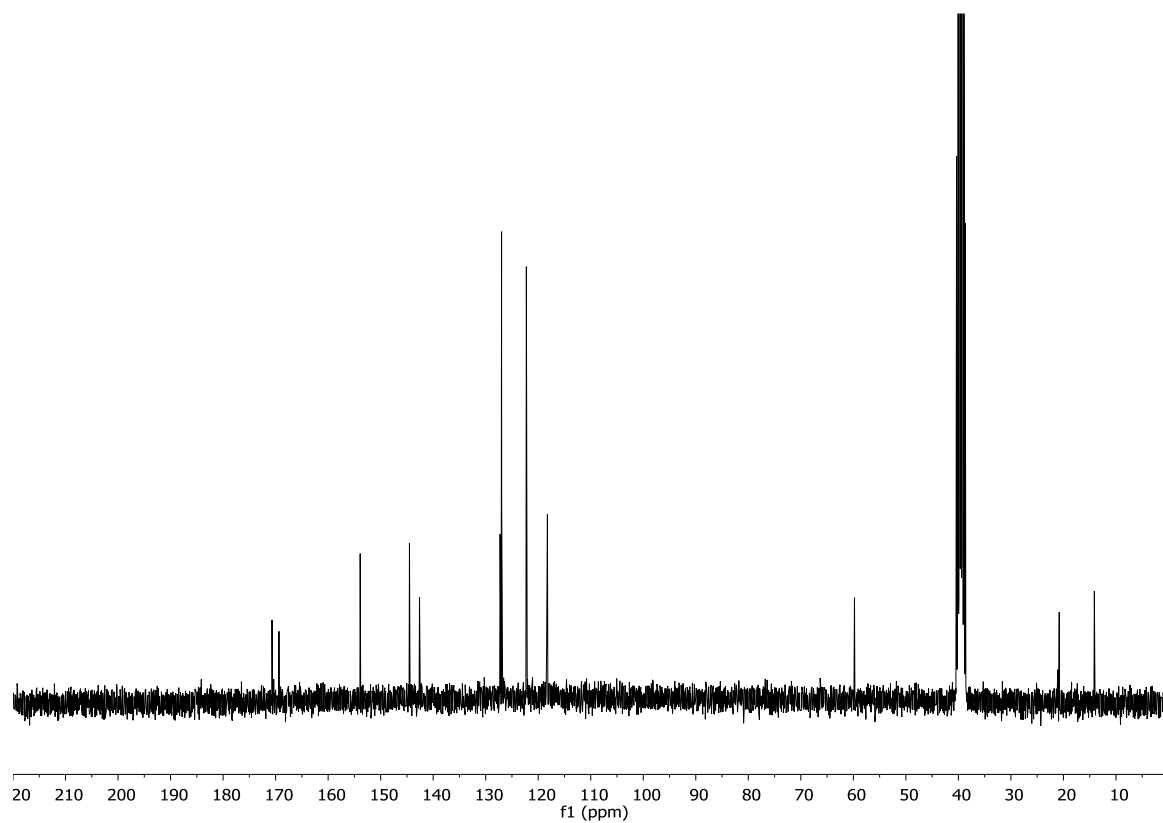


Abbildung 175: ¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆) von 47.

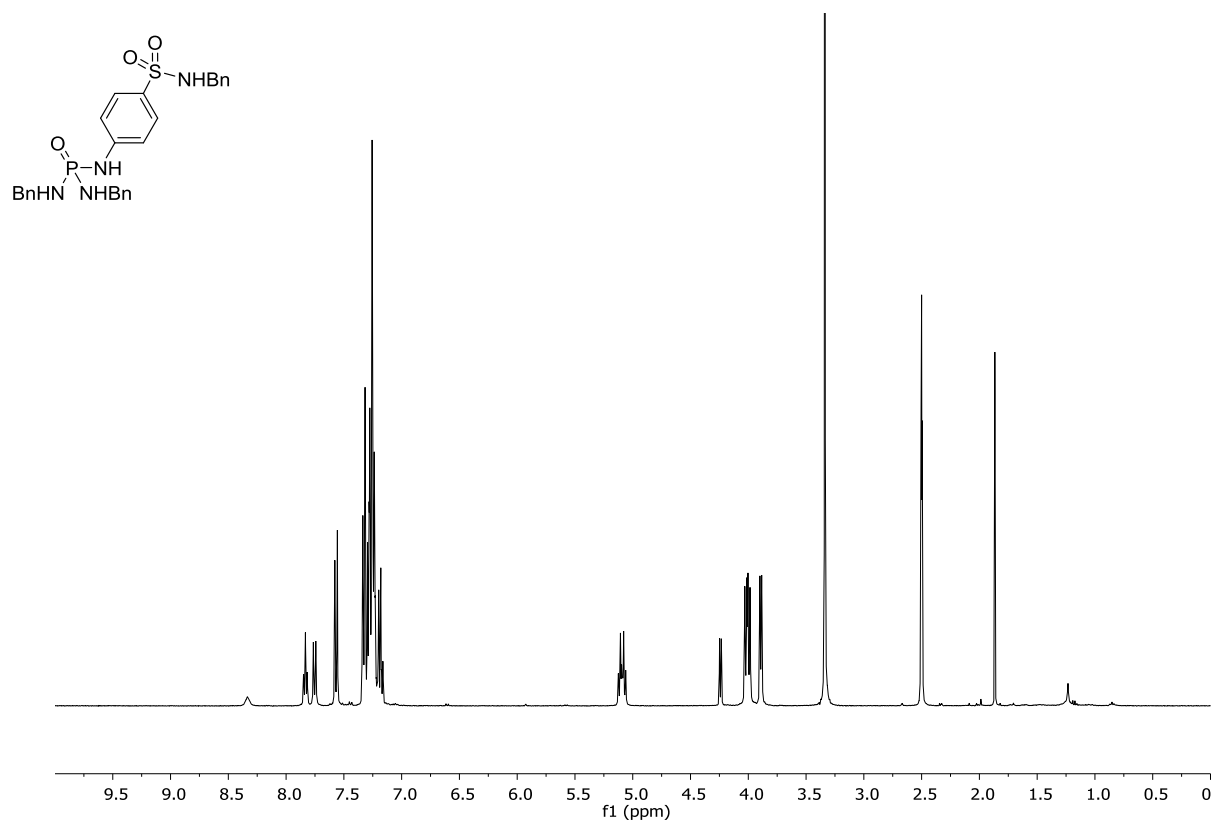


Abbildung 176: ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von 52.

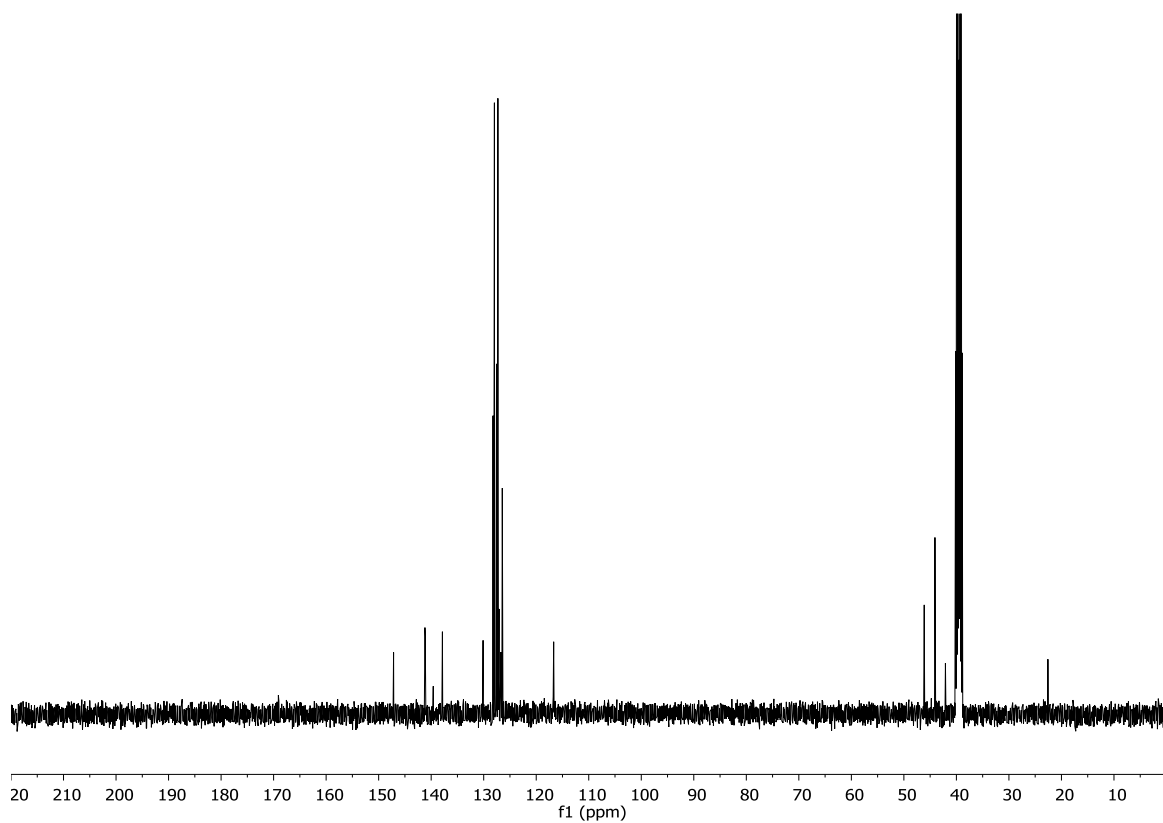


Abbildung 177: ^{13}C -NMR (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von 52.

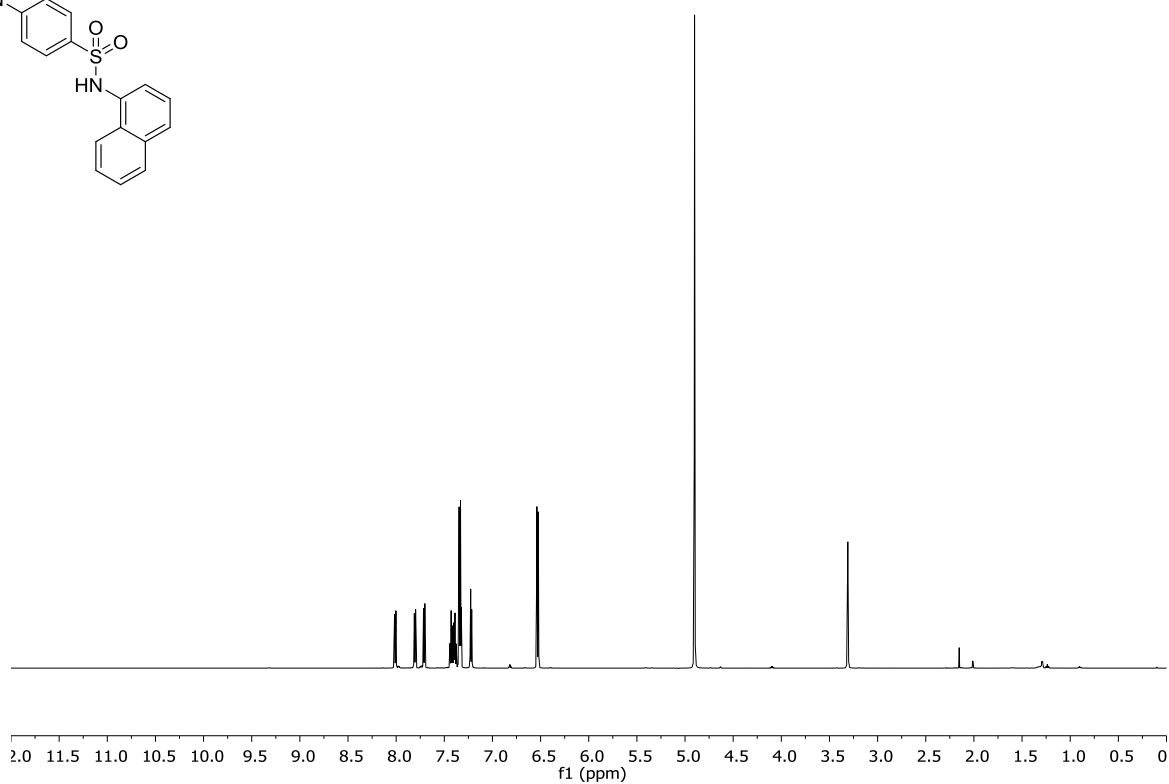
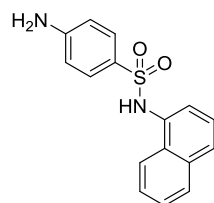


Abbildung 178: ^1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) von 57.

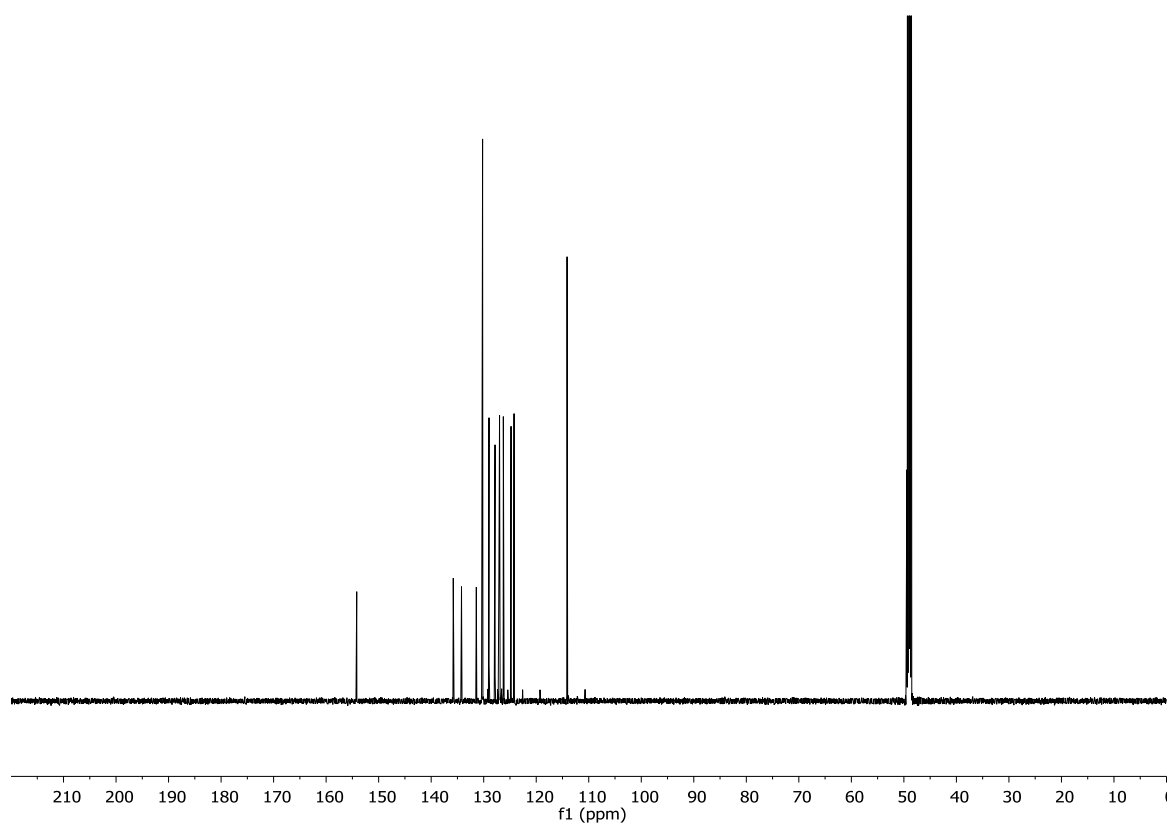


Abbildung 179: ^{13}C -NMR (150.9 MHz, Methanol- d_4) von 57.

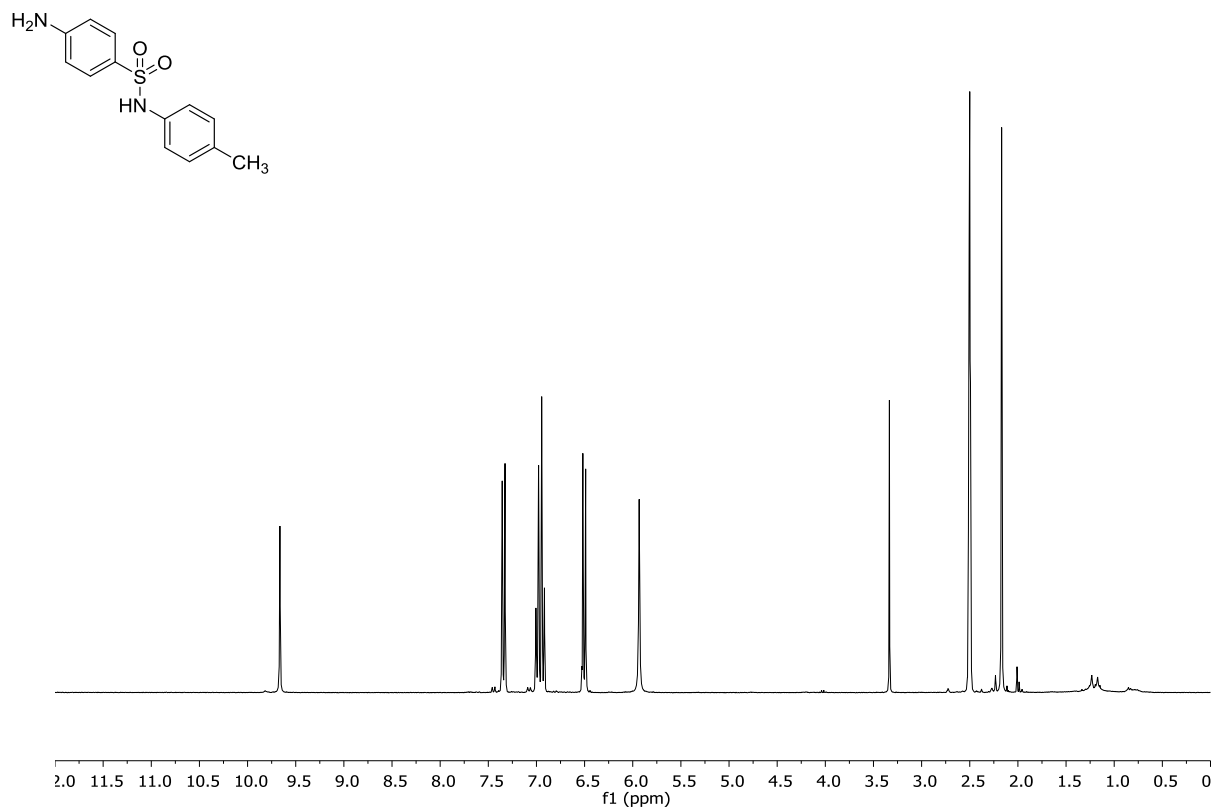


Abbildung 180: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) von **60**.

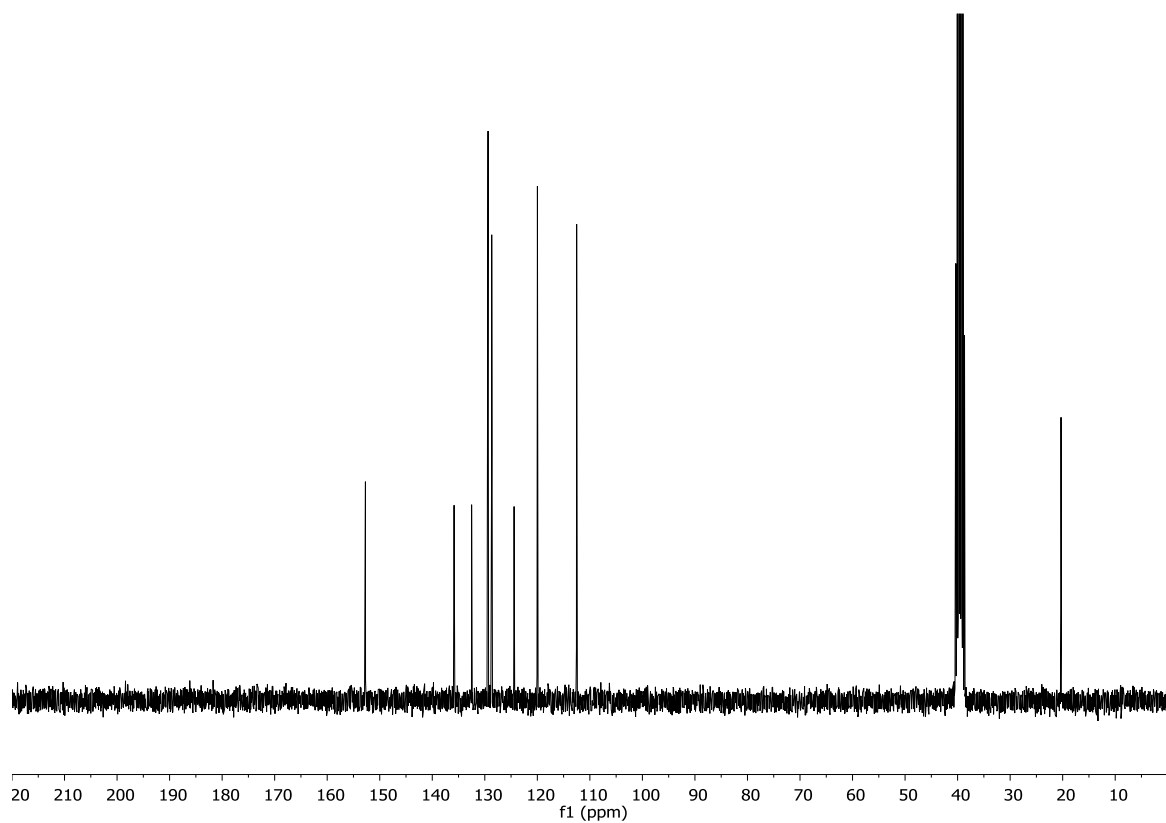


Abbildung 181: $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO-d_6) von **60**.

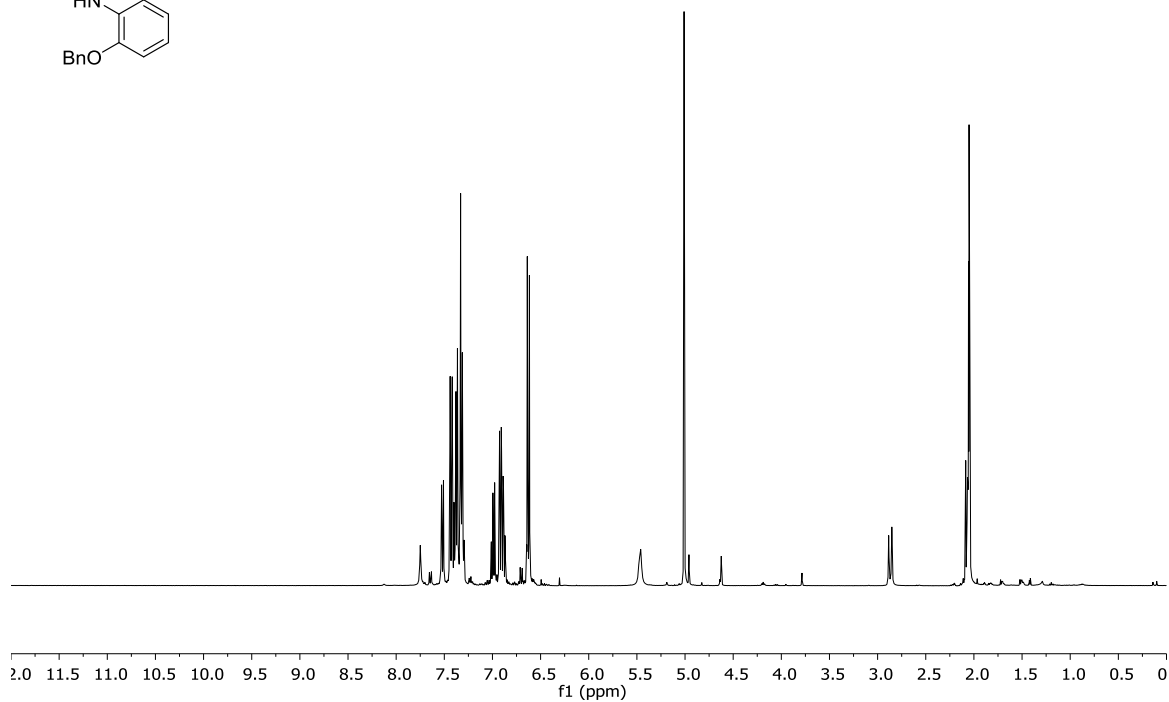
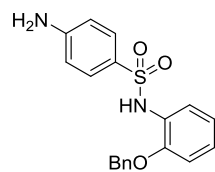


Abbildung 182: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6) von 65.

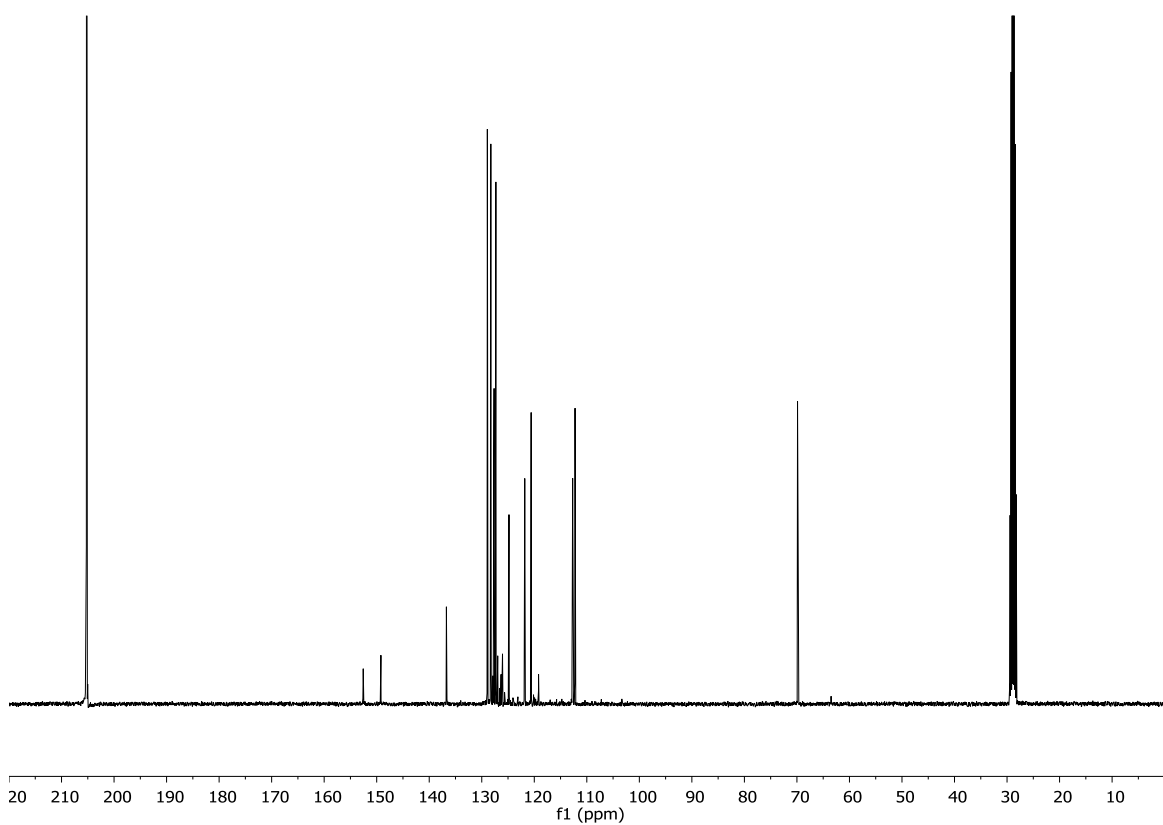
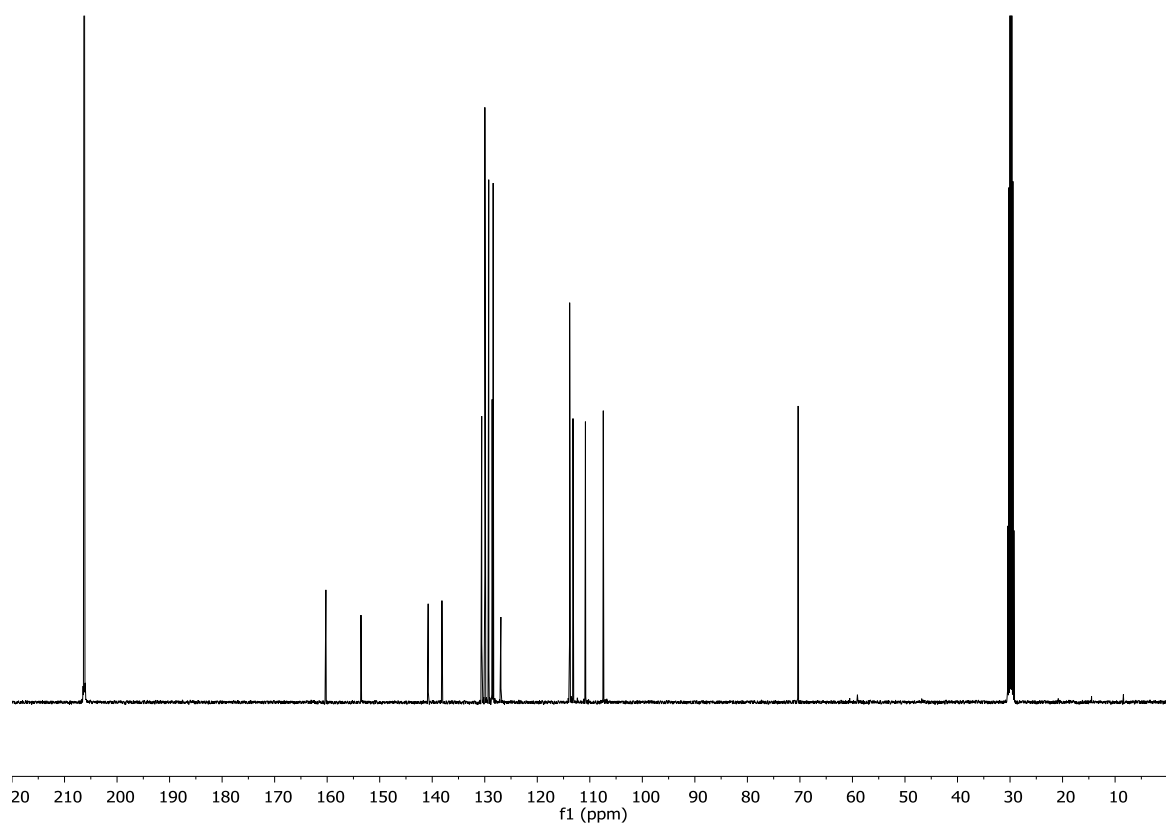
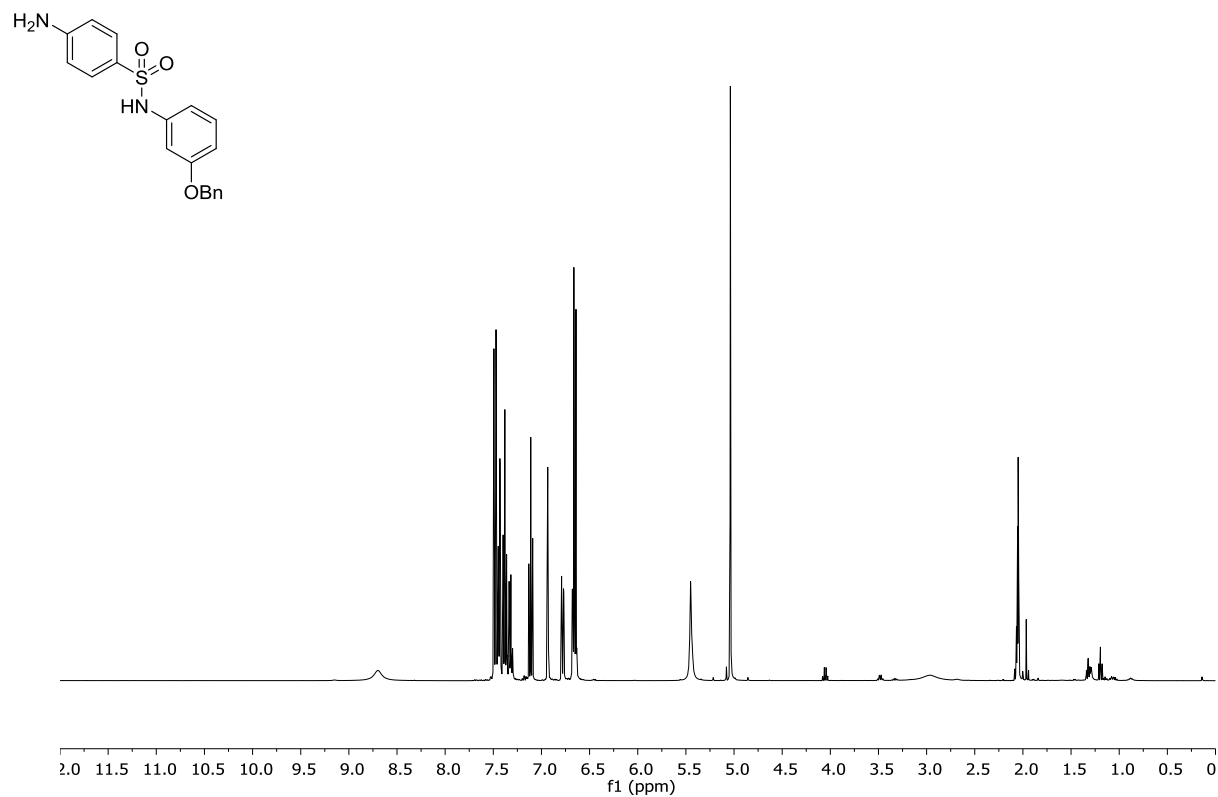


Abbildung 183: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, Aceton- d_6) von 65.



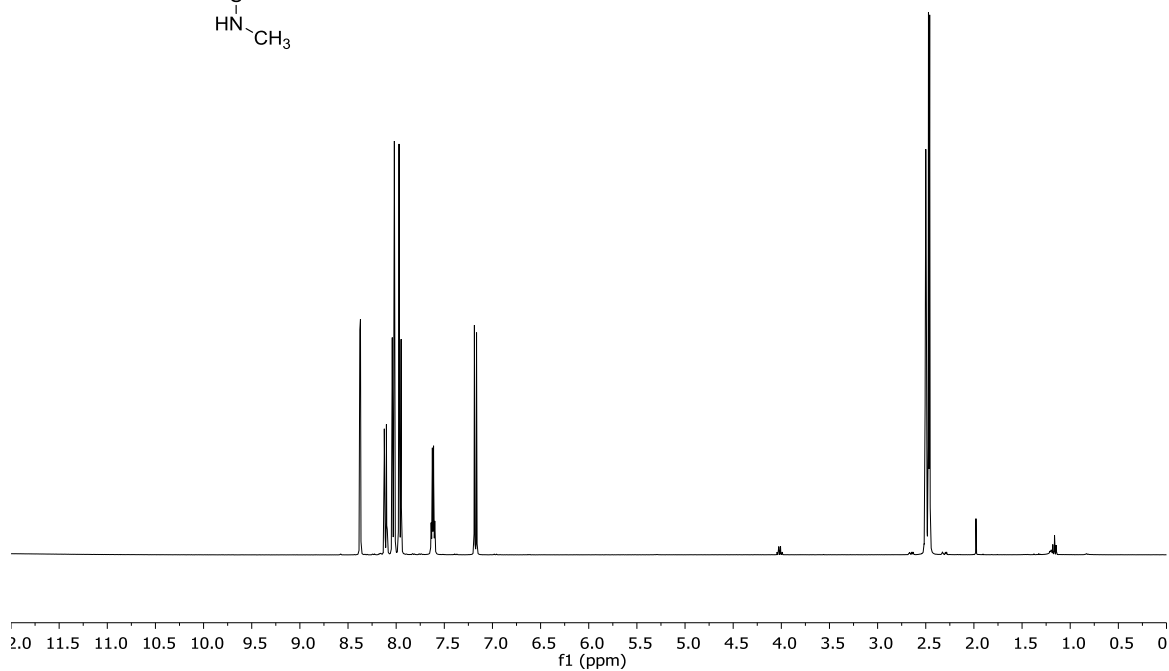
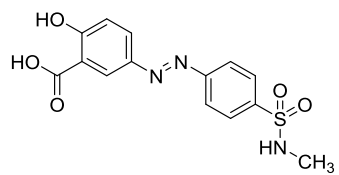


Abbildung 186: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) von **71**.

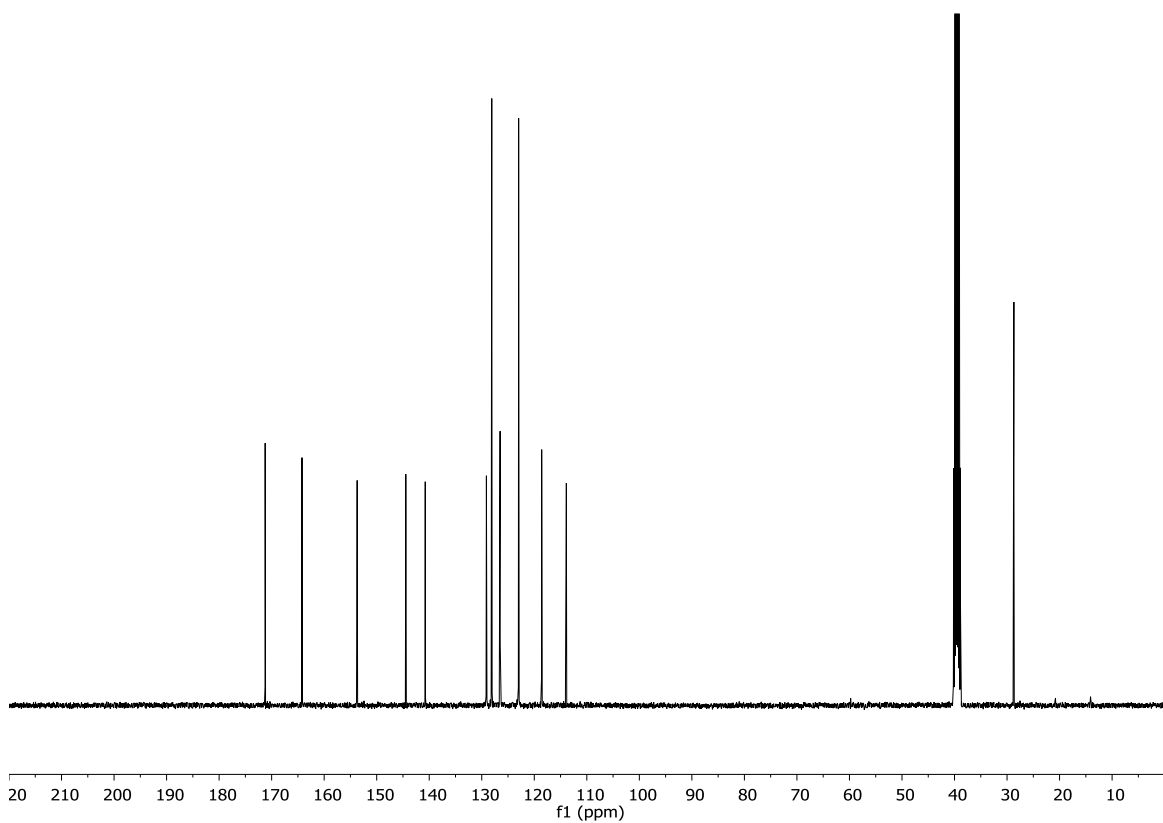
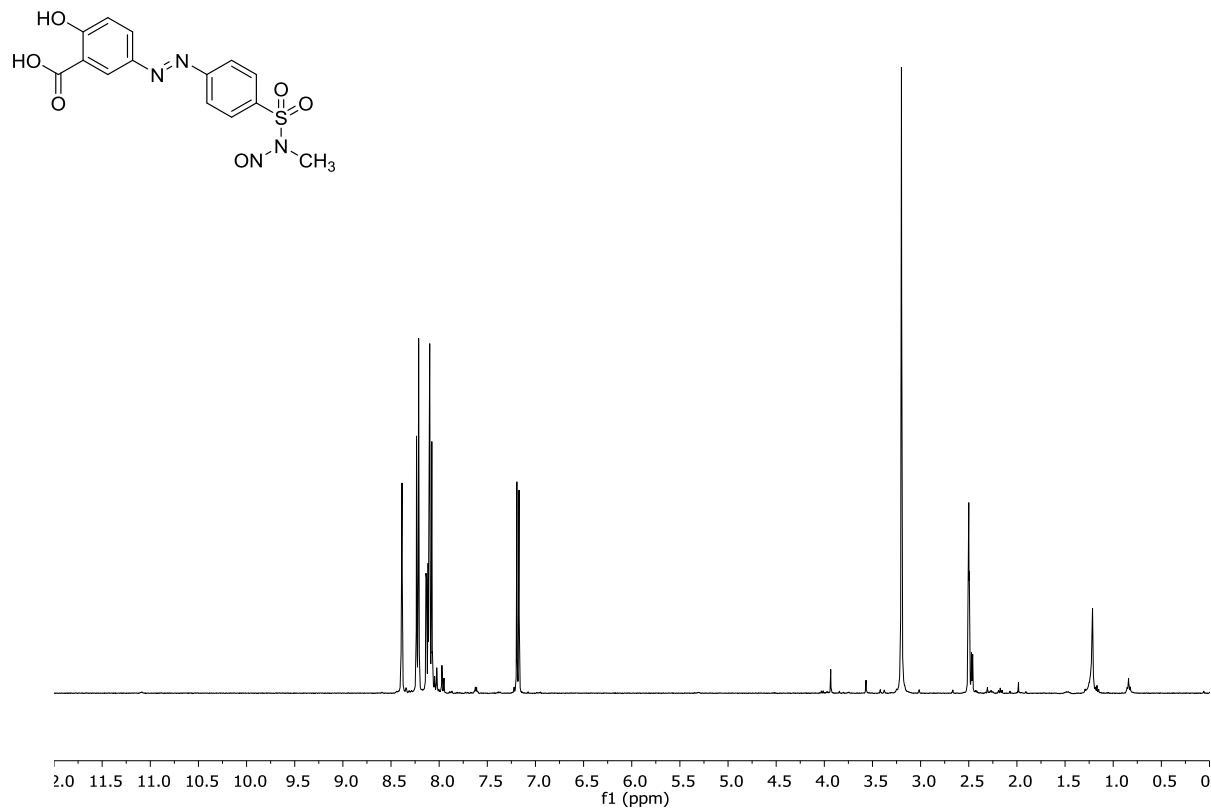
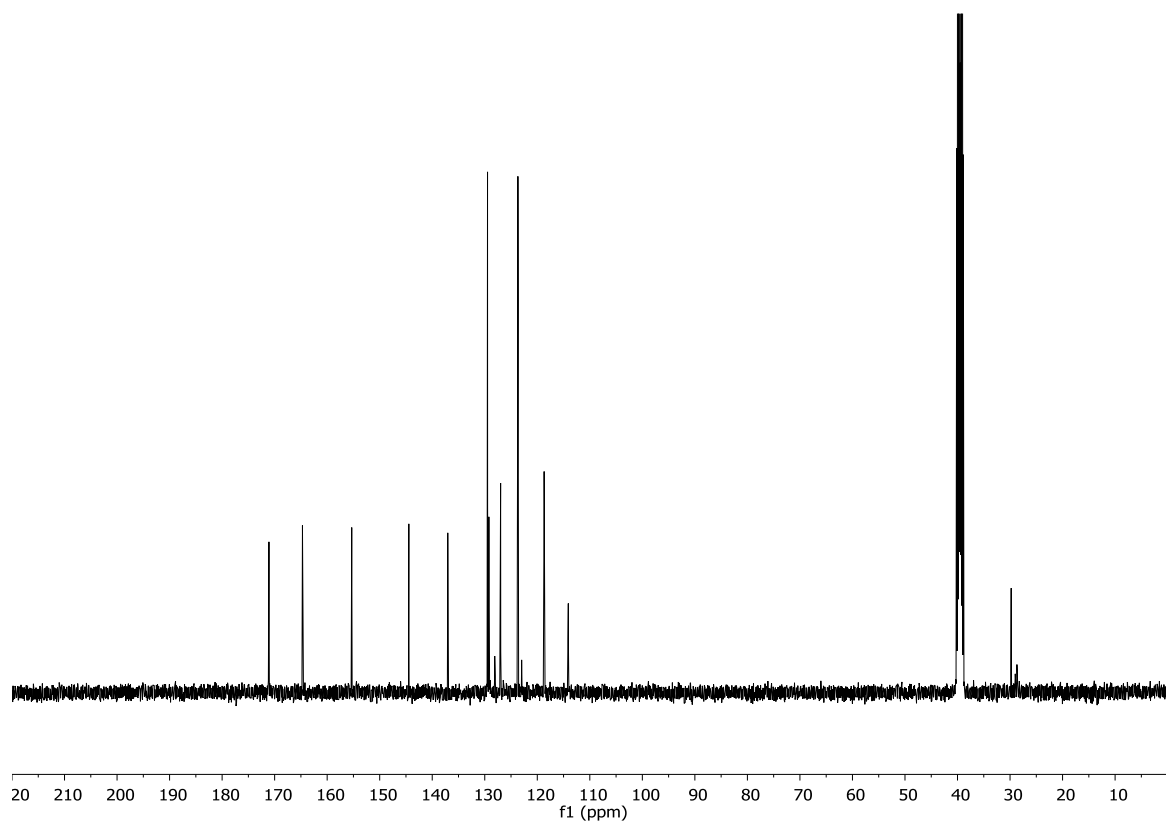


Abbildung 187: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO-d_6) von **71**.

Abbildung 188: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) von 72.Abbildung 189: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO-d_6) von 72.

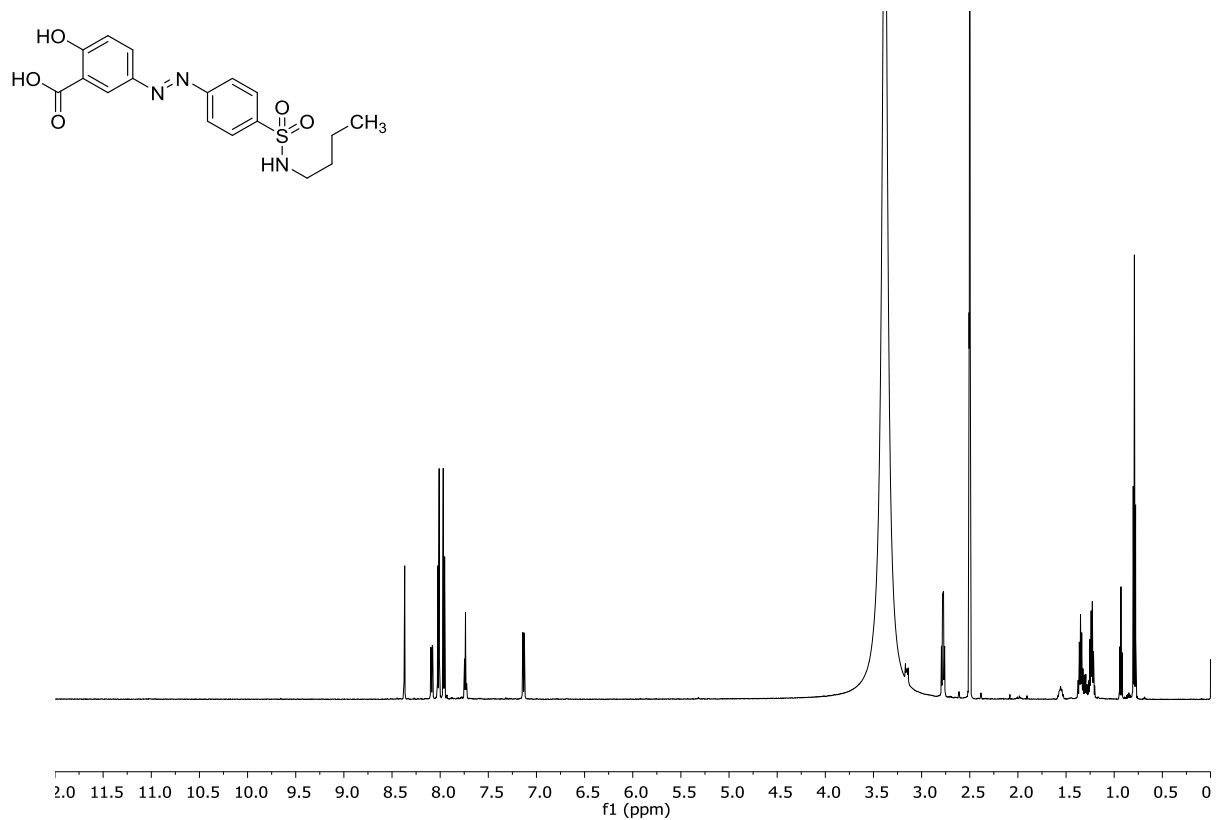


Abbildung 190: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) von 73.

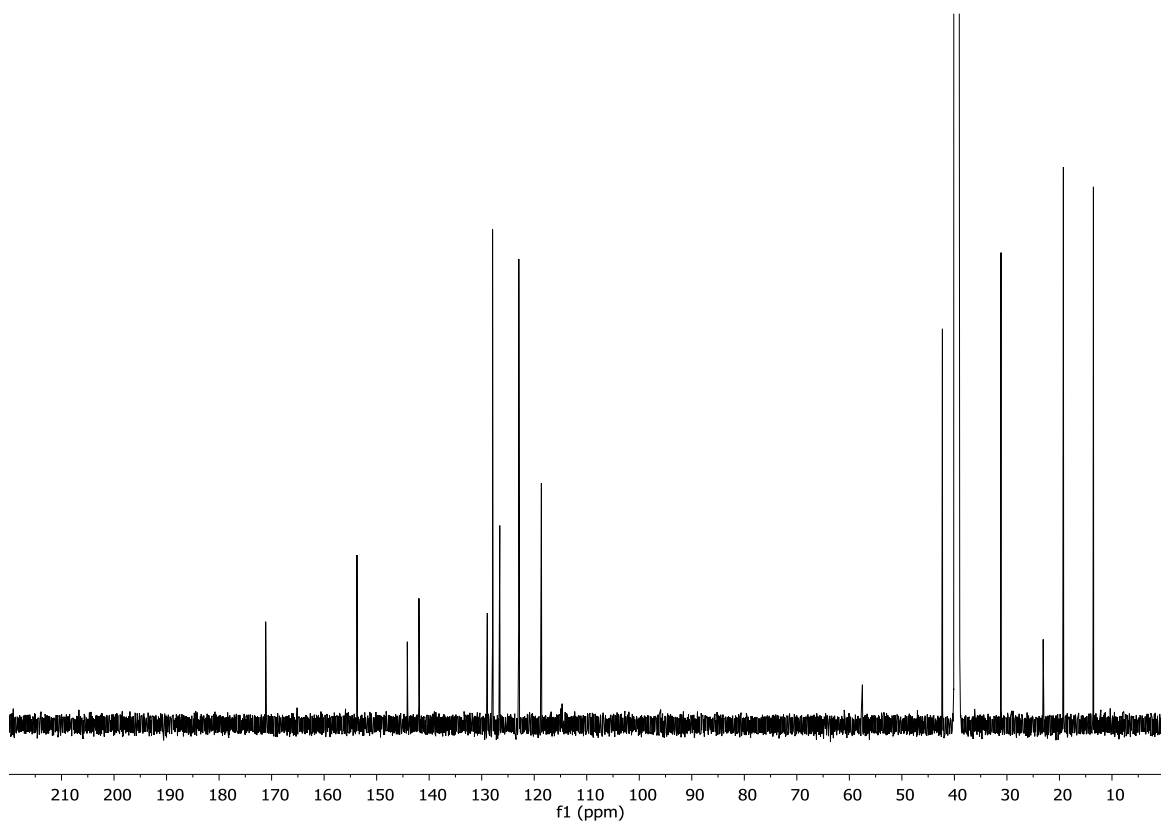
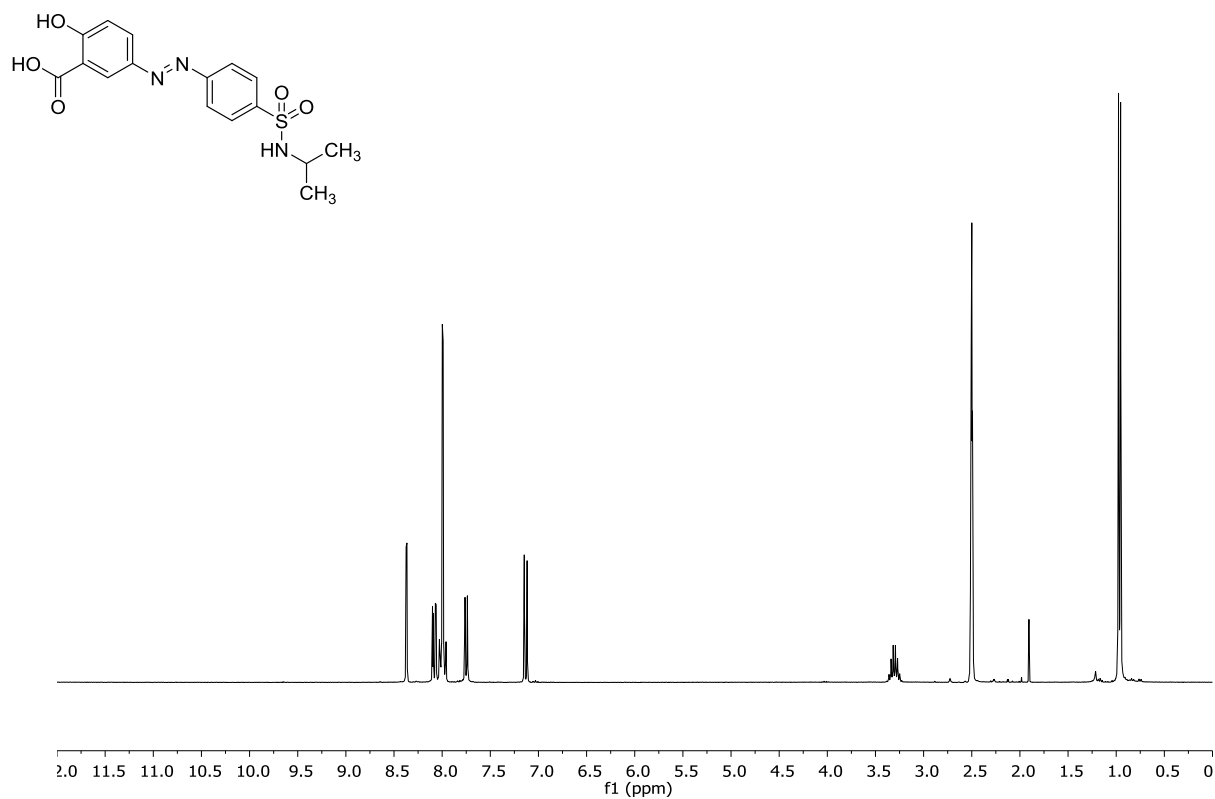
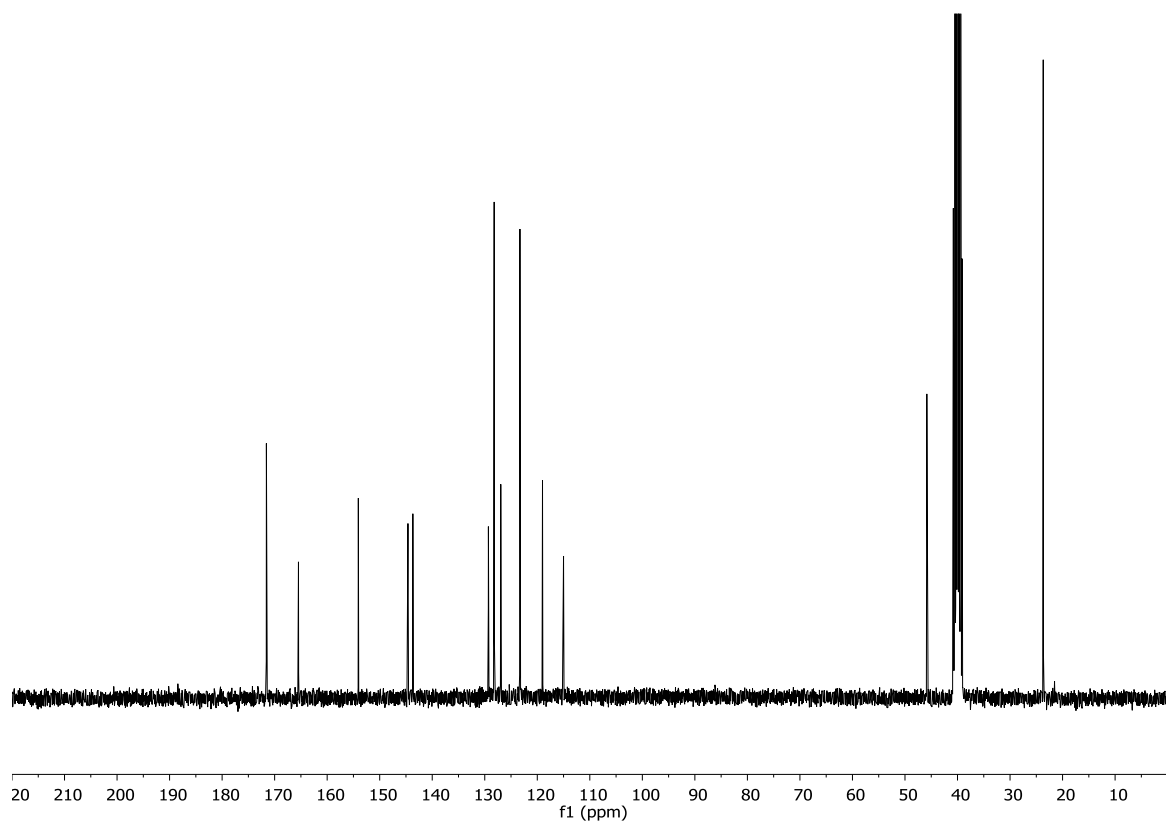


Abbildung 191: $^{13}\text{C-NMR}$ (150.9 MHz, DMSO-d_6) von 73.

Abbildung 192: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) von 74.Abbildung 193: $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO-d_6) von 74.

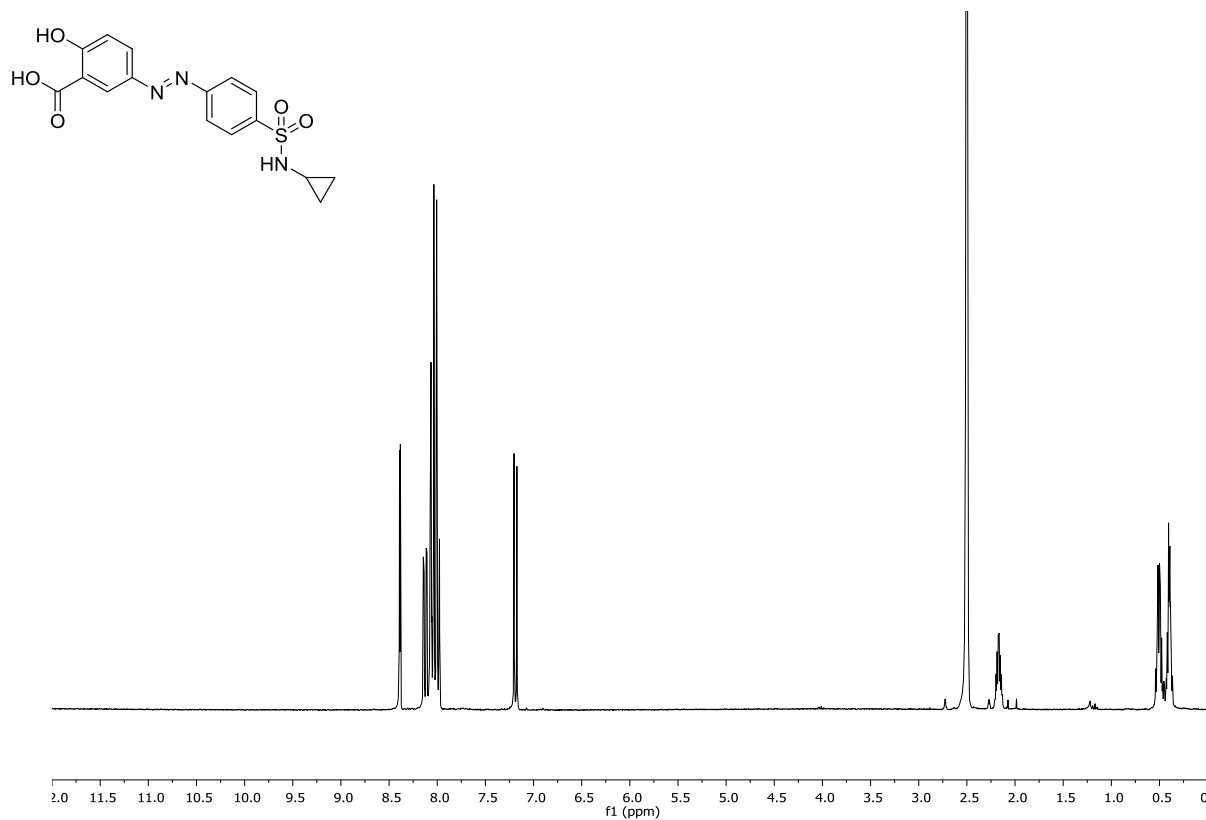


Abbildung 194: ^1H -NMR (300 MHz, DMSO-d_6) von 75.

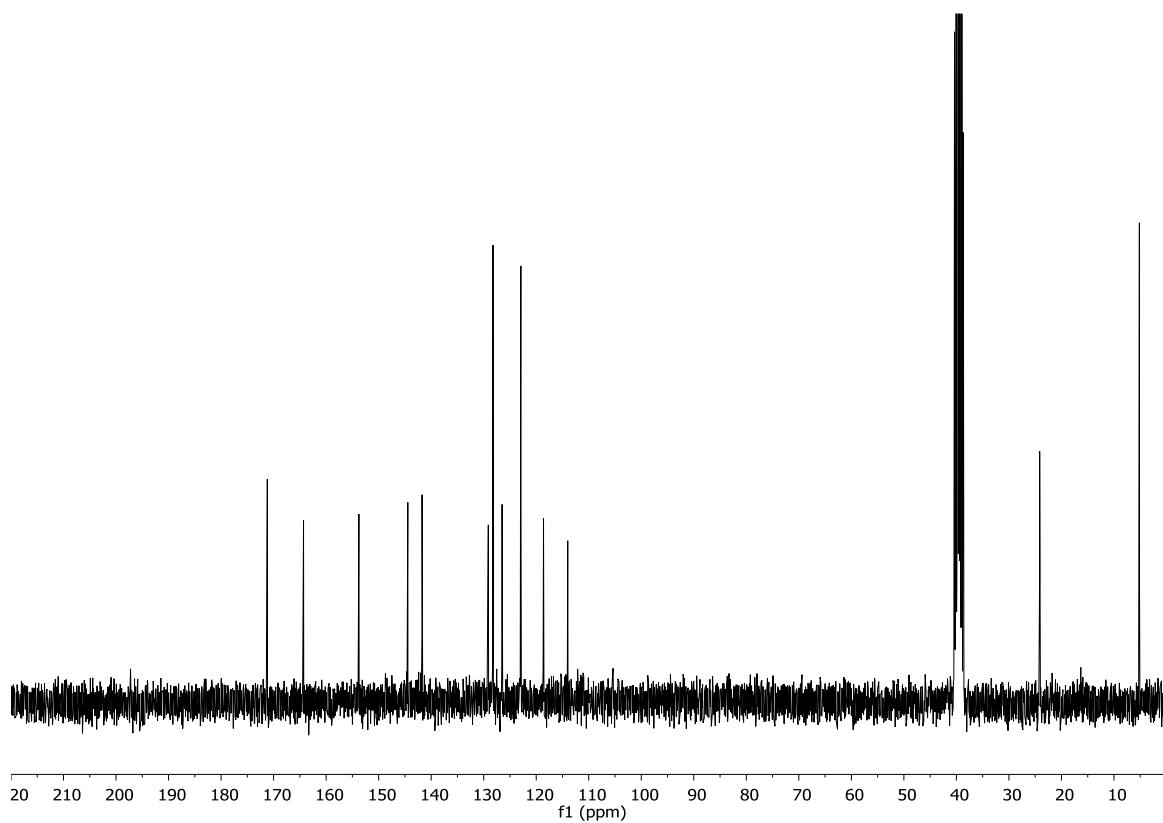
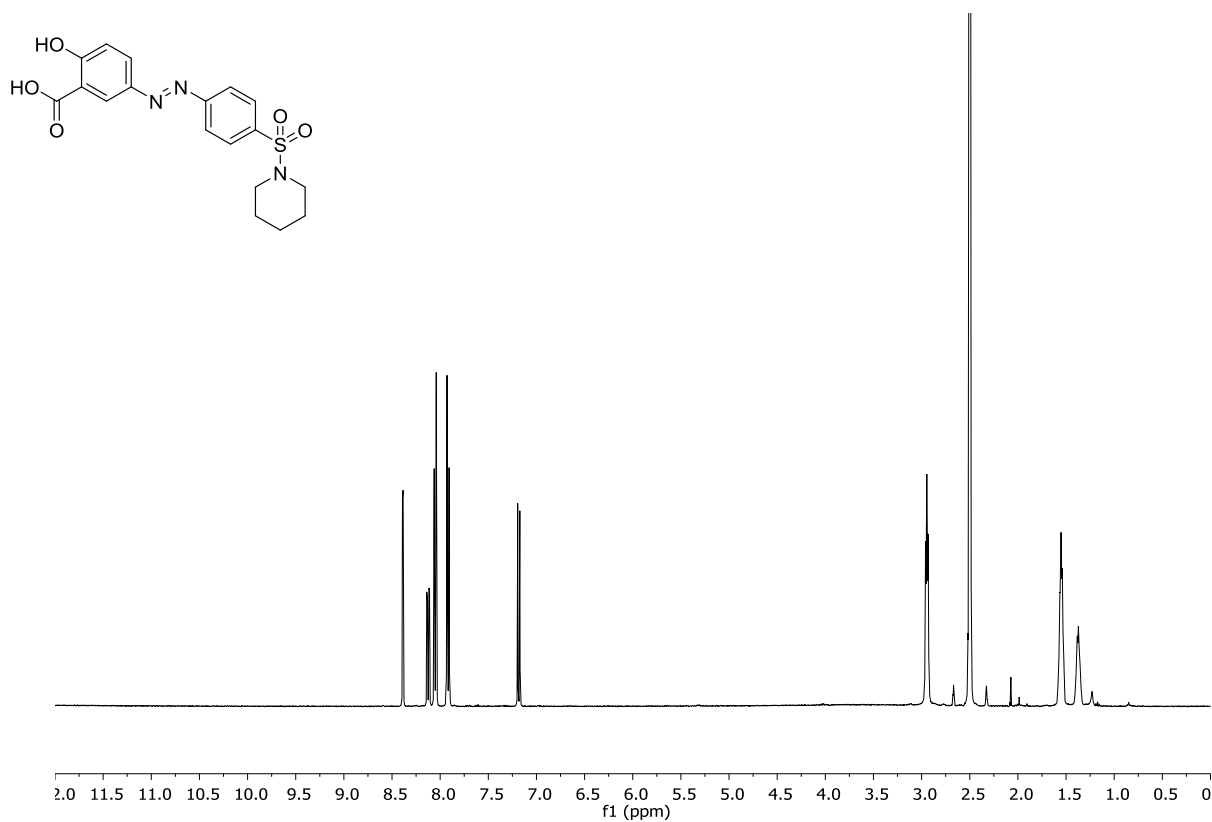
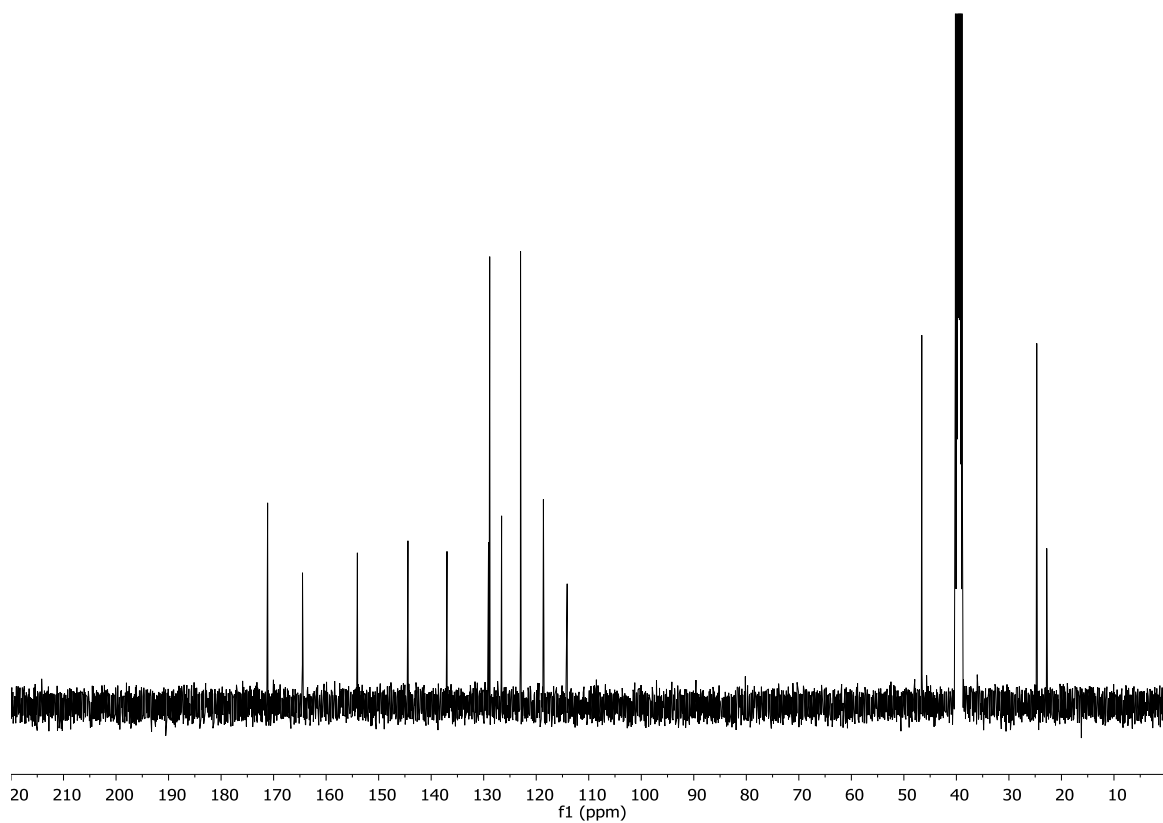


Abbildung 195: ^{13}C -NMR (75.5 MHz, DMSO-d_6) von 75.

Abbildung 196: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) von 76.Abbildung 197: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO-d_6) von 76.

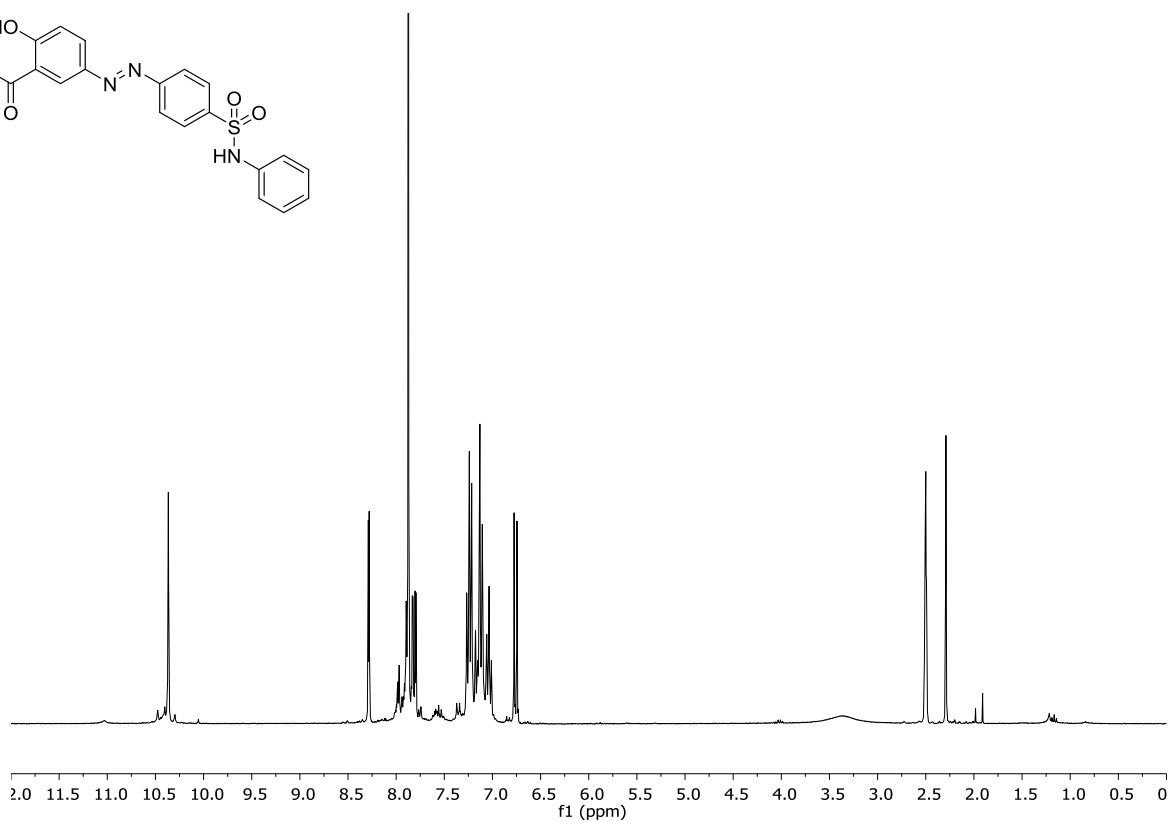
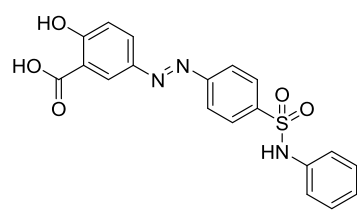


Abbildung 198: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) von 77.

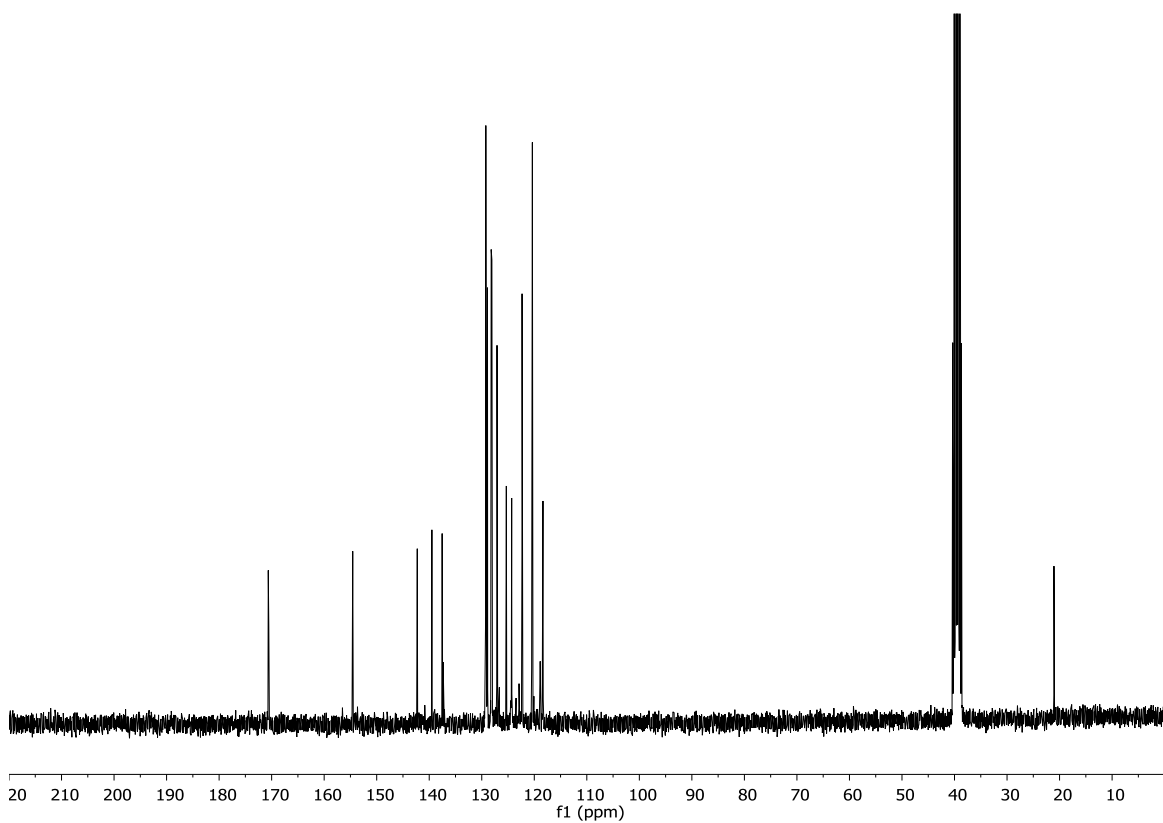


Abbildung 199: $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO-d_6) von 77.

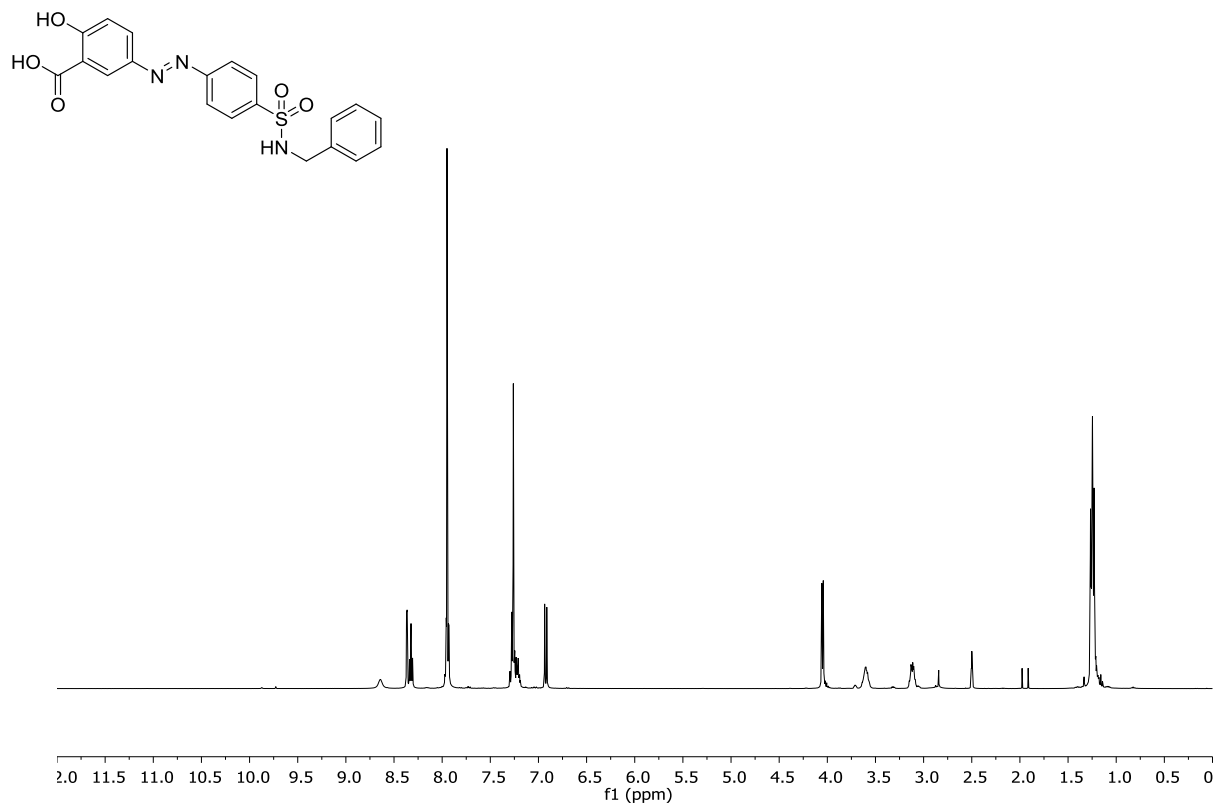


Abbildung 200: ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **78**.

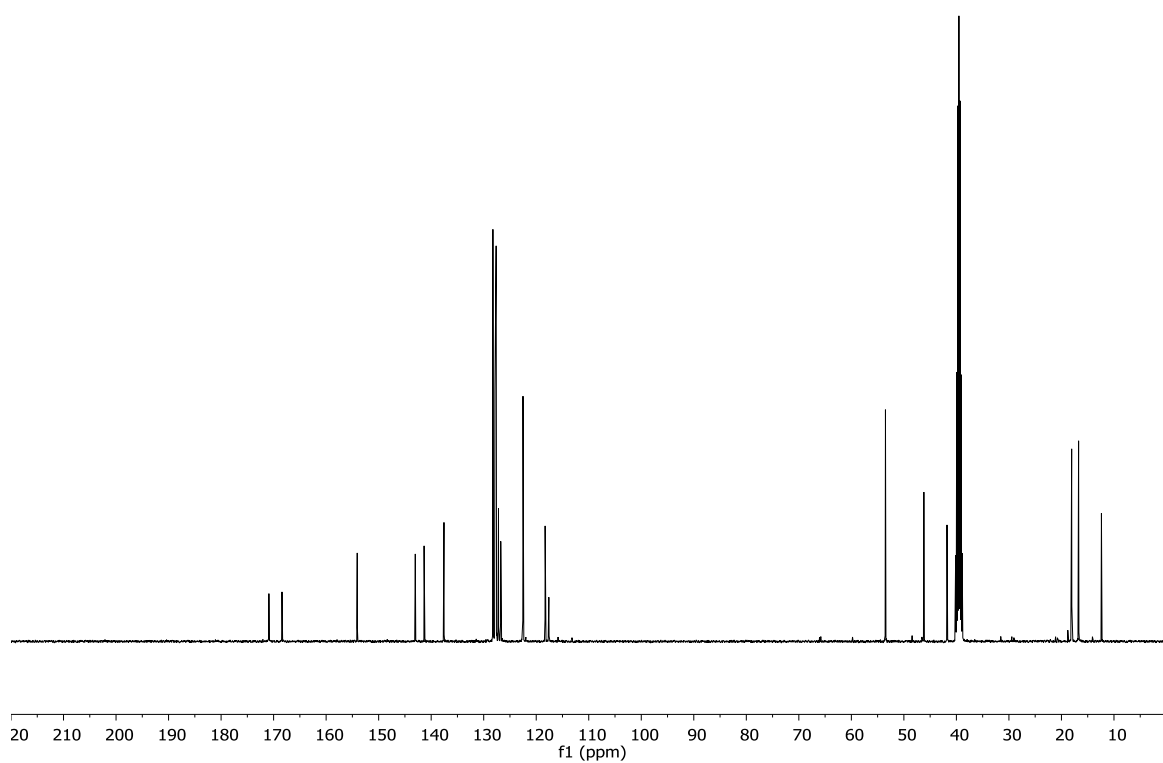


Abbildung 201: ^{13}C -NMR (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **78**.

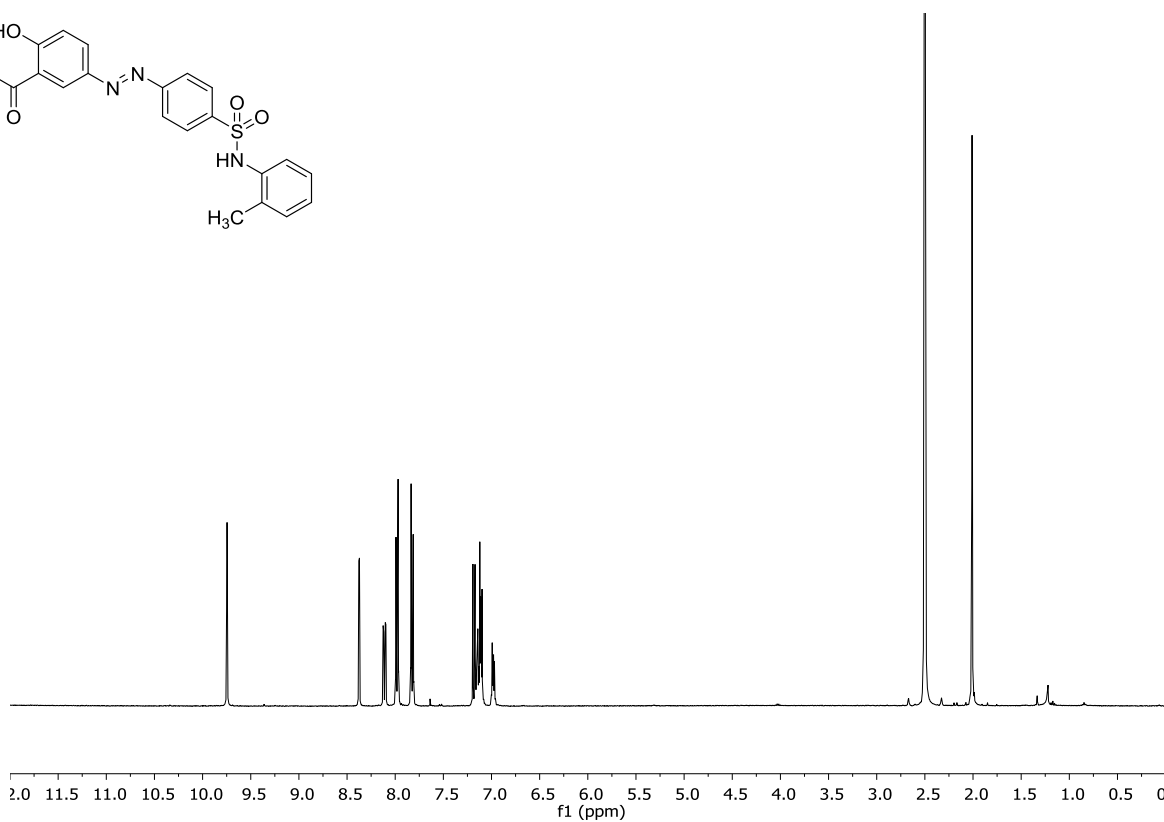
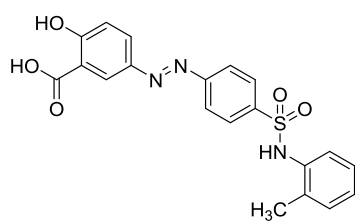


Abbildung 202: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) von 79.

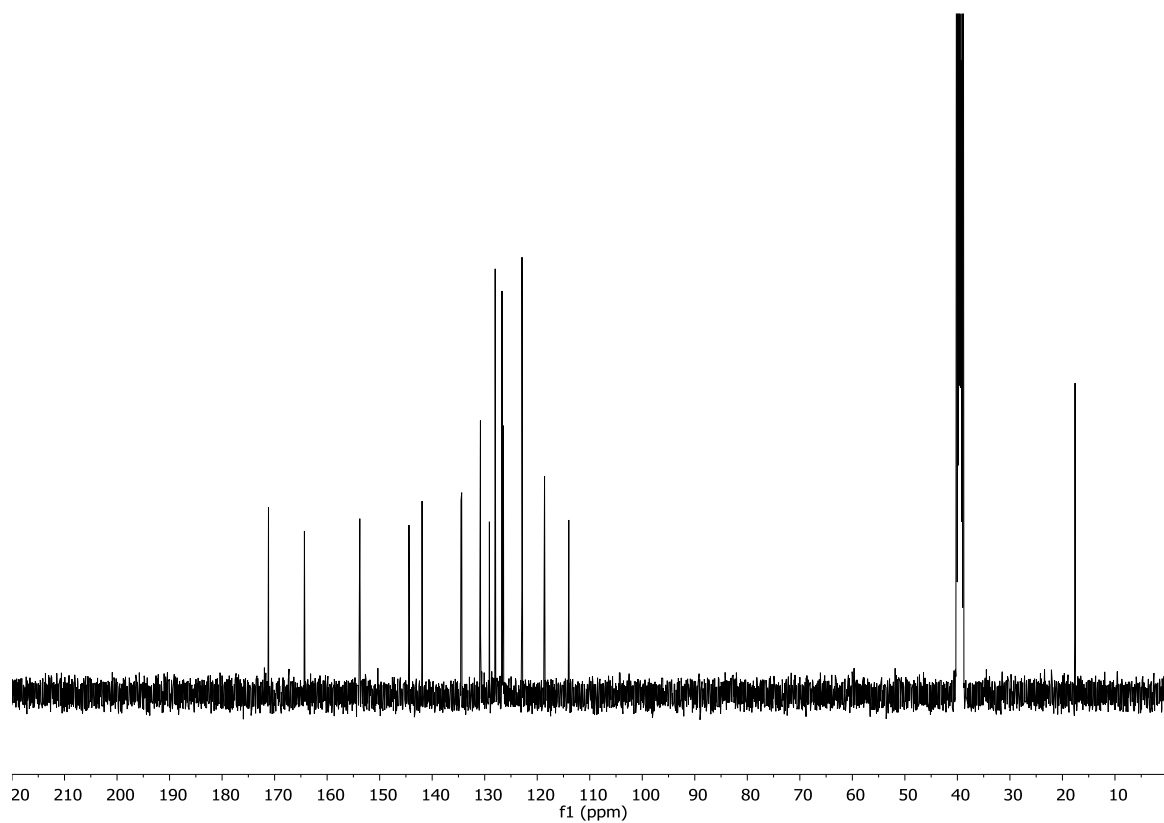
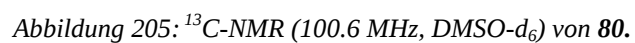
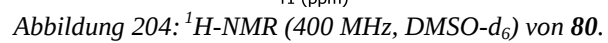


Abbildung 203: ¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆) von 79.



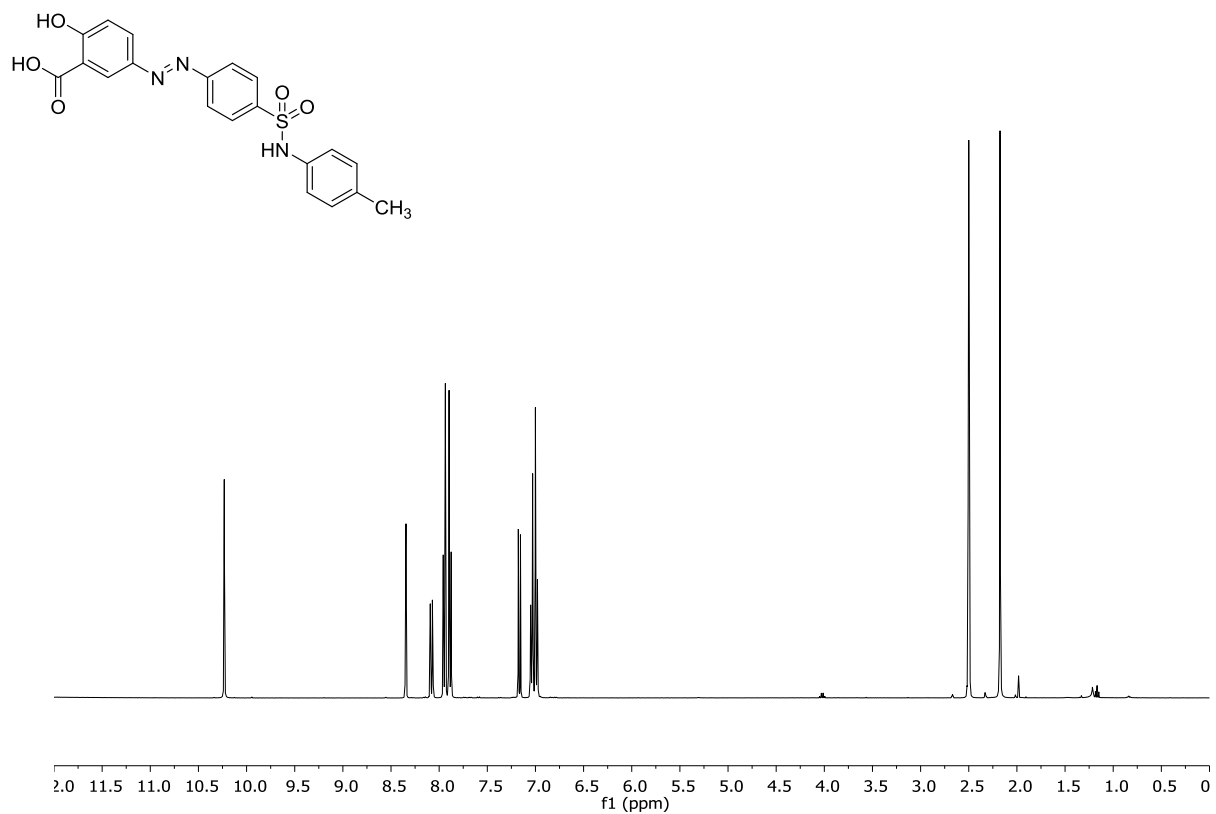


Abbildung 206: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) von **81**.

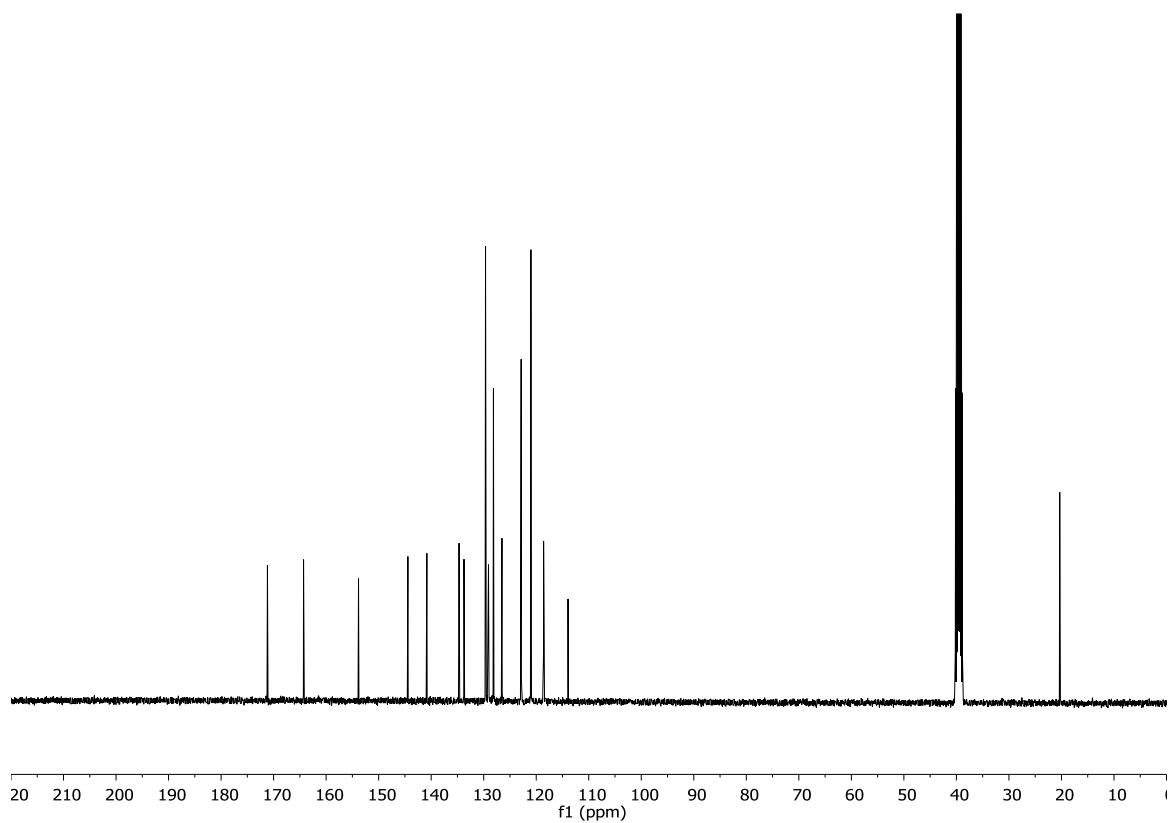


Abbildung 207: ¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆) von **81**.

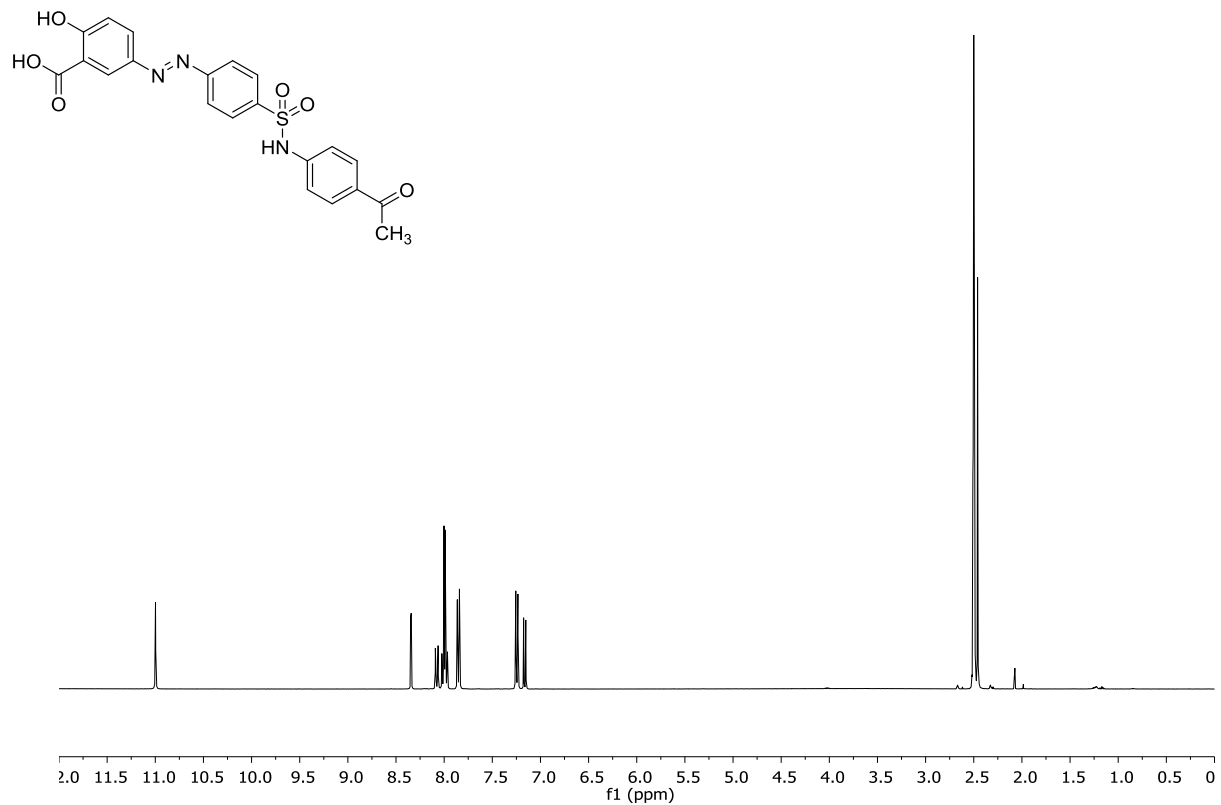


Abbildung 208: ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **82**.

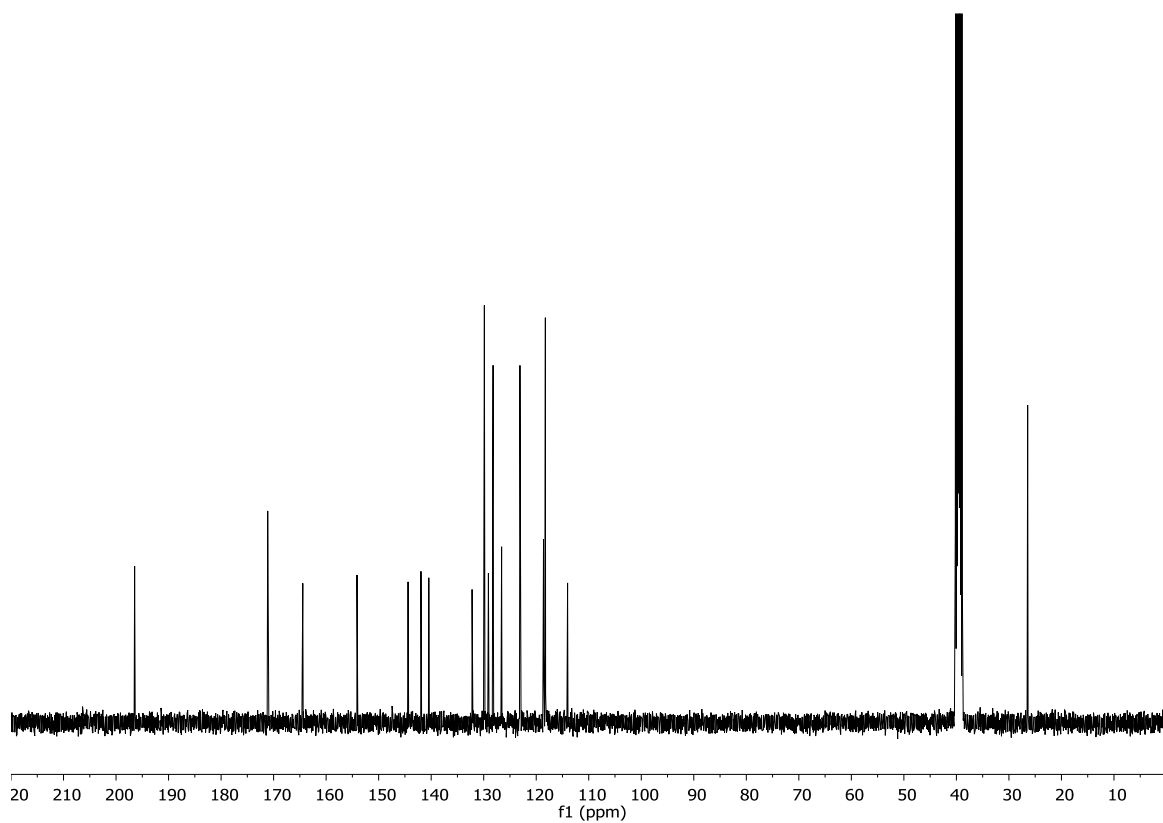
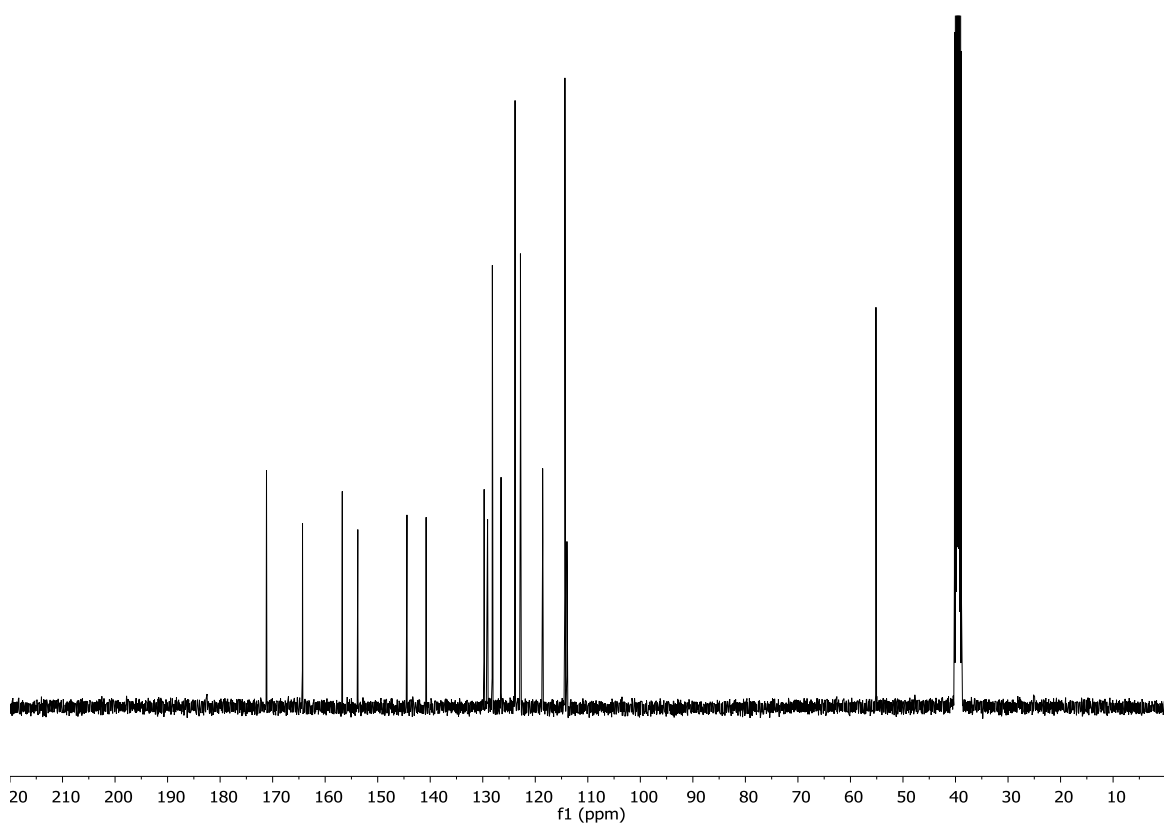
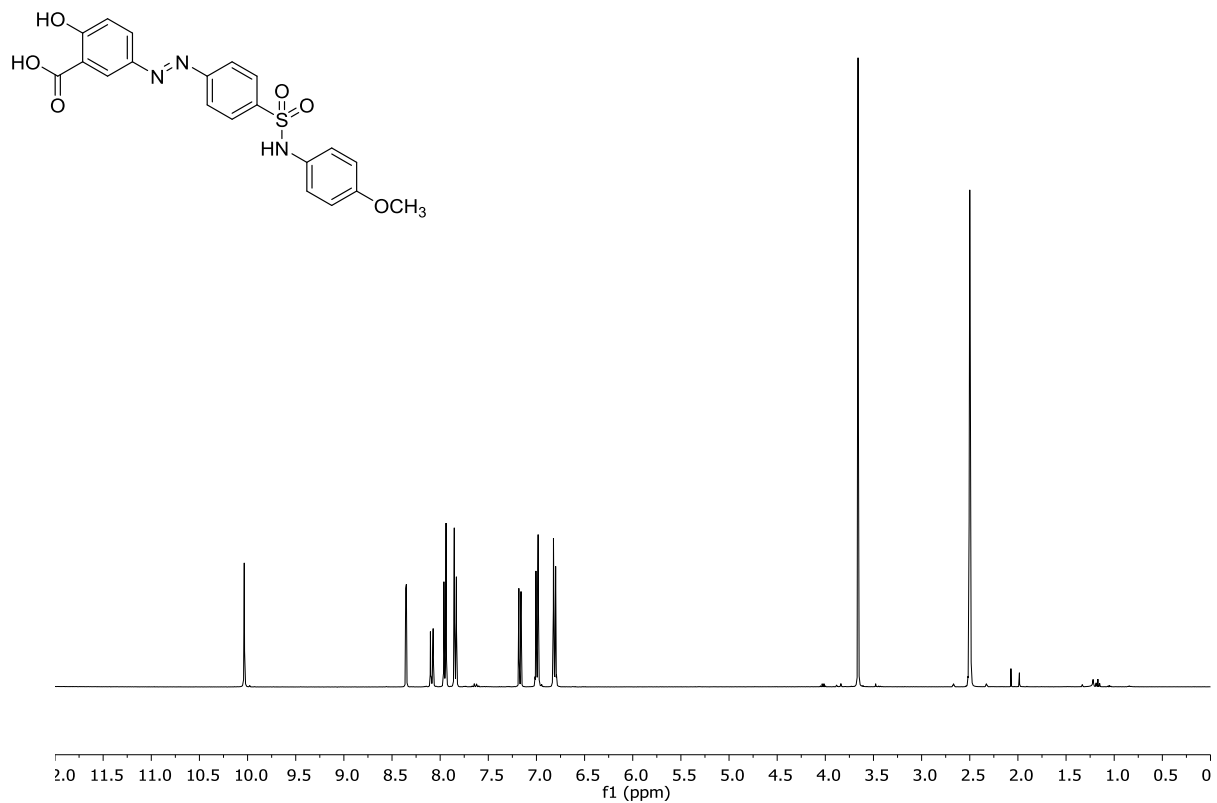


Abbildung 209: ^{13}C -NMR (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **82**.



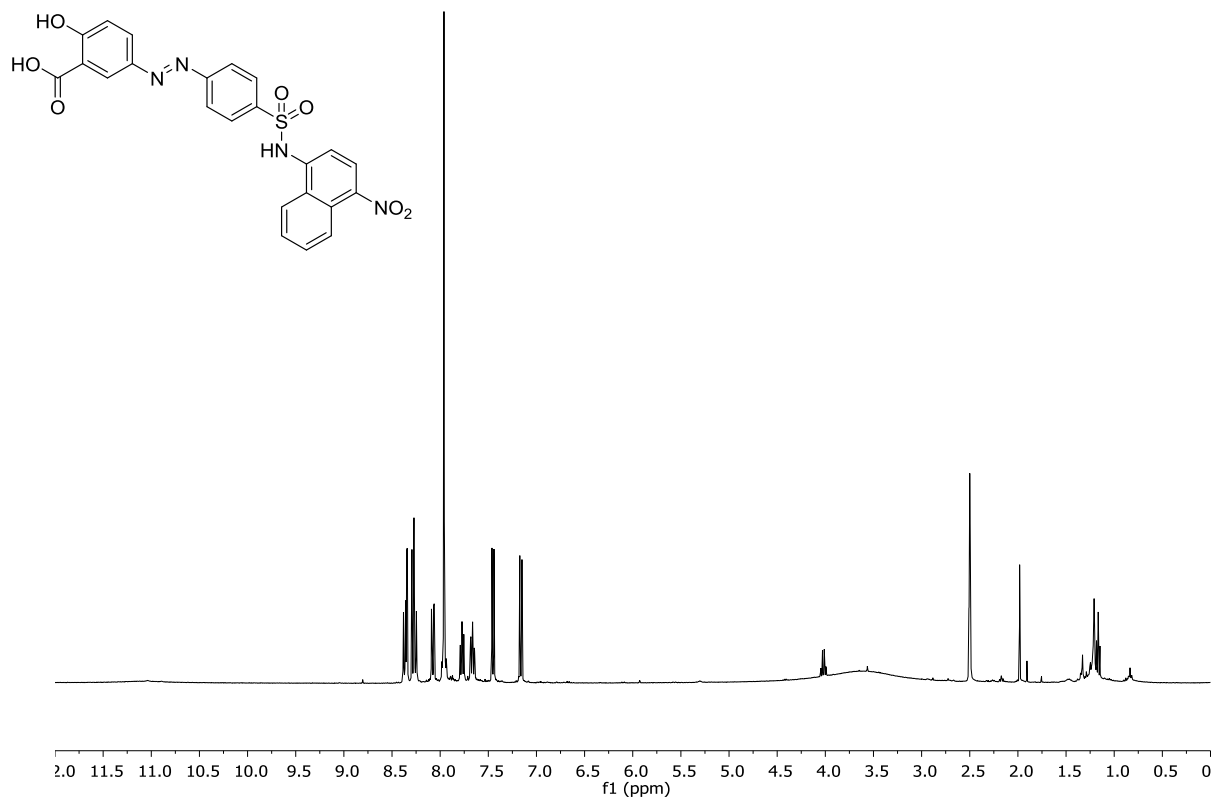


Abbildung 212: ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **84**.

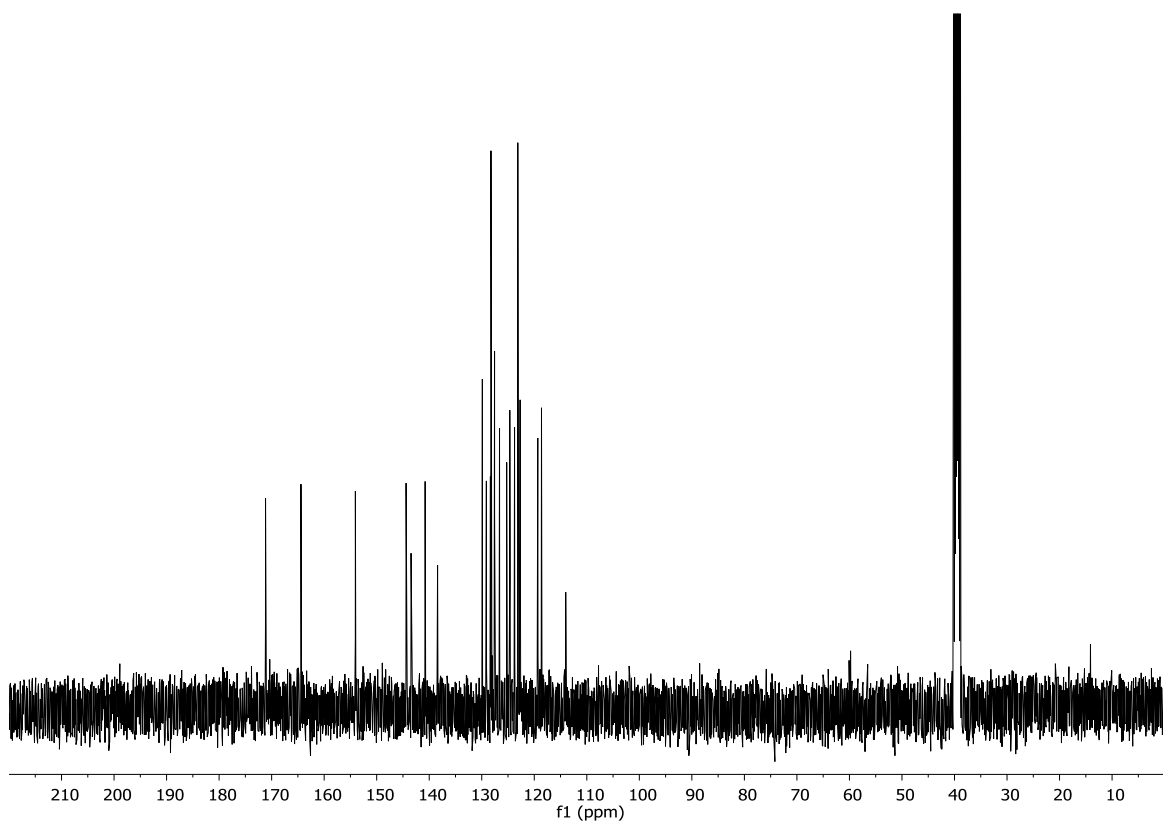


Abbildung 213: ^{13}C -NMR (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **84**.

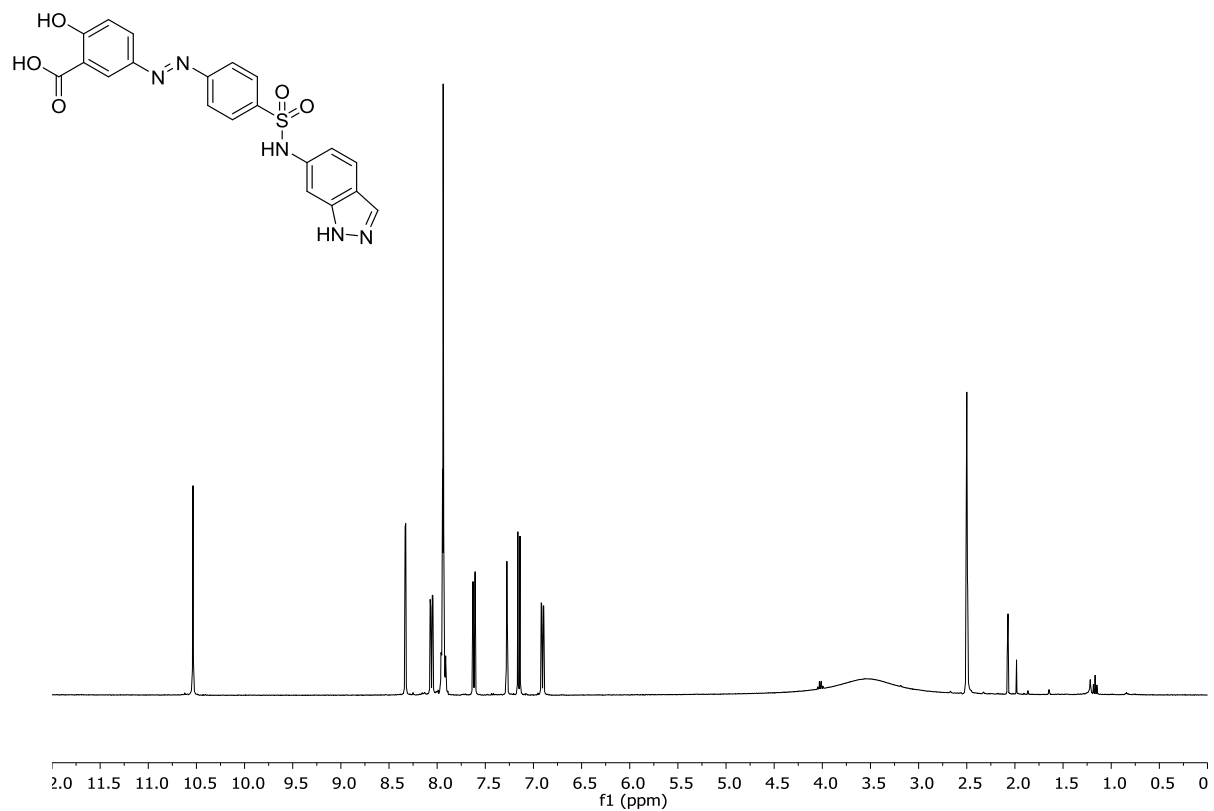


Abbildung 214: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) von 85.

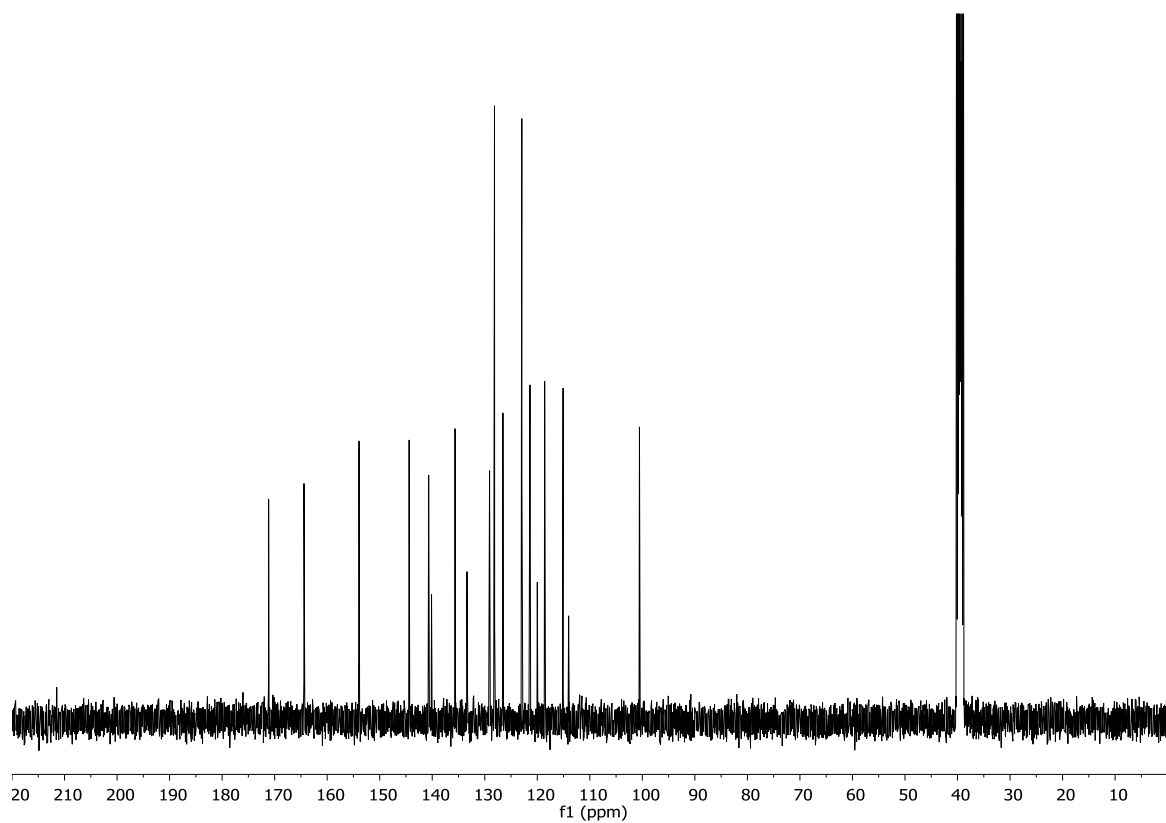


Abbildung 215: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DMSO-d_6) von 85.

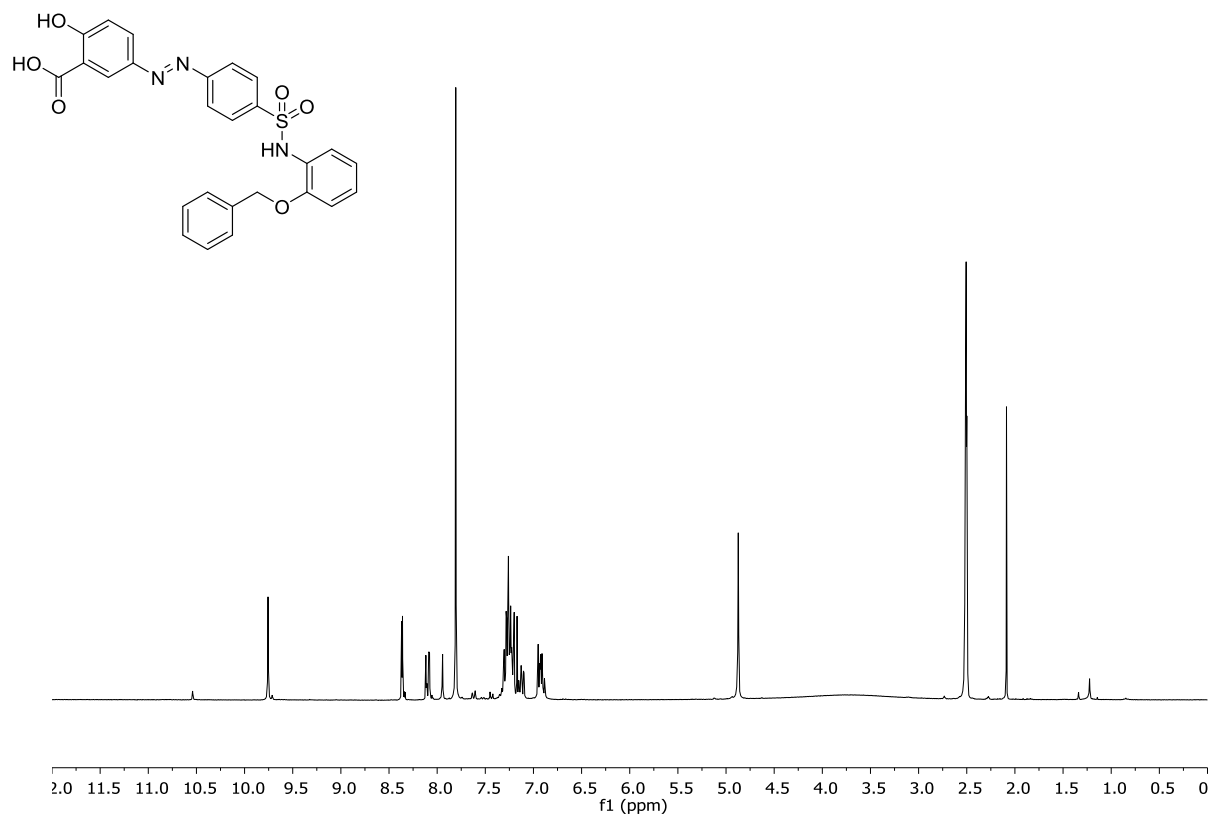


Abbildung 216: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) von **86**.

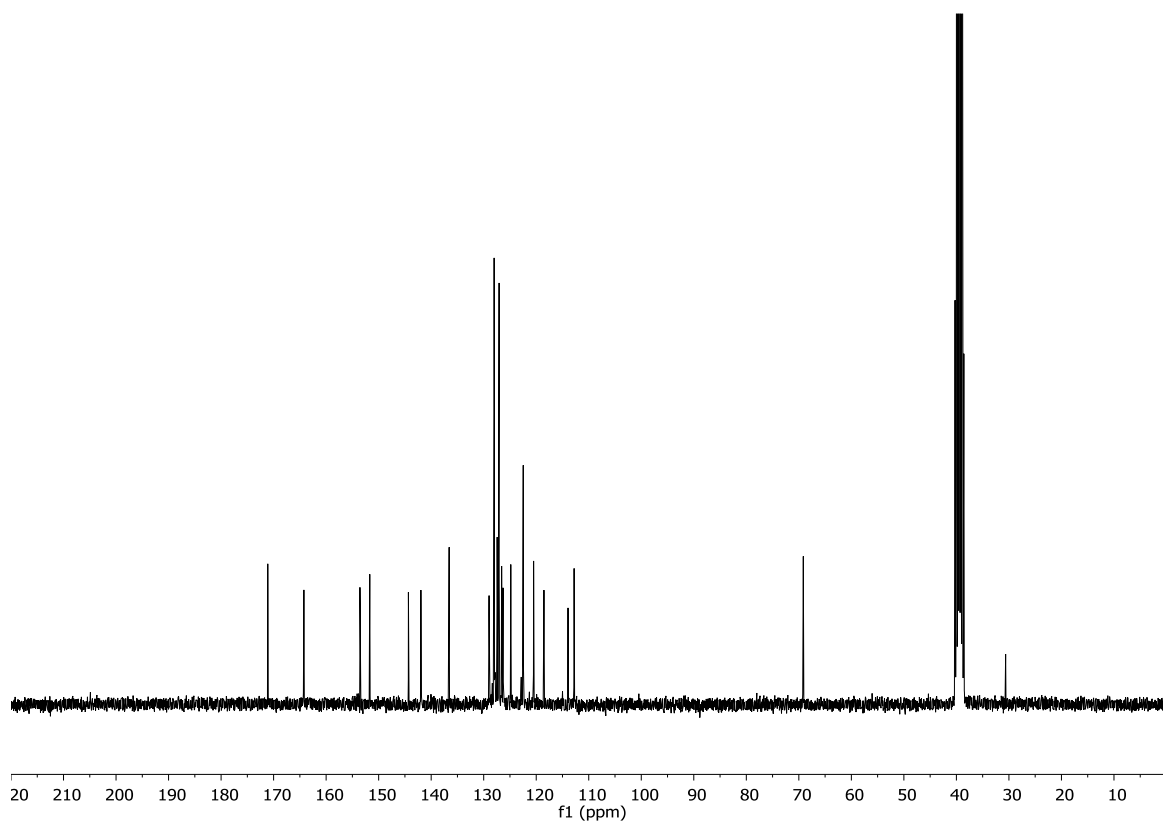


Abbildung 217: $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO-d_6) von **86**.

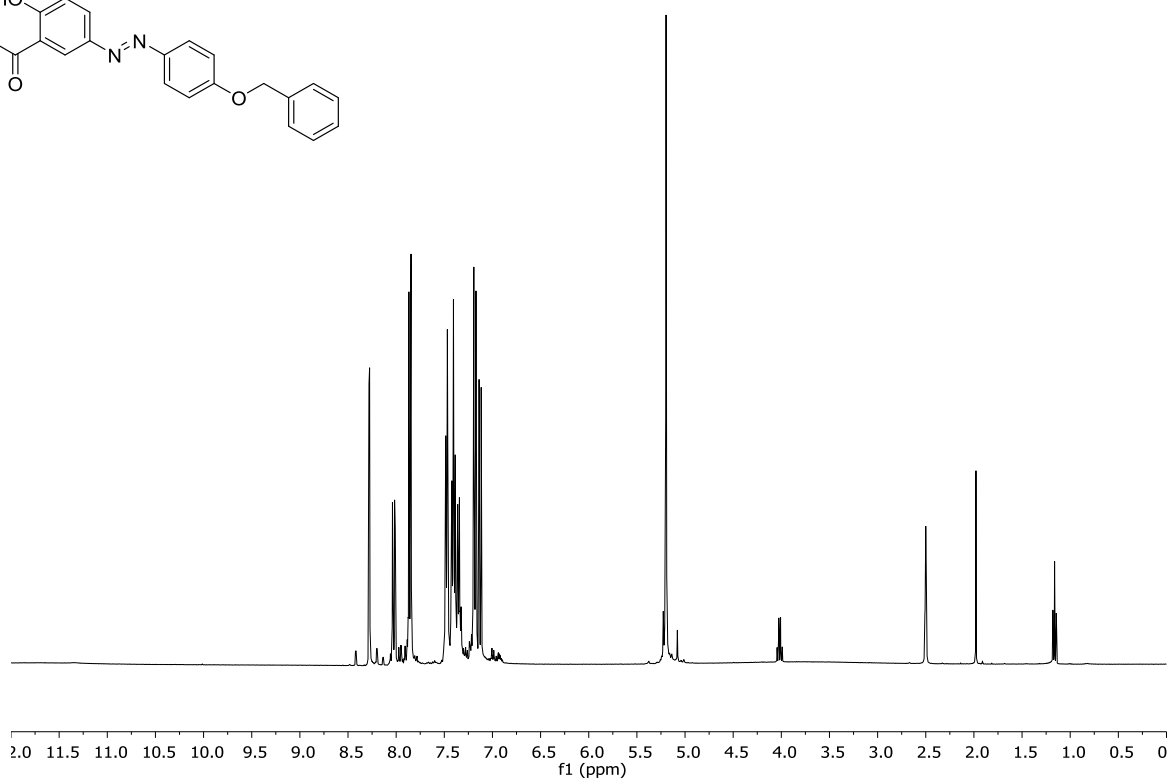
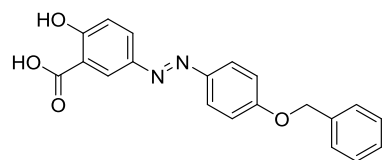


Abbildung 218: ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **88**.

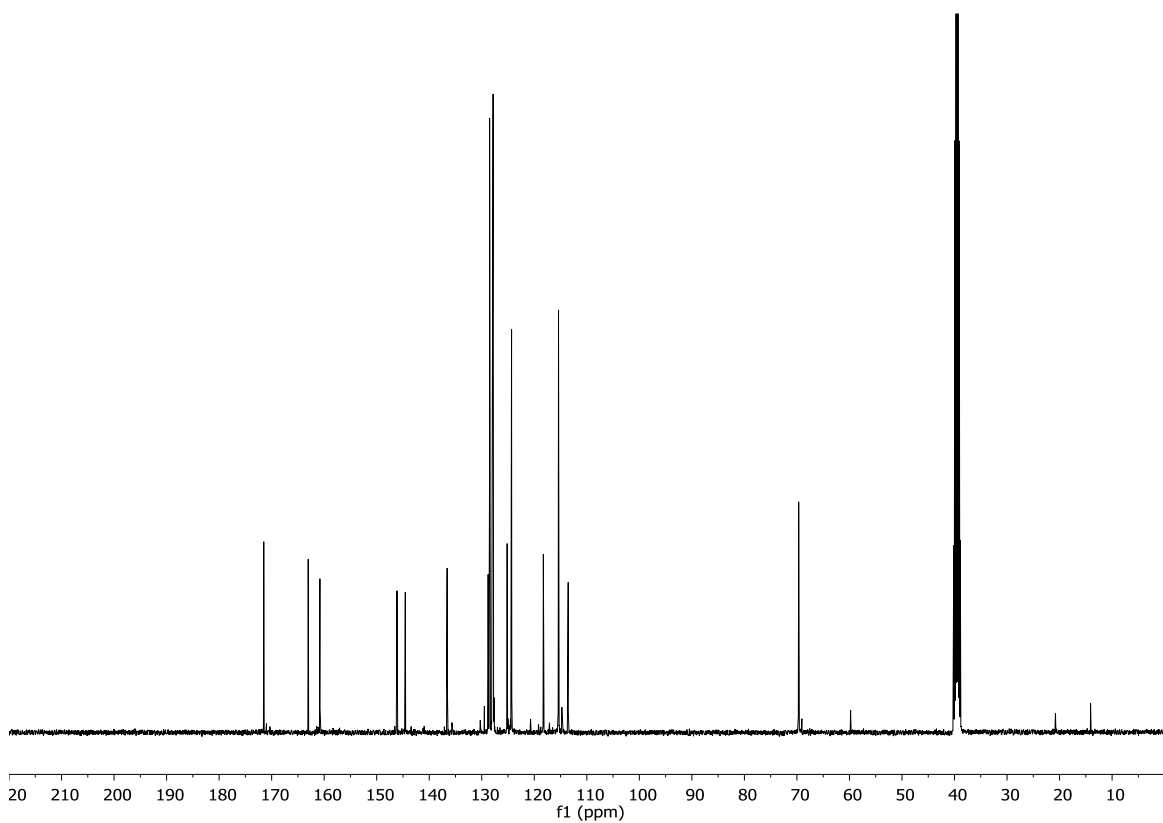


Abbildung 219: ^{13}C -NMR (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **88**.

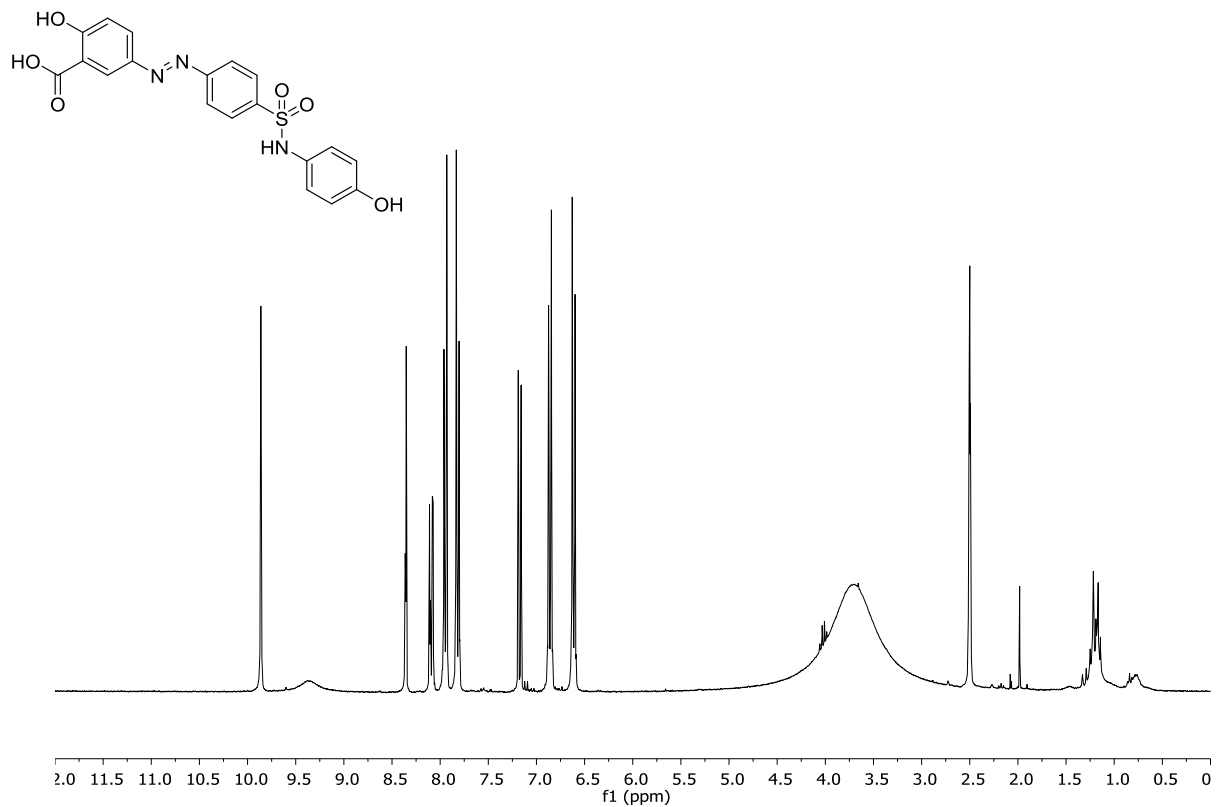


Abbildung 220: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) von **89**.

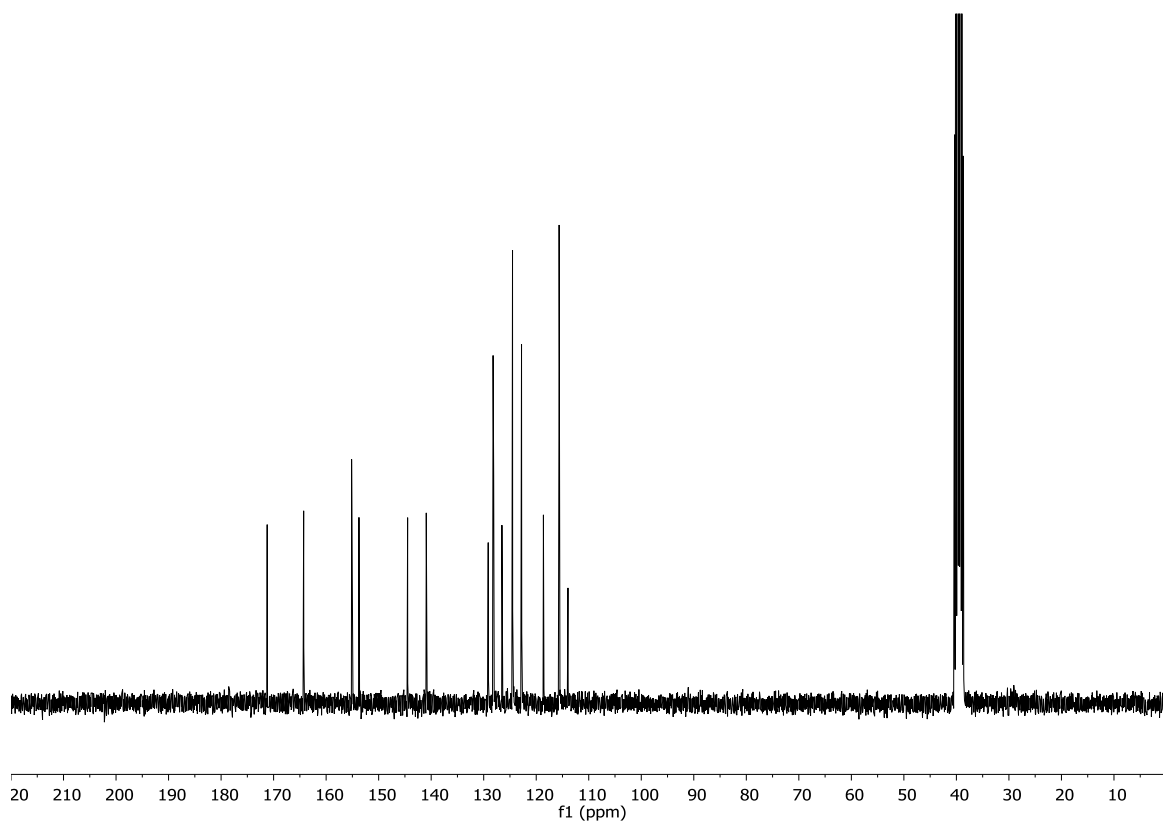


Abbildung 221: $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO-d_6) von **89**.

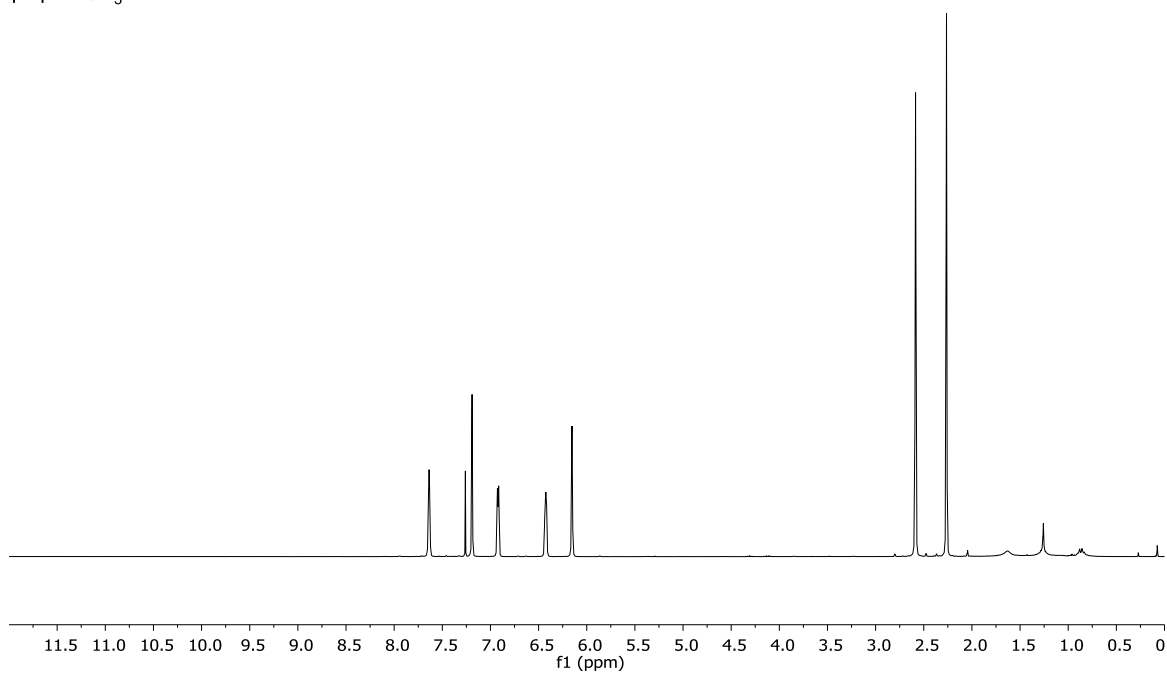
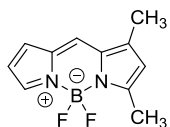


Abbildung 222: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) von **91**.

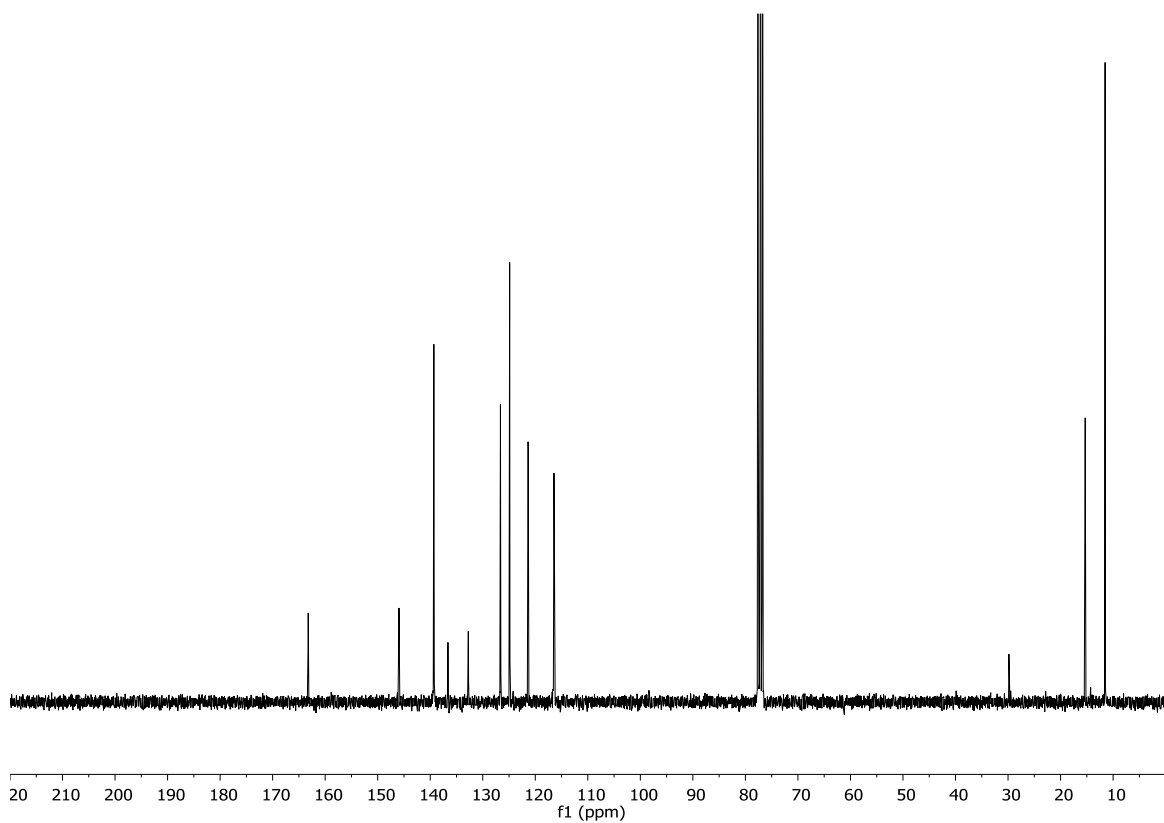
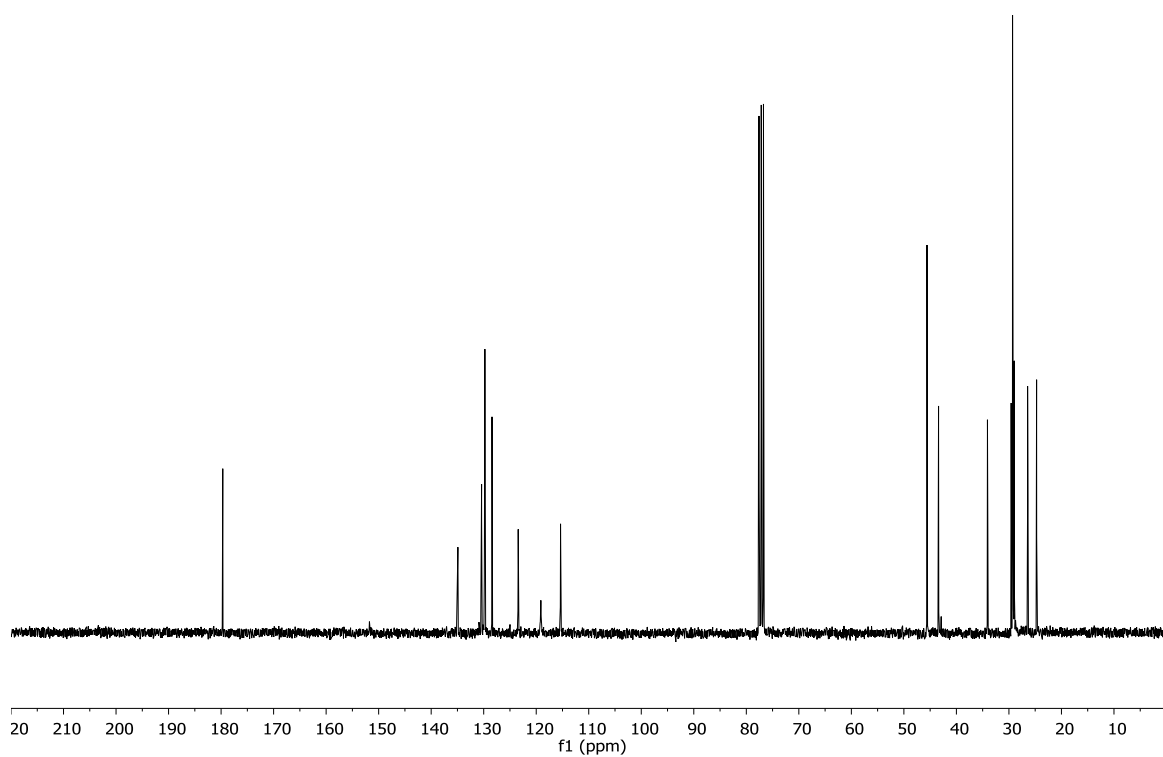
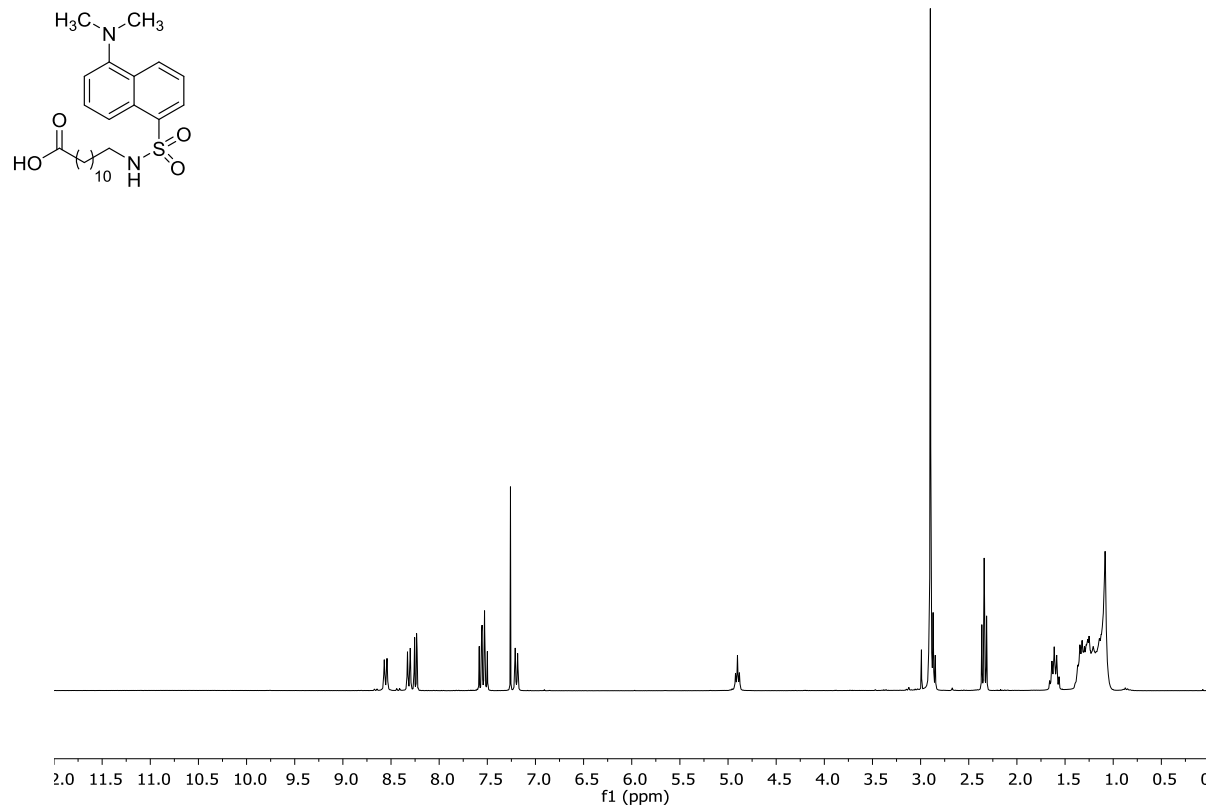


Abbildung 223: ¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) von **91**.



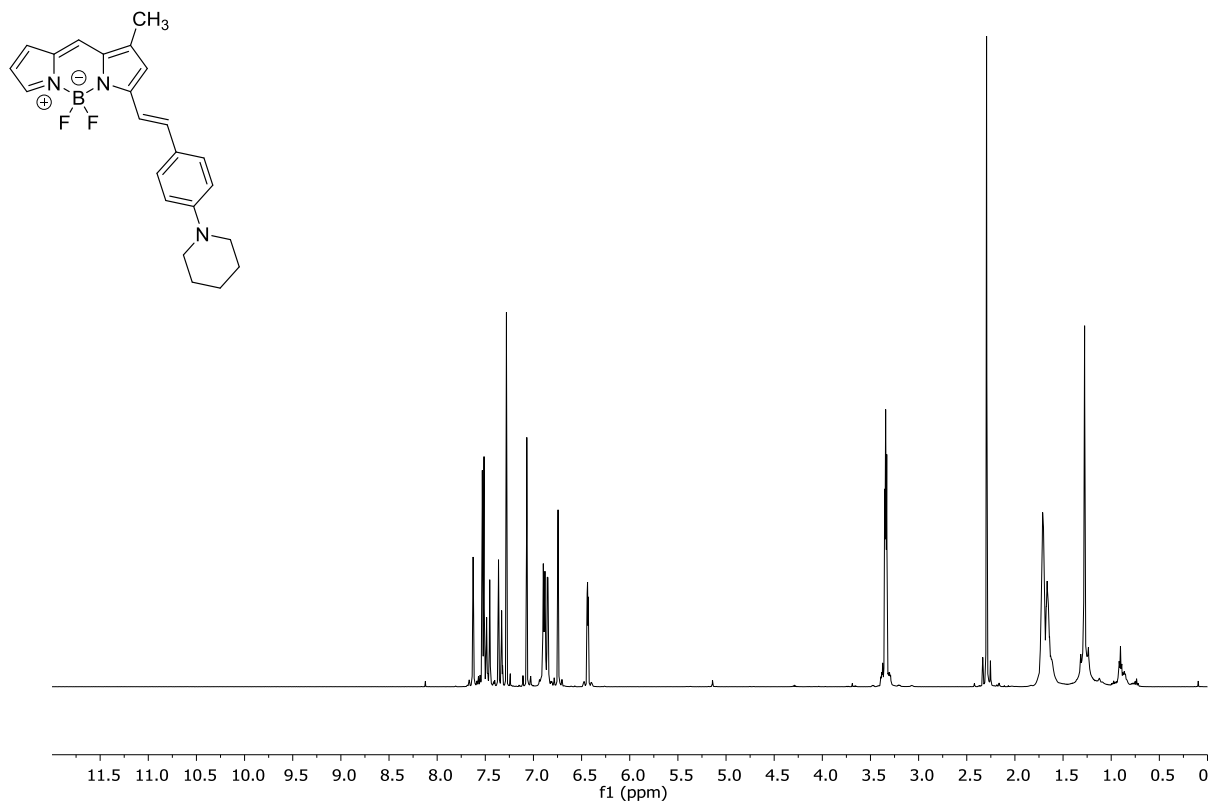


Abbildung 226: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) von **99**.

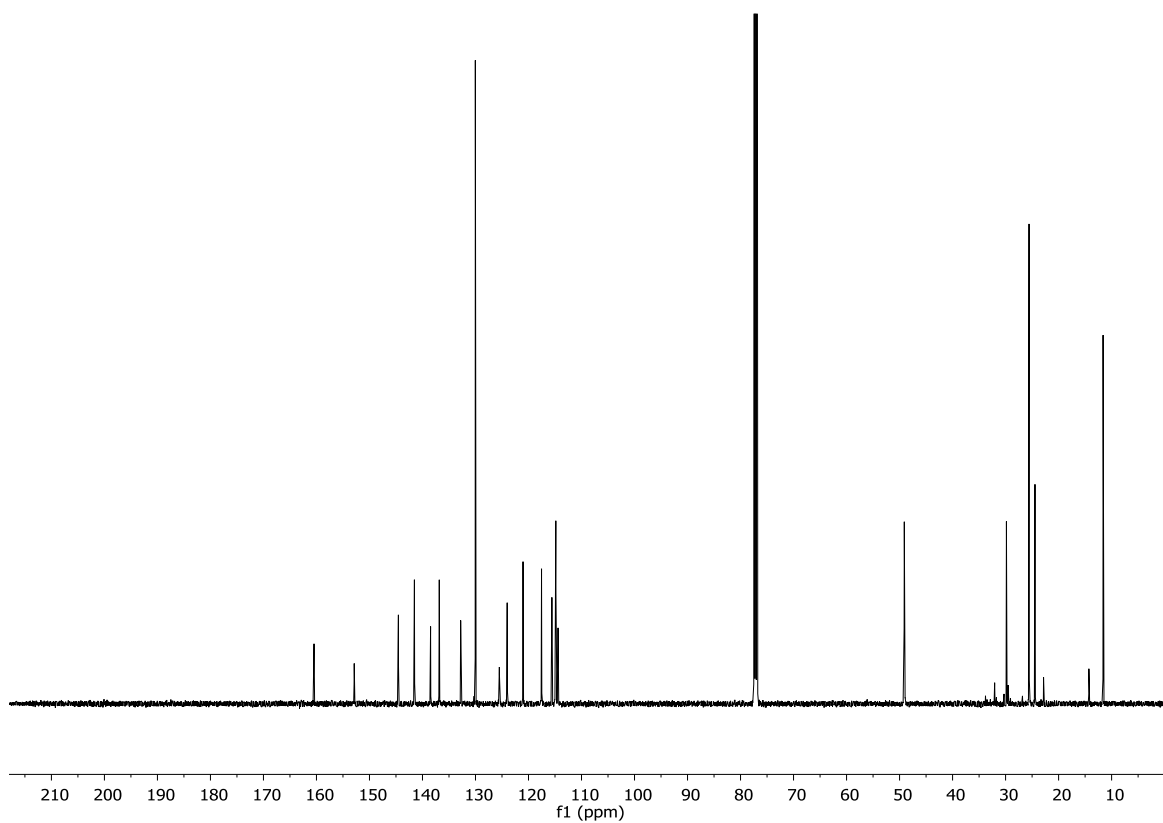


Abbildung 227: ^{13}C -NMR (125.6 MHz, CDCl_3) von **99**.

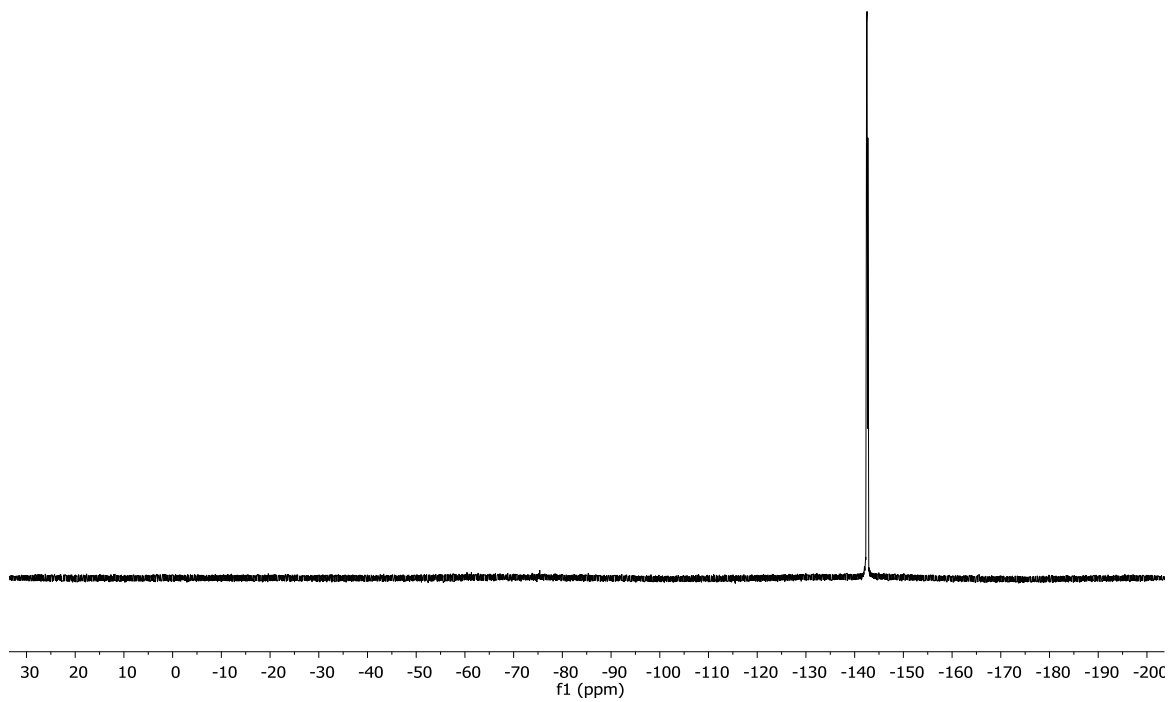


Abbildung 228: ^{19}F -NMR (376 MHz, CDCl_3) von **99**.

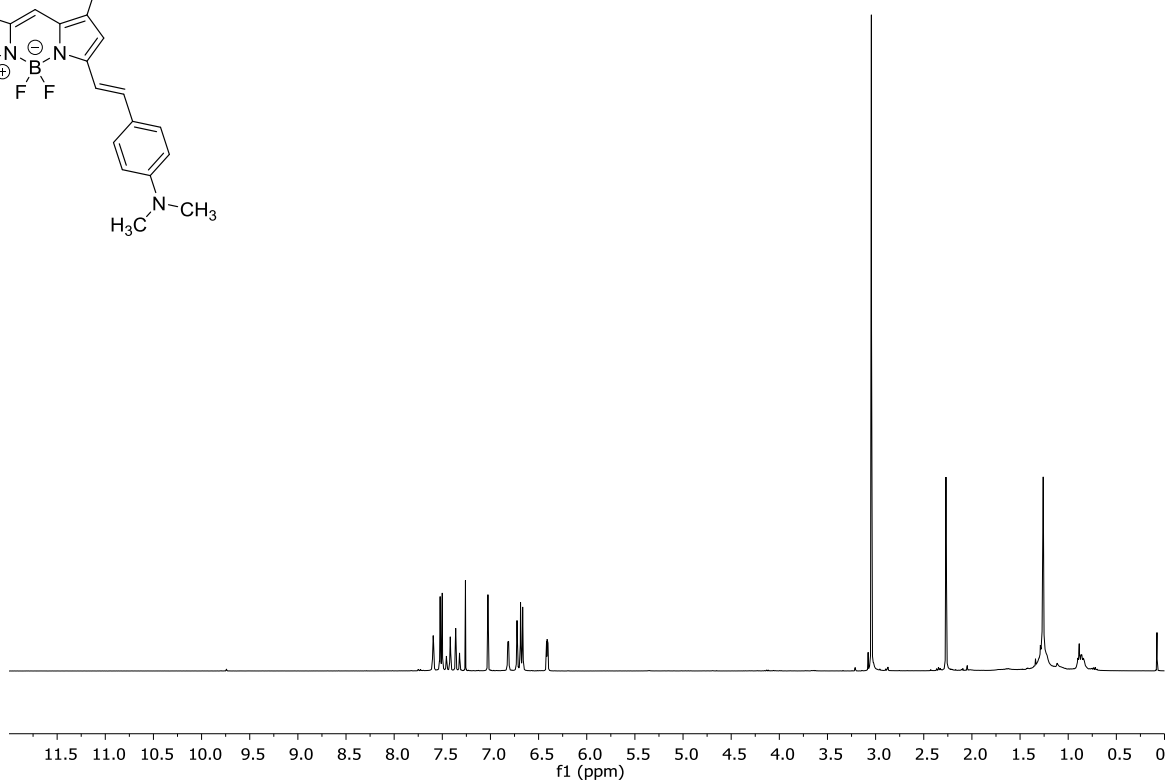
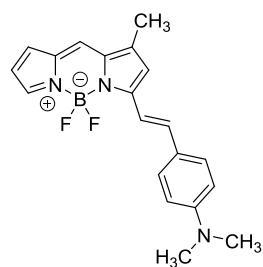


Abbildung 229: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) von **100**.

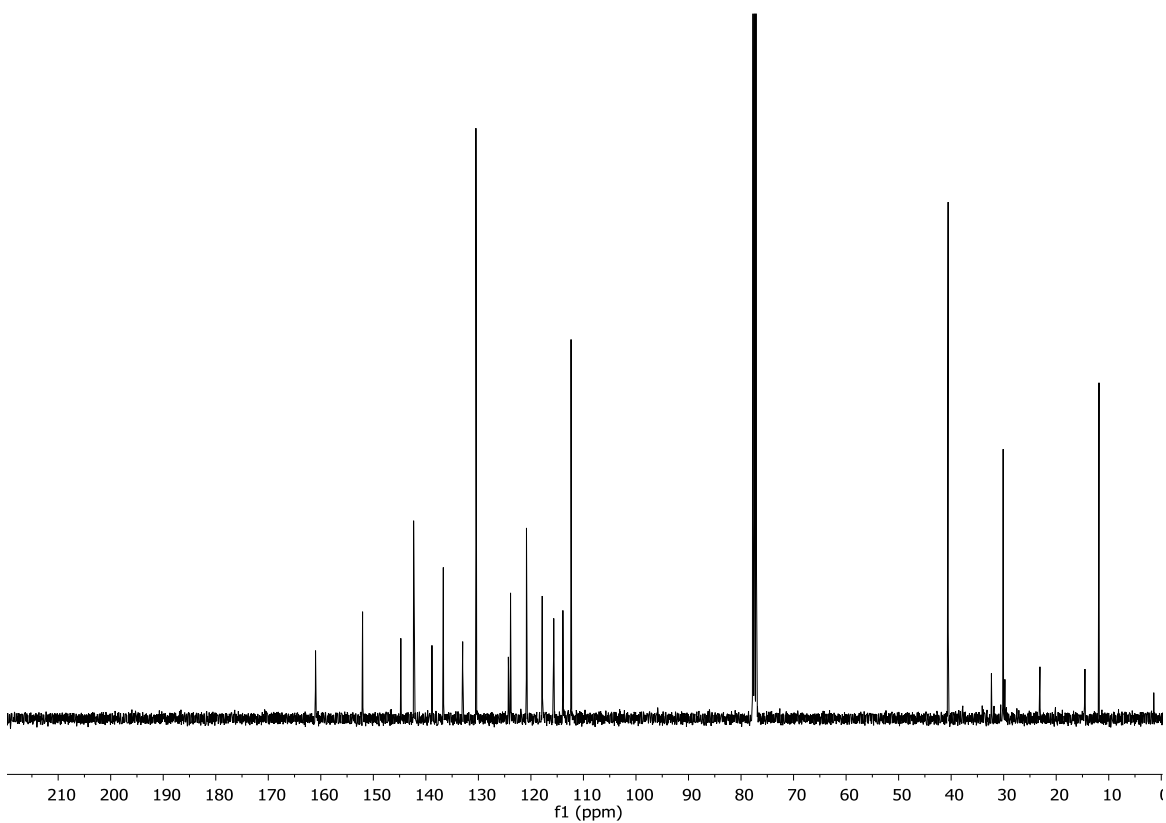


Abbildung 230: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3) von **100**.

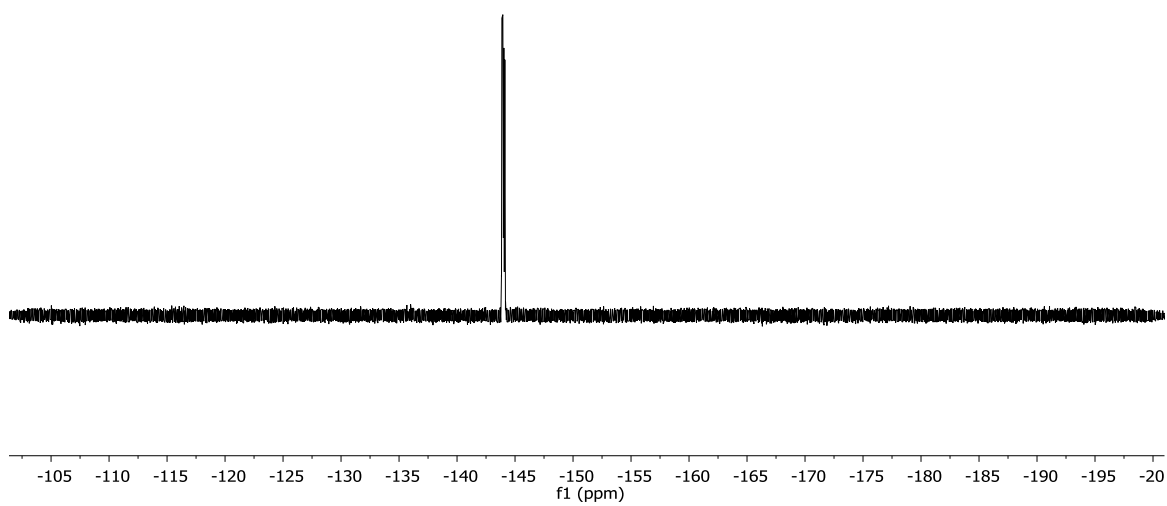


Abbildung 231: ^{19}F -NMR (376 MHz, CDCl_3) von **100**.

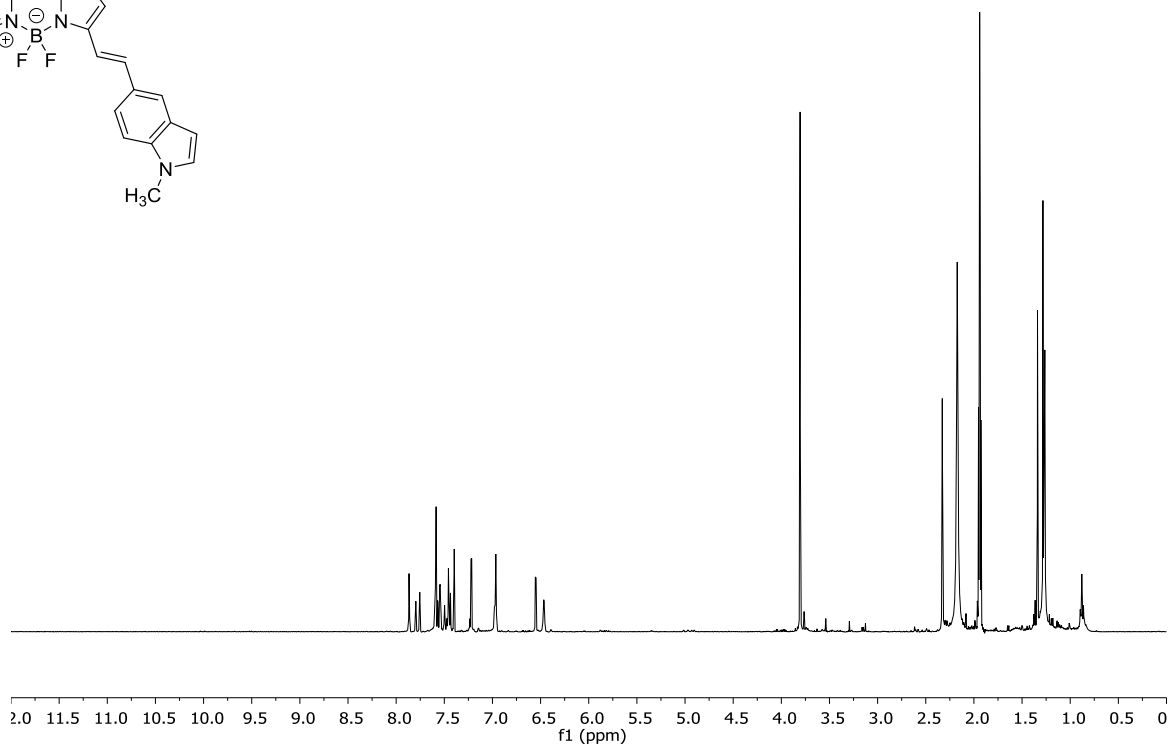
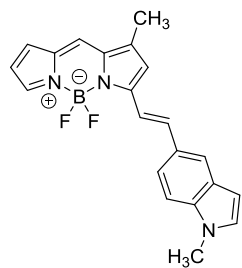


Abbildung 232: ^1H -NMR (400 MHz, CD_3CN) von **101**.

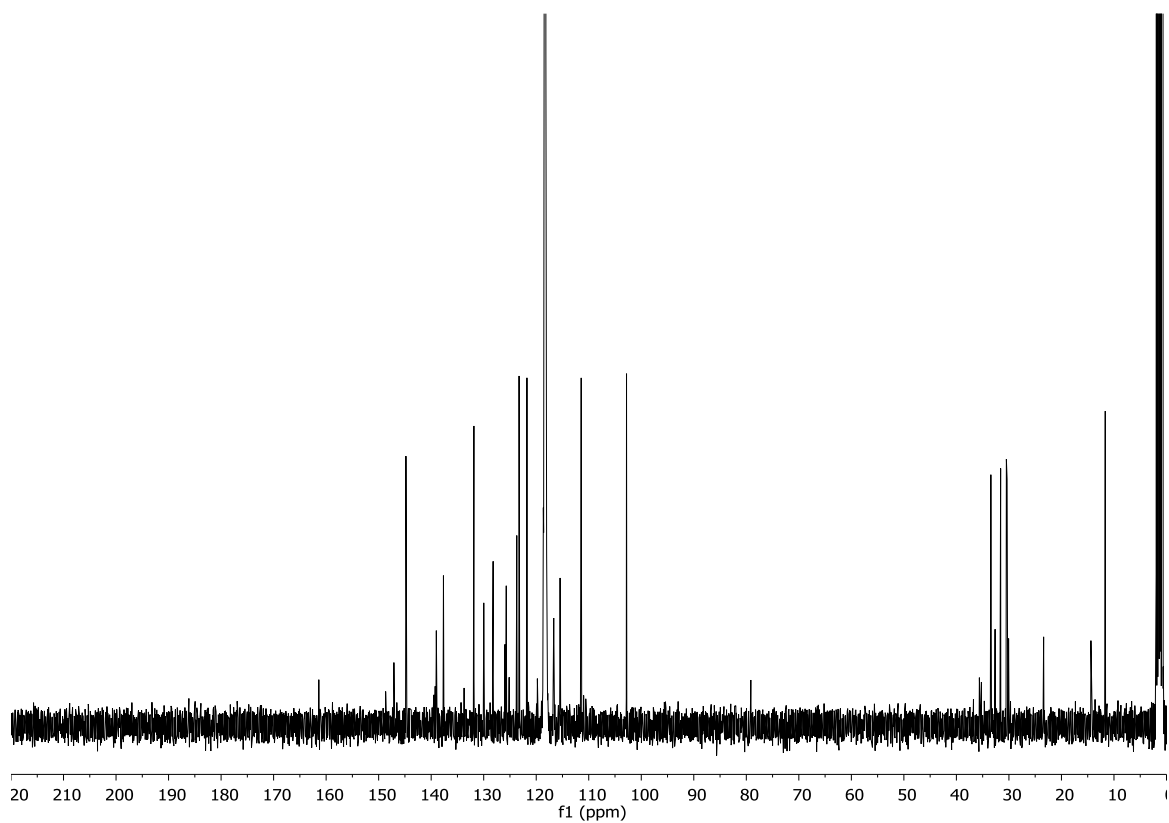


Abbildung 233: ^{13}C -NMR (100.6 MHz, CD_3CN) von **101**.

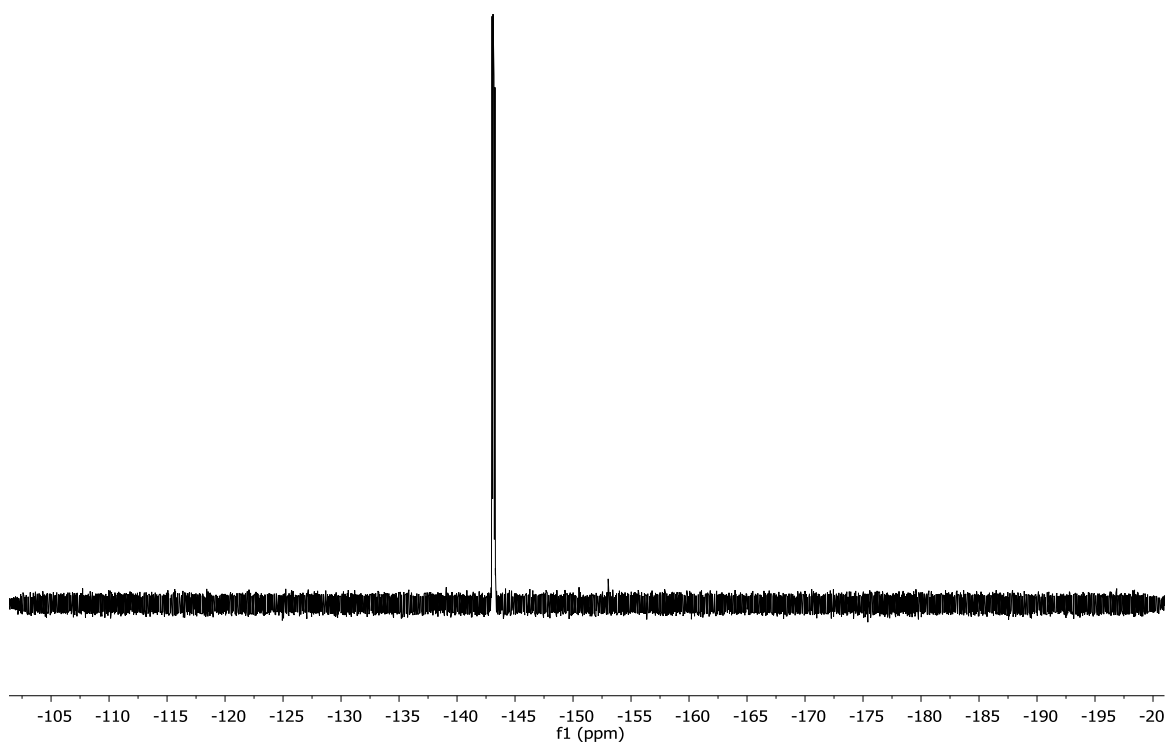


Abbildung 234: ^{19}F -NMR (376 MHz, CD_3CN) von **101**.

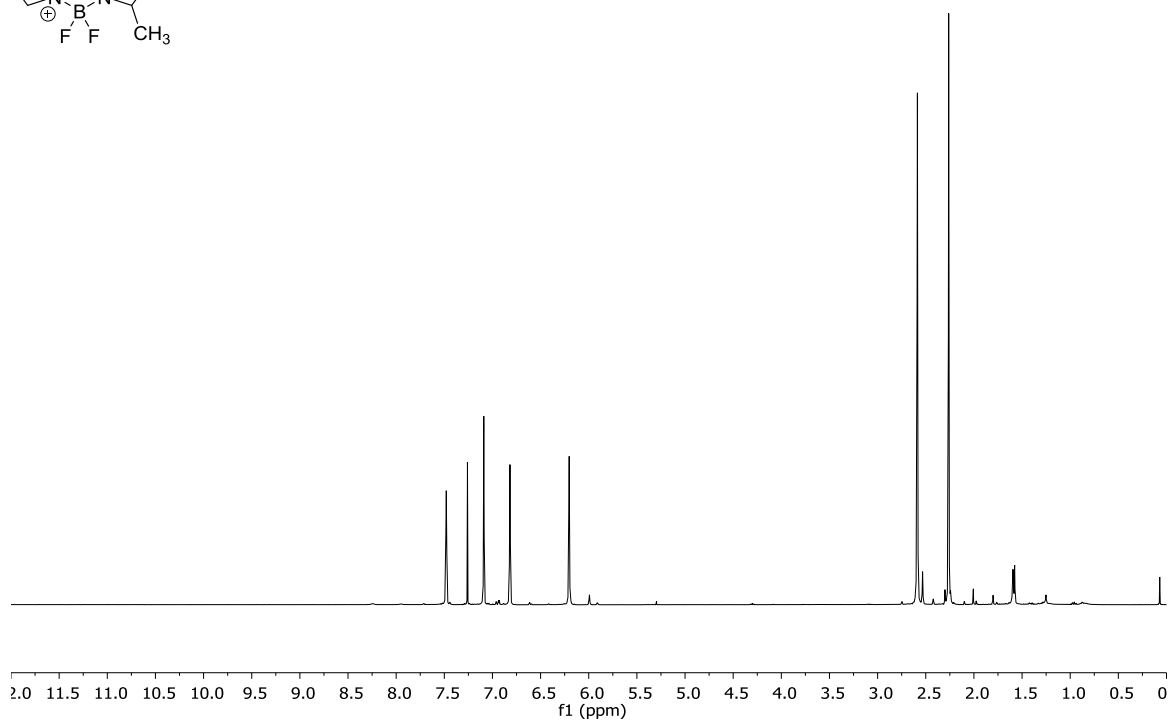
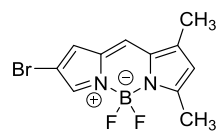


Abbildung 235: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) von **103**.

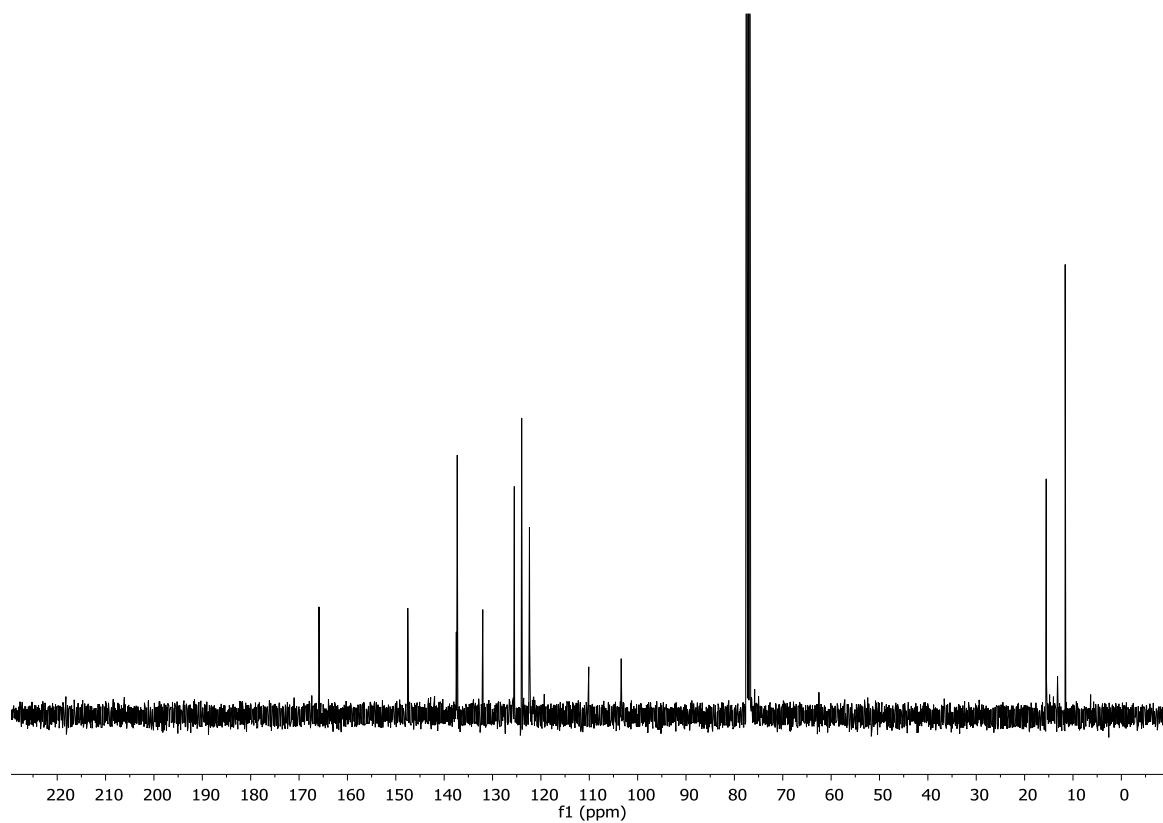


Abbildung 236: ¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃) von **103**.

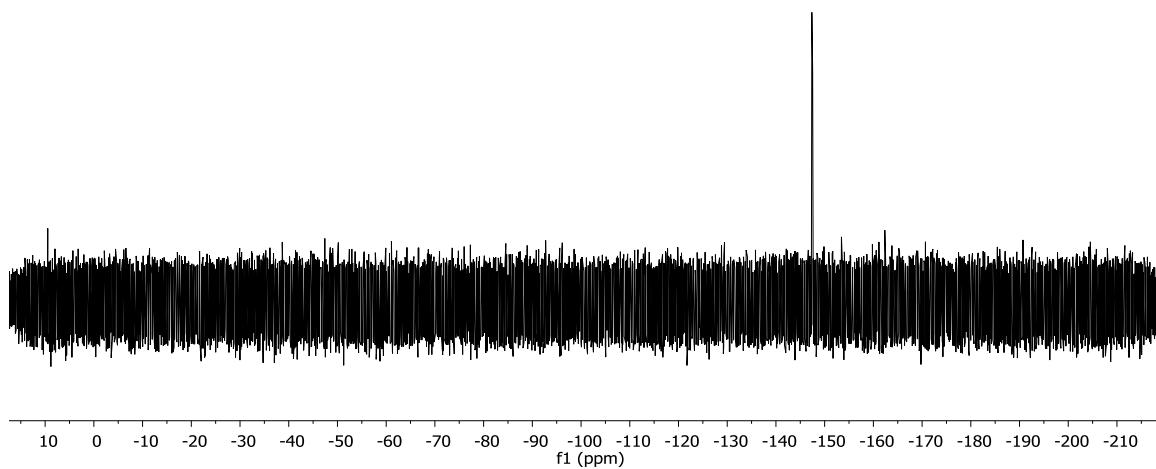


Abbildung 237: ^{19}F -NMR (376 MHz, CDCl_3) von **103**.

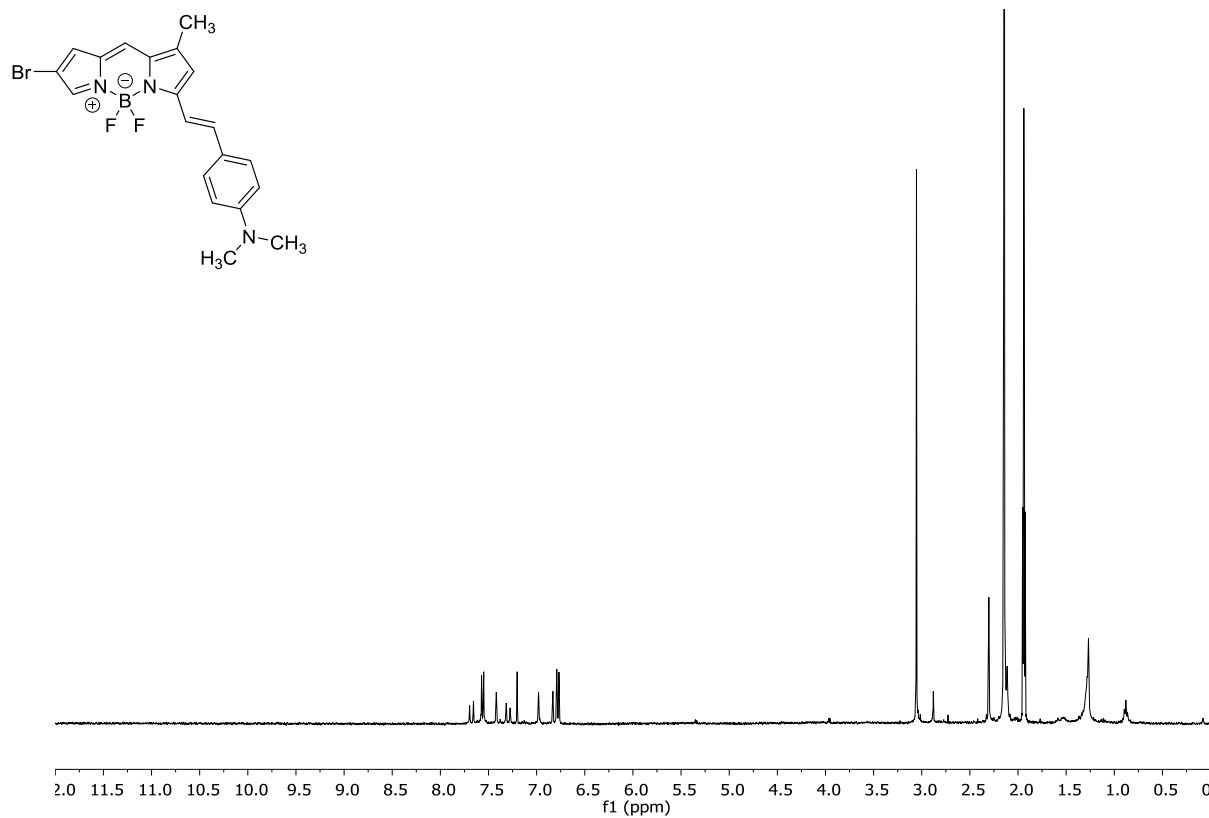


Abbildung 238: ^1H -NMR (400 MHz, CD_3CN) von **105**.

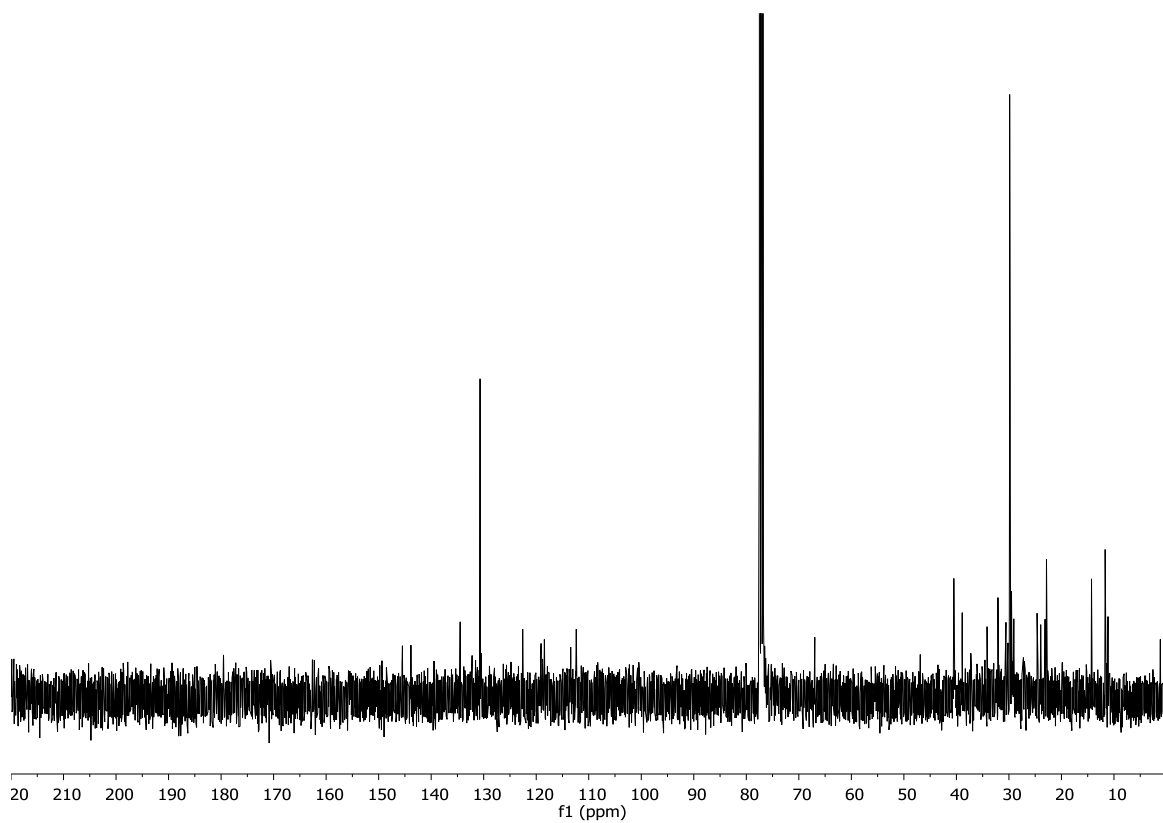


Abbildung 239: ^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3) von **105**.

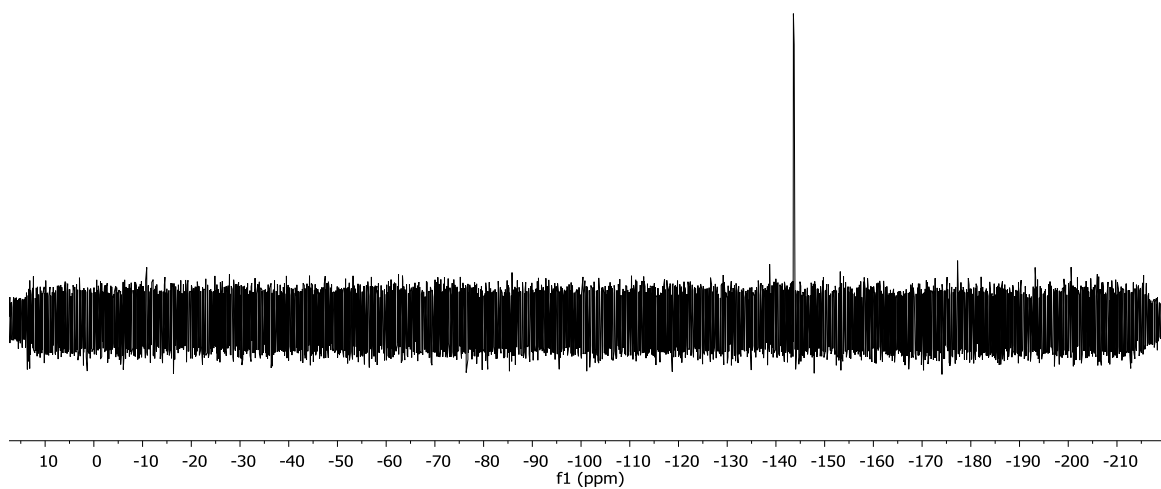


Abbildung 240: ^{19}F -NMR (376 MHz, CD_3CN) von **105**.

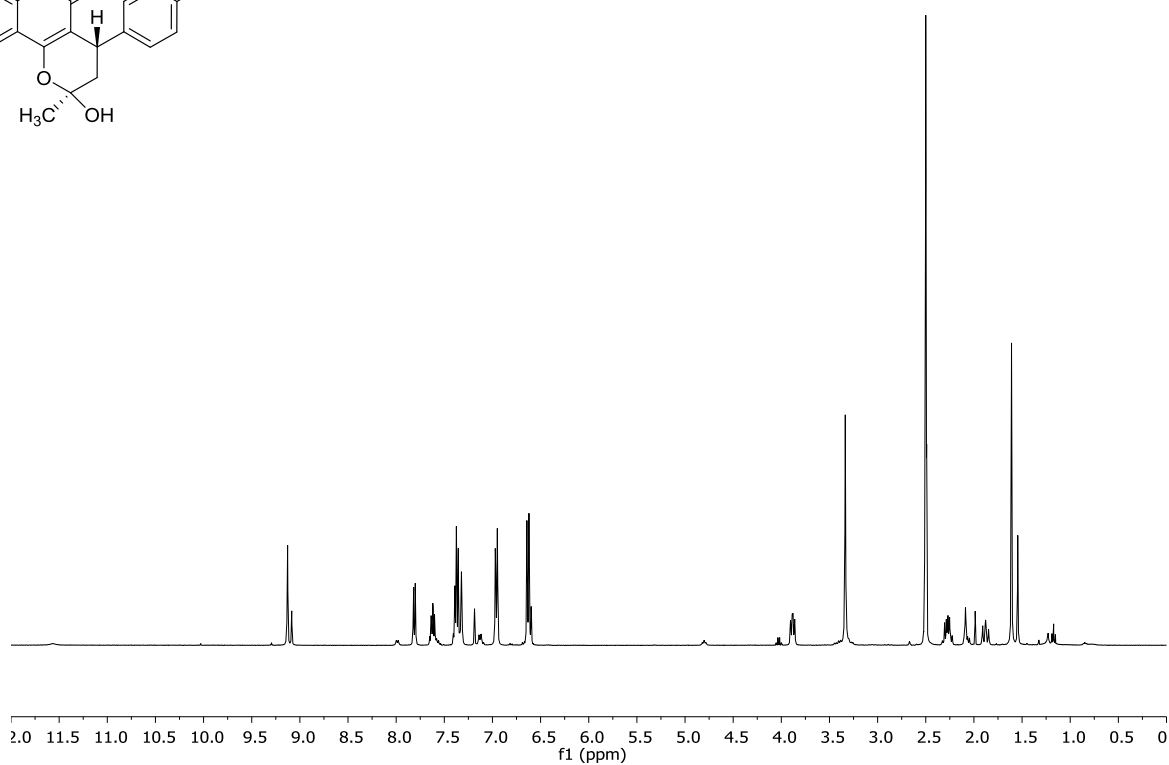
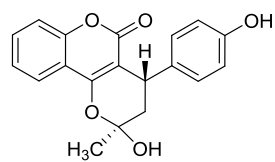


Abbildung 241: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6) von **112**.

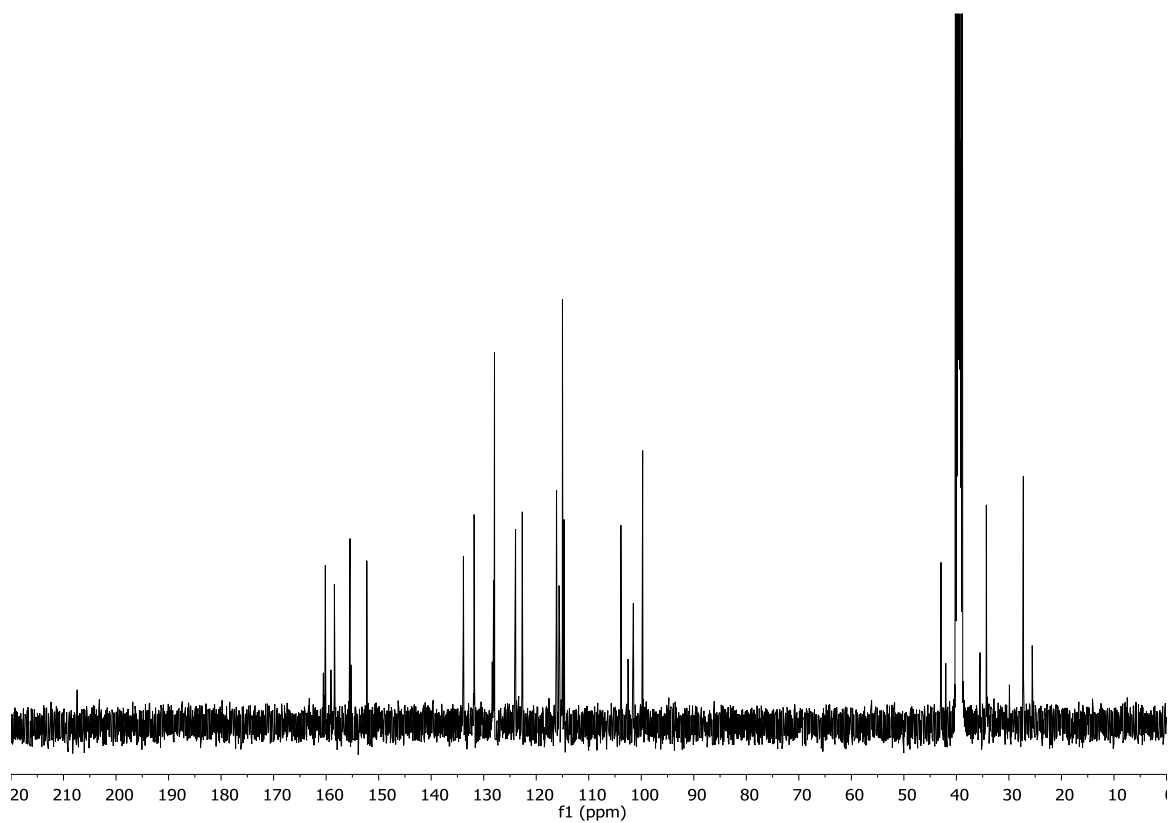


Abbildung 242: $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, Aceton- d_6) von **112**.

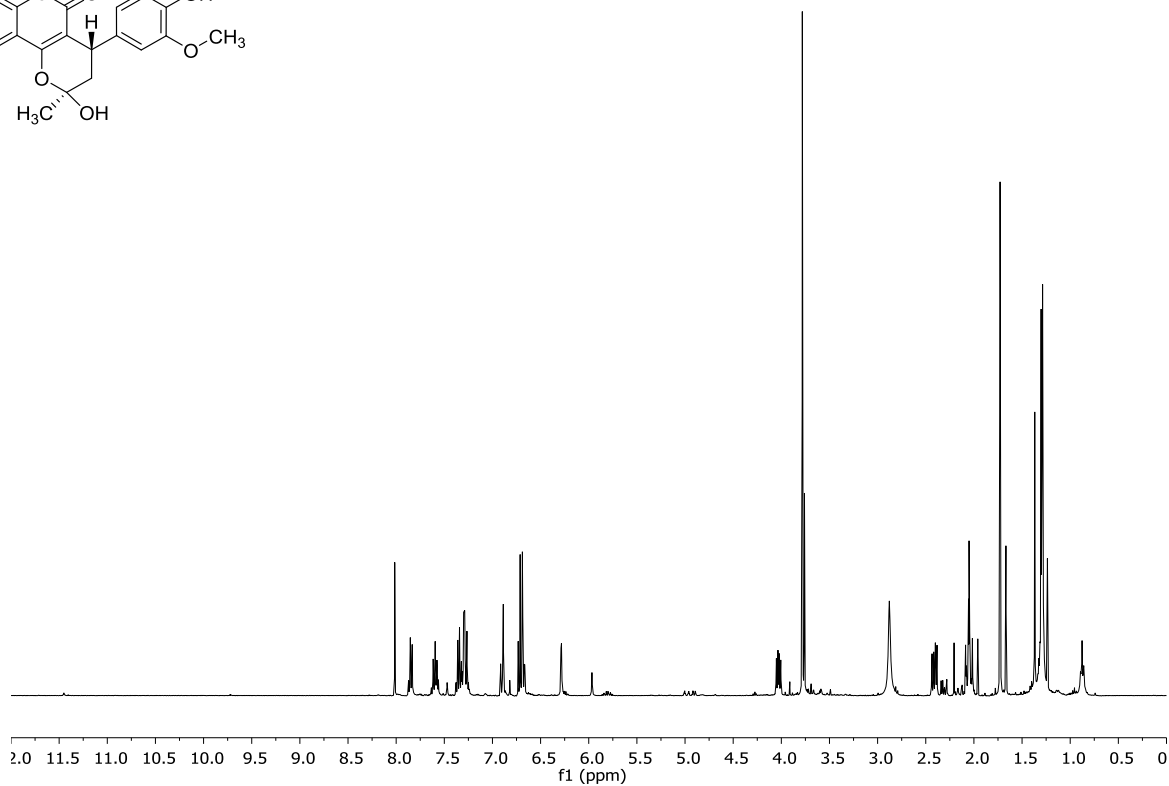
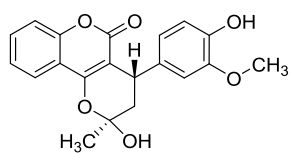


Abbildung 243: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6) von **113**.

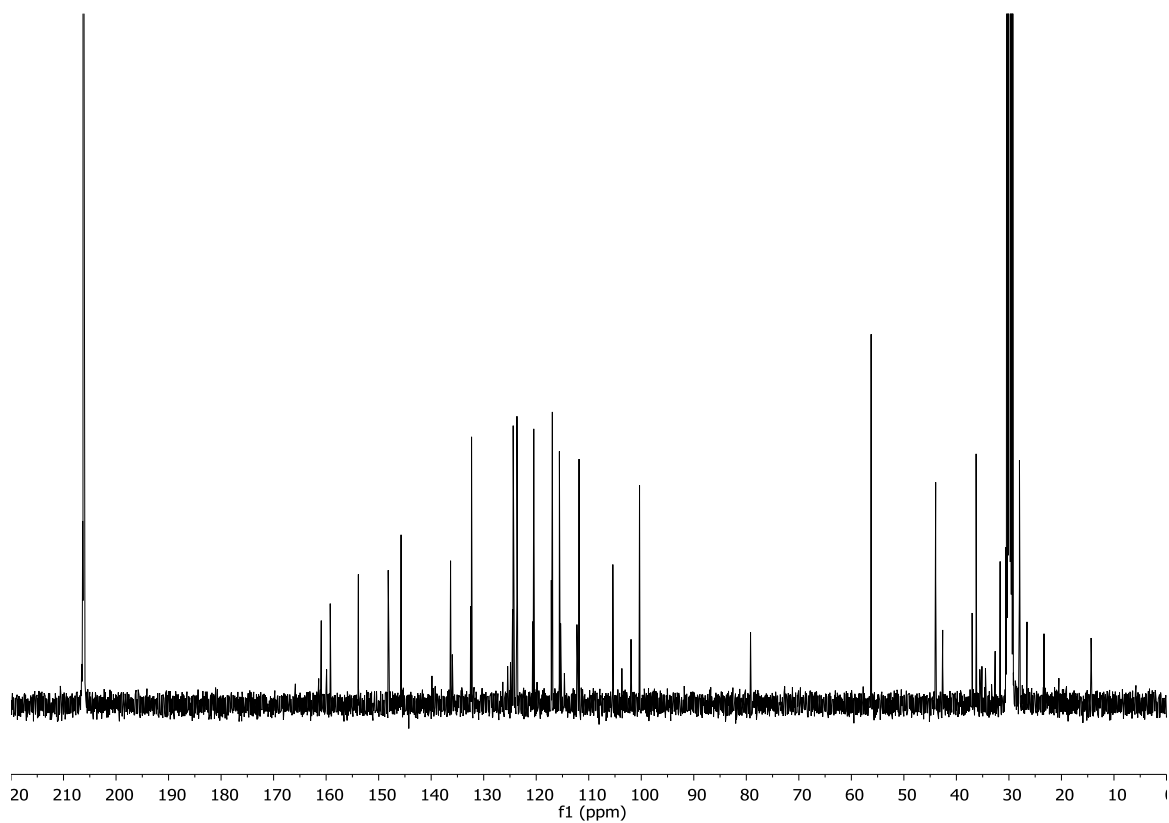


Abbildung 244: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, Aceton- d_6) von **113**.

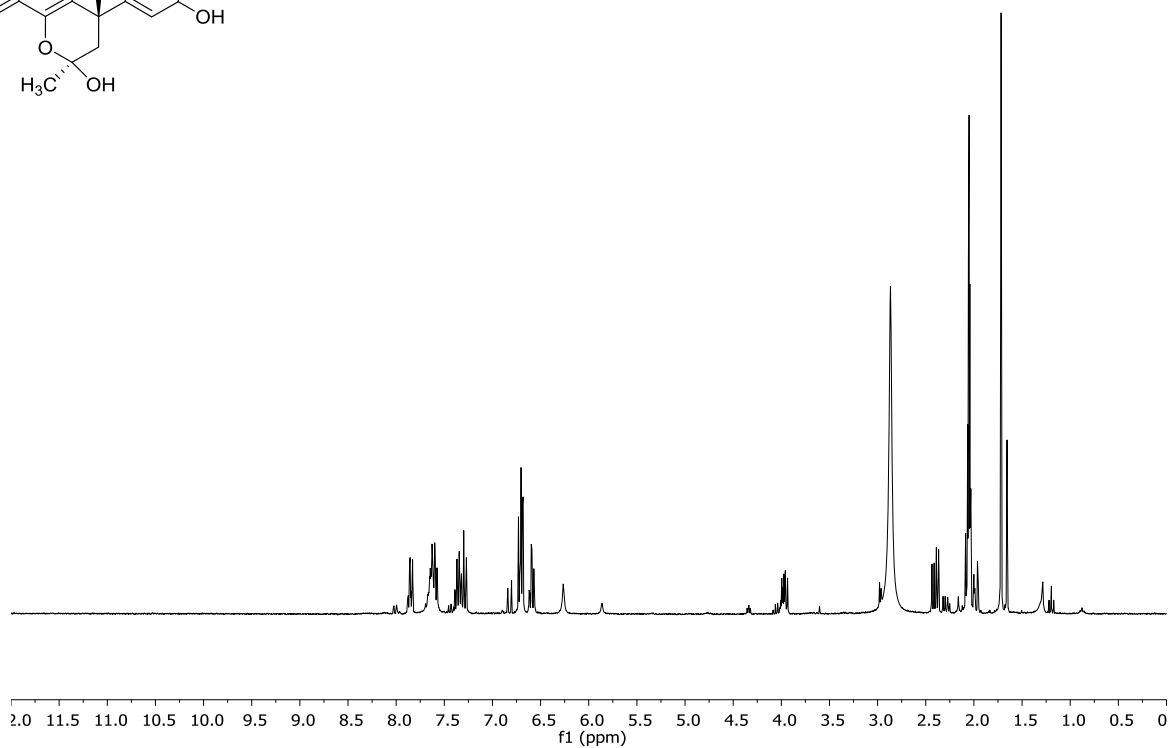
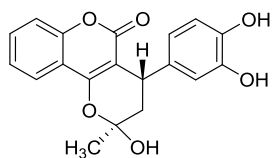


Abbildung 245: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6) von **114**.

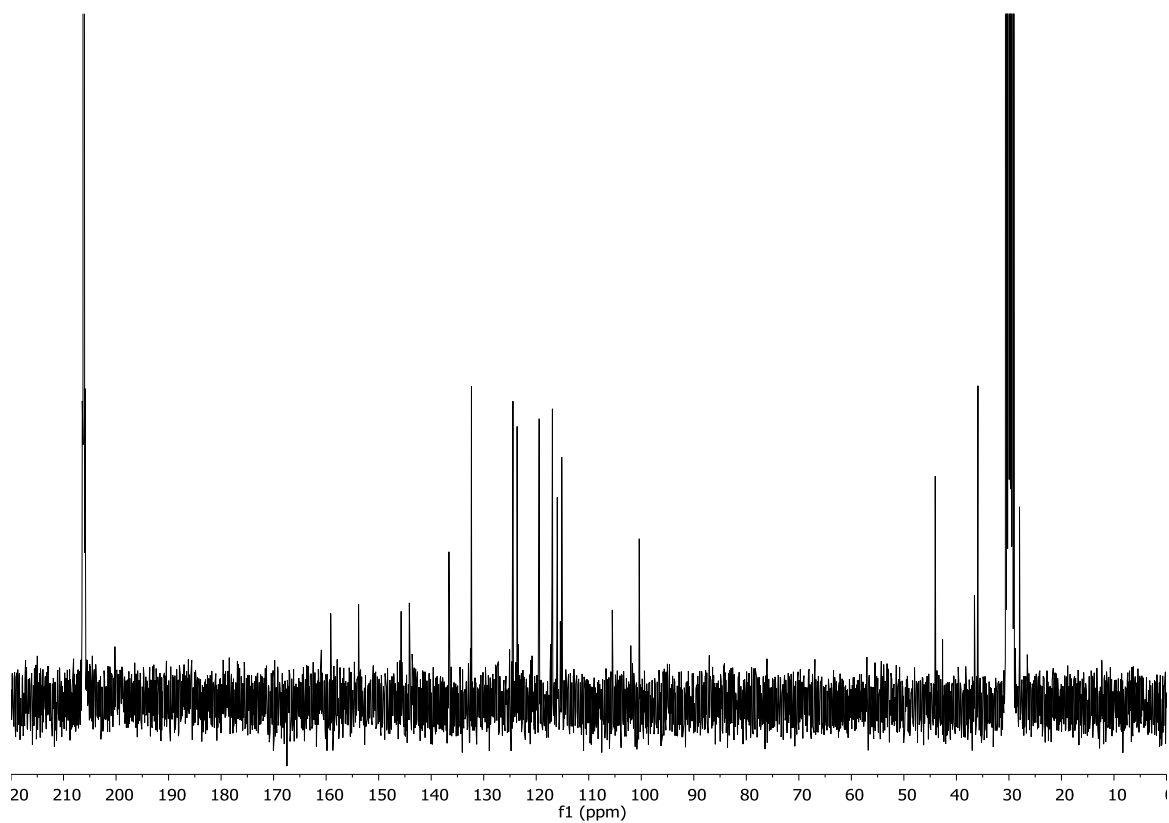


Abbildung 246: $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, Aceton- d_6) von **114**.

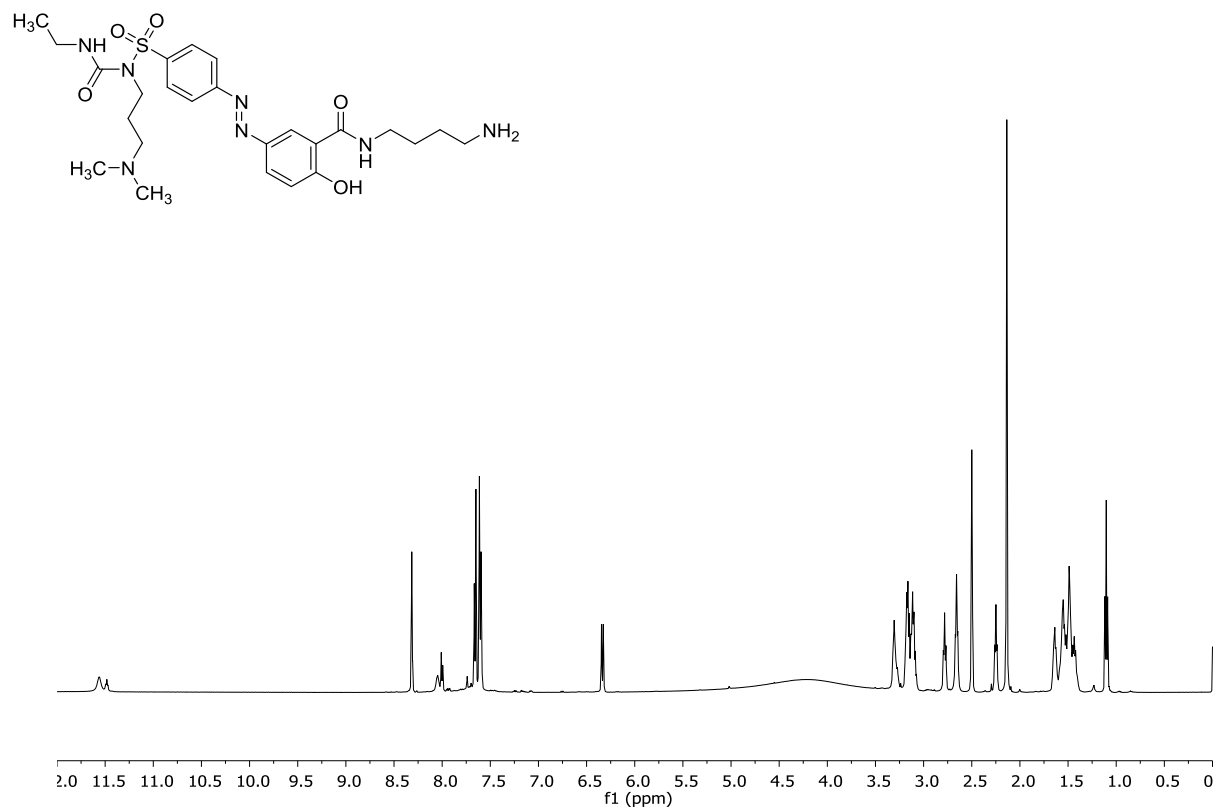


Abbildung 247: ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **129**.

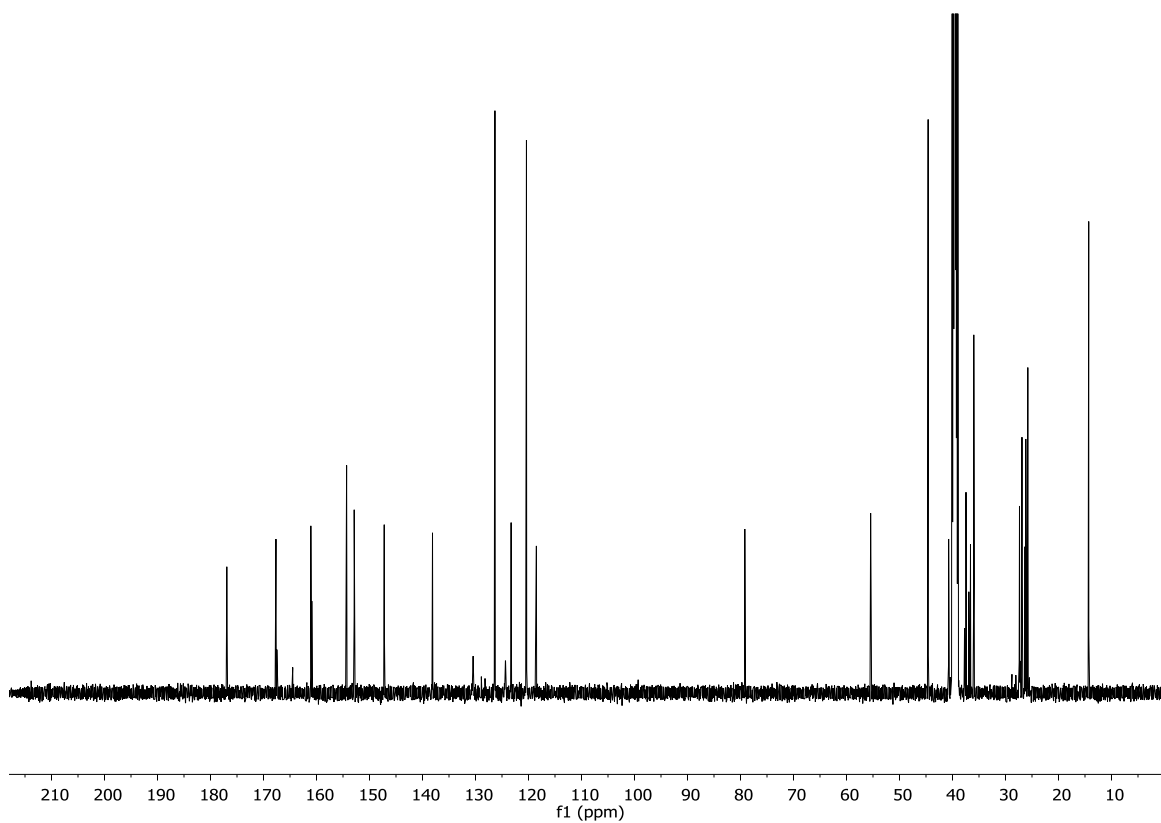


Abbildung 248: ^{13}C -NMR (125.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **129**.

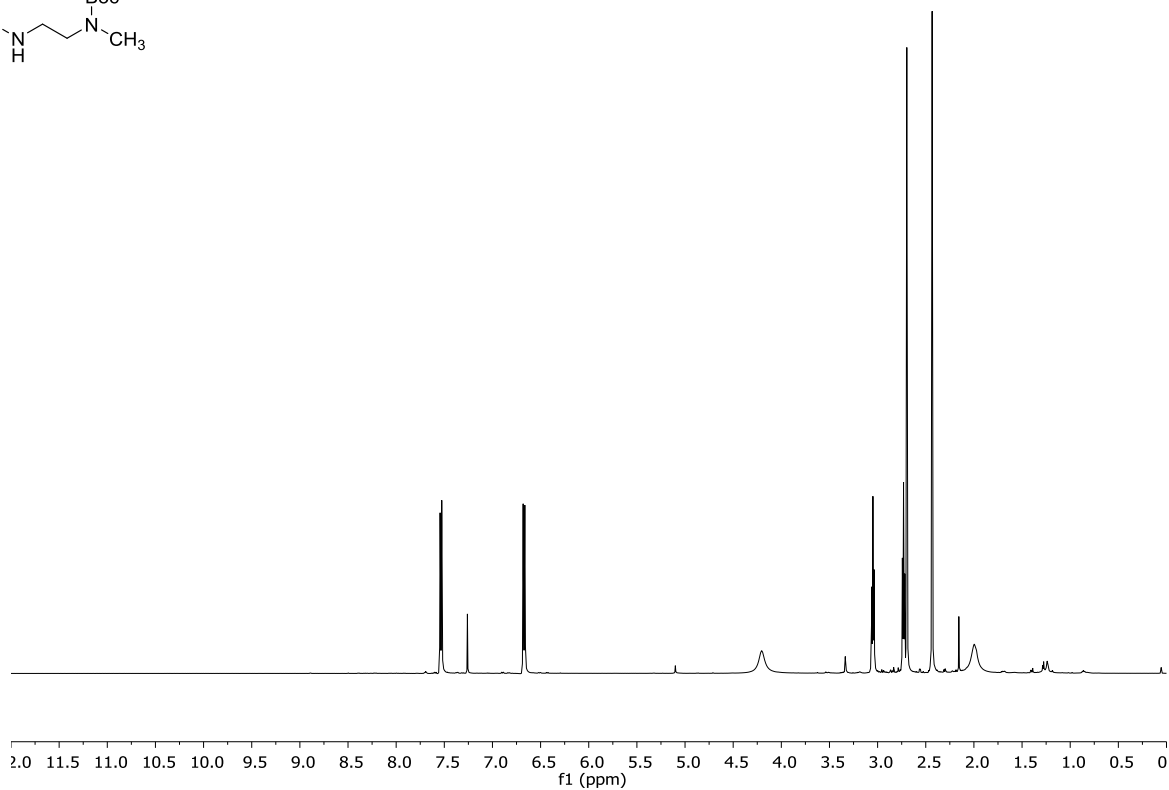
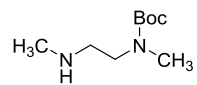


Abbildung 249: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von **131**.

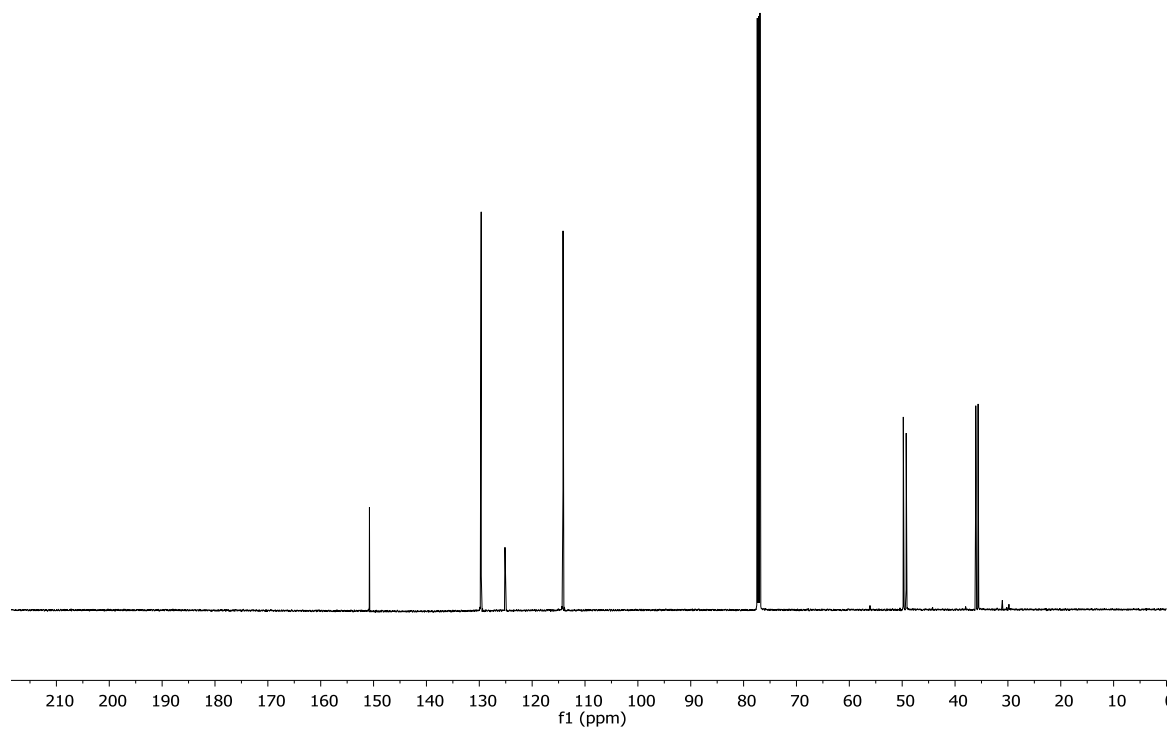


Abbildung 250: $^{13}\text{C-NMR}$ (125.6 MHz, CDCl_3) von **131**.

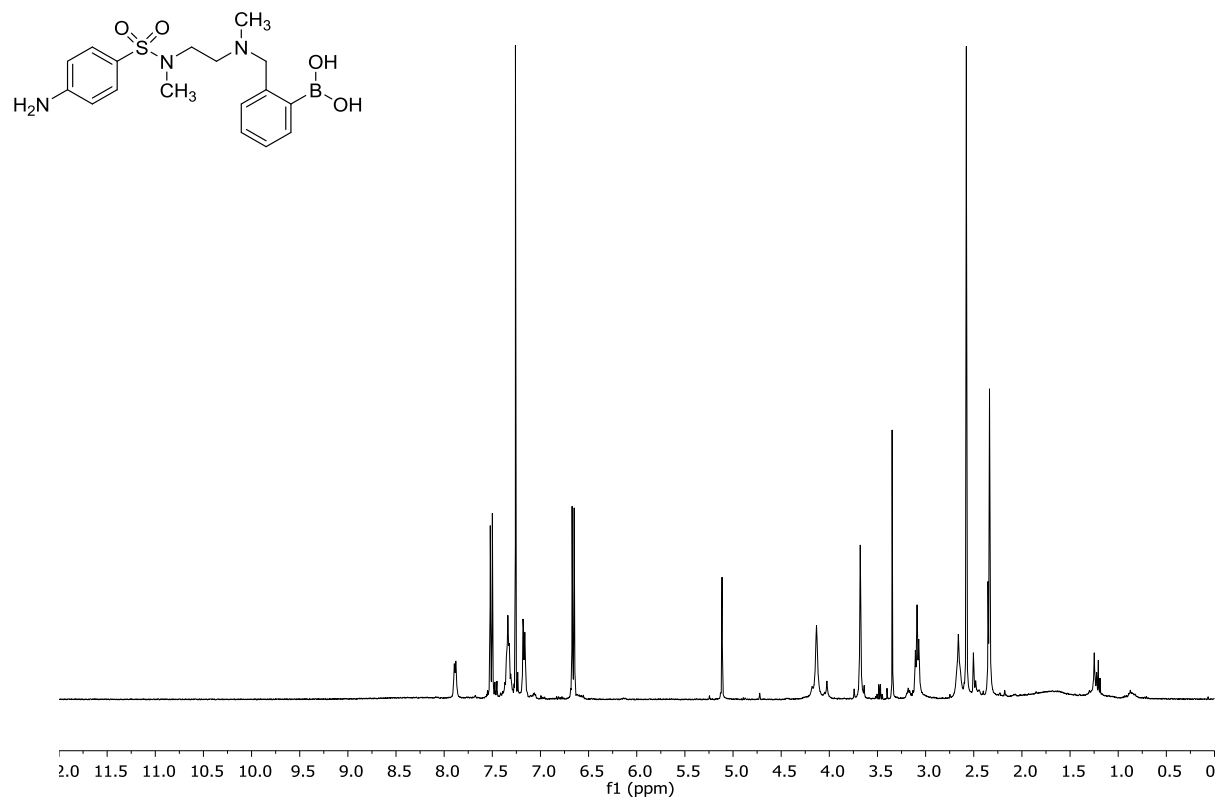


Abbildung 251: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) von **132**.

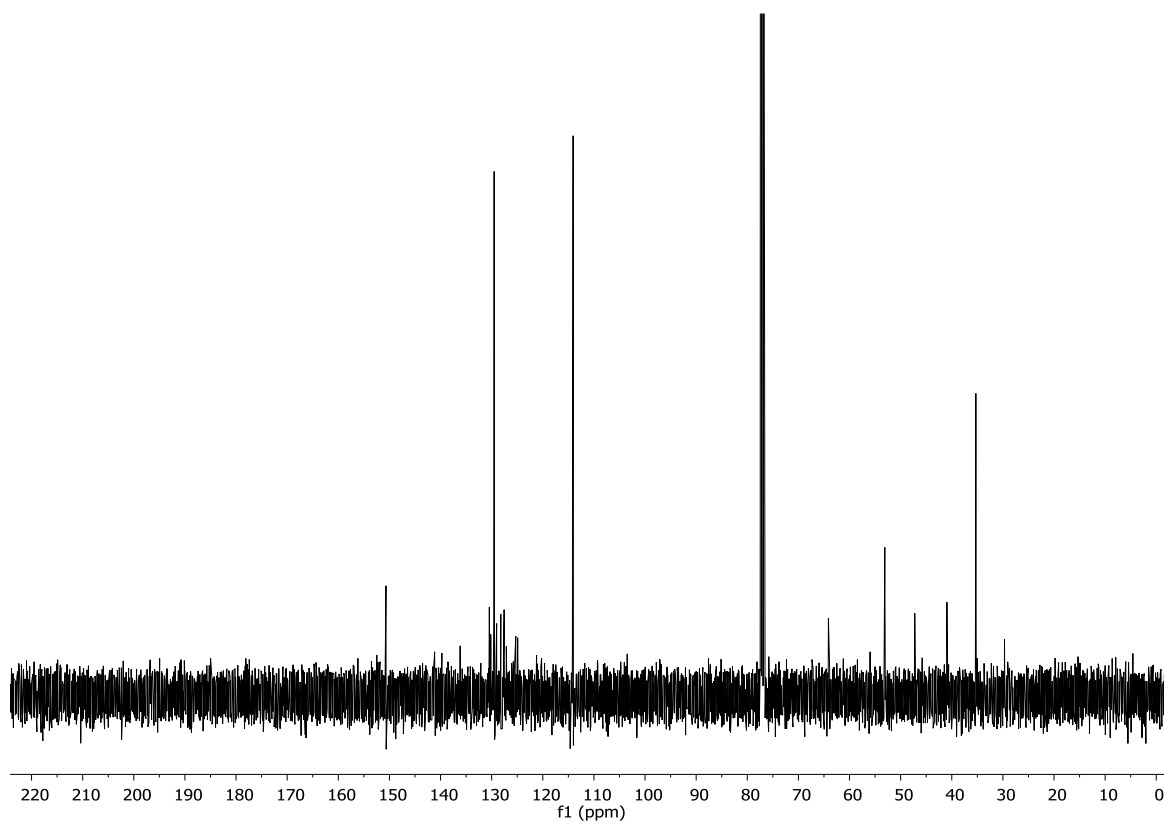


Abbildung 252: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3) von **132**.

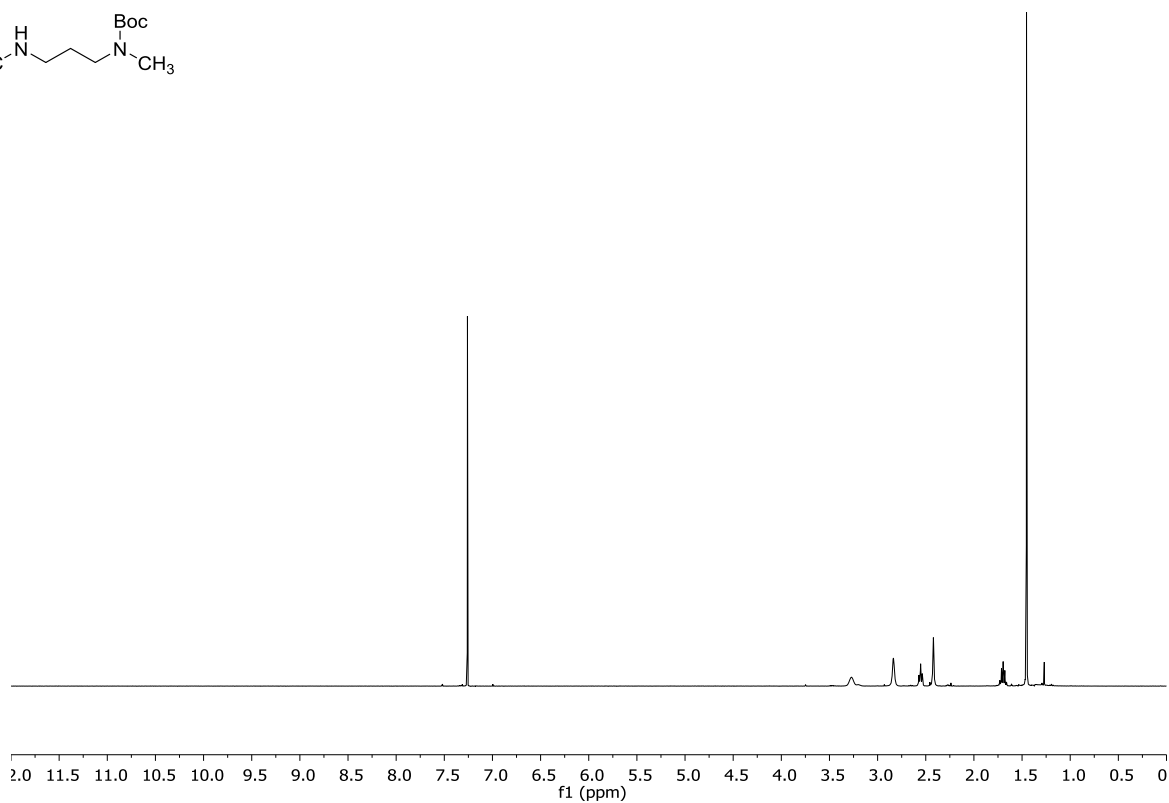
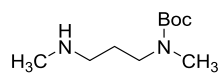


Abbildung 253: ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von **135**.

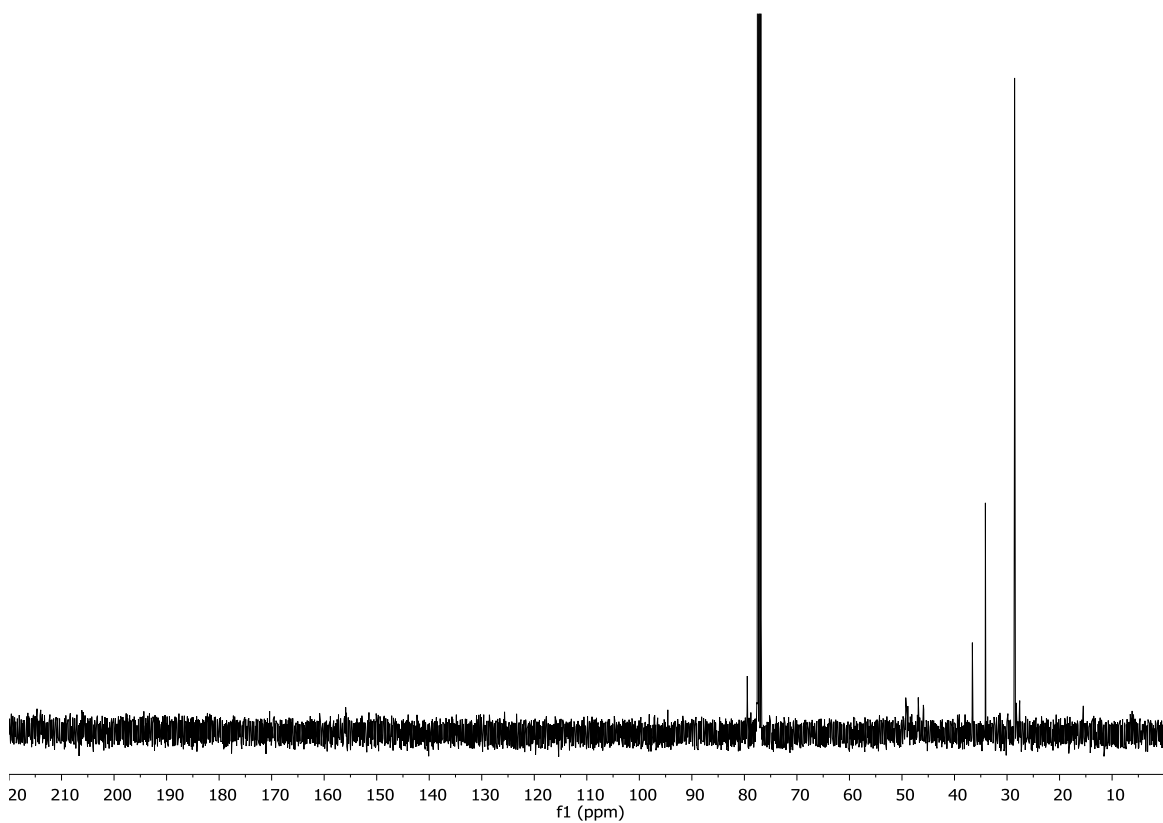


Abbildung 254: ^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3) von **135**.

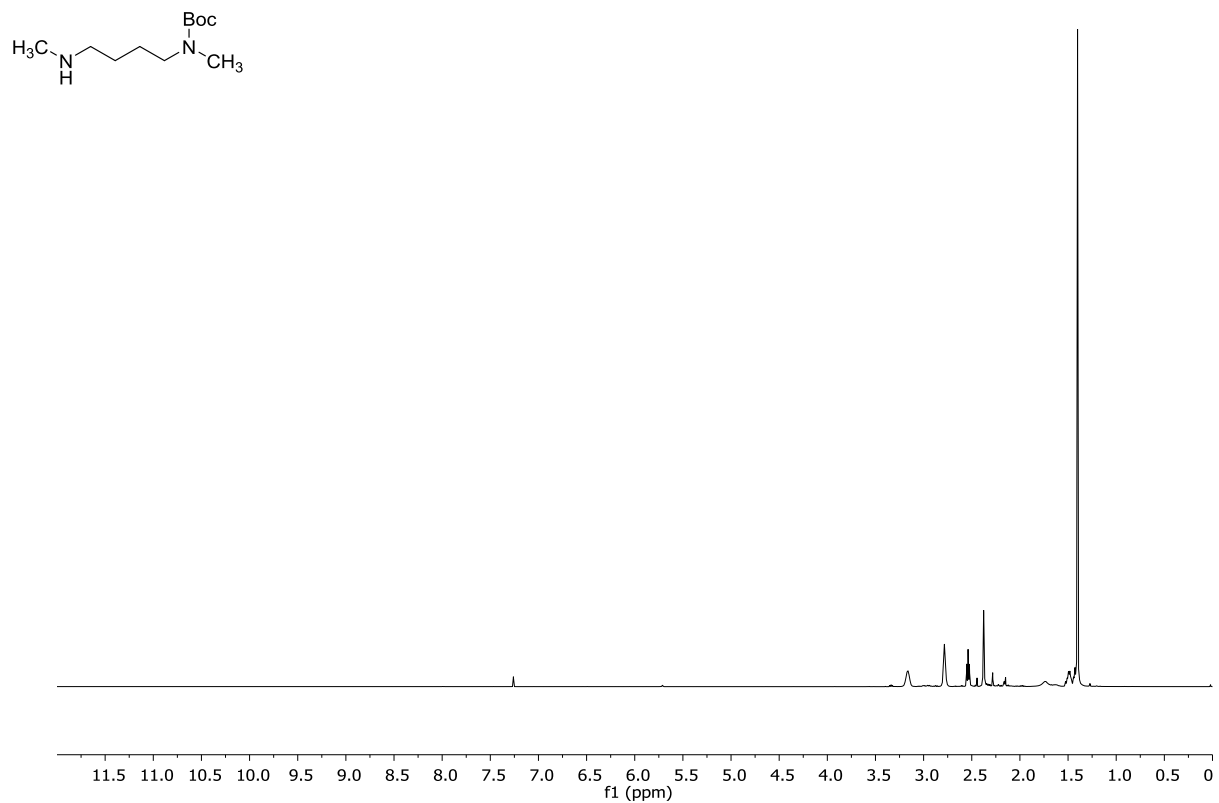


Abbildung 255: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) von **136**.

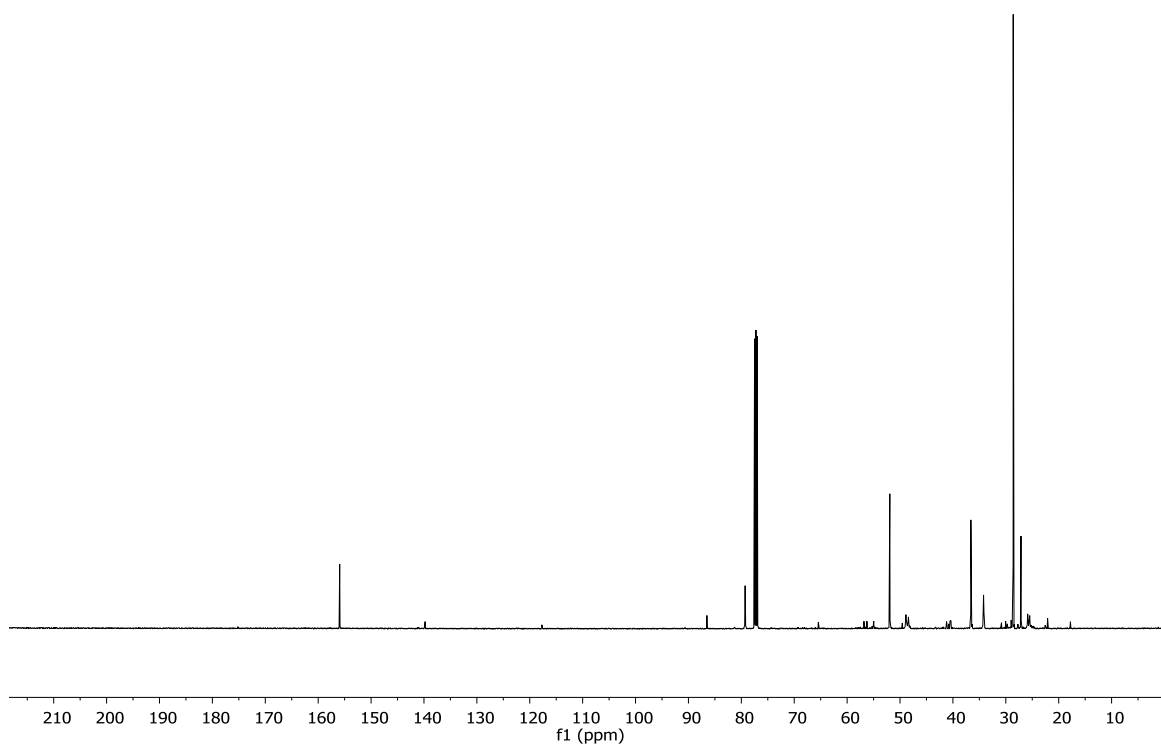


Abbildung 256: ^{13}C -NMR (125.6 MHz, CDCl_3) von **136**.

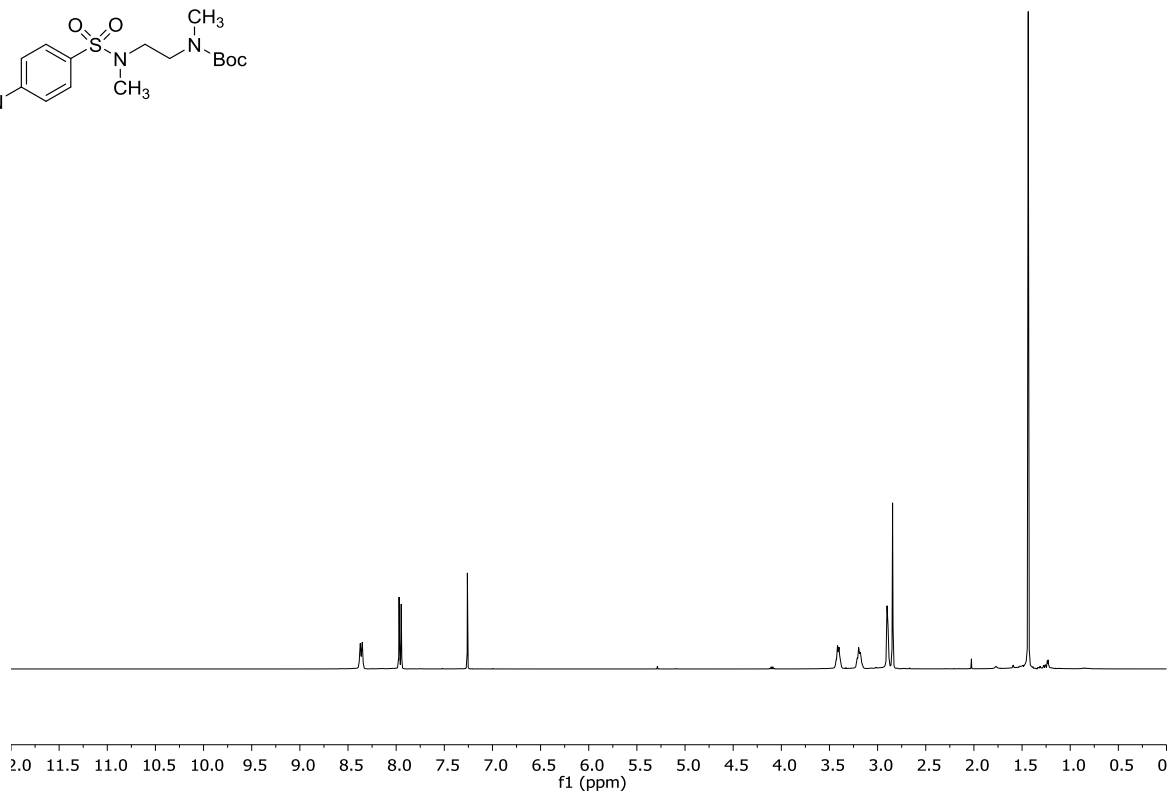
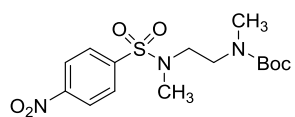


Abbildung 257: ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von **137**.

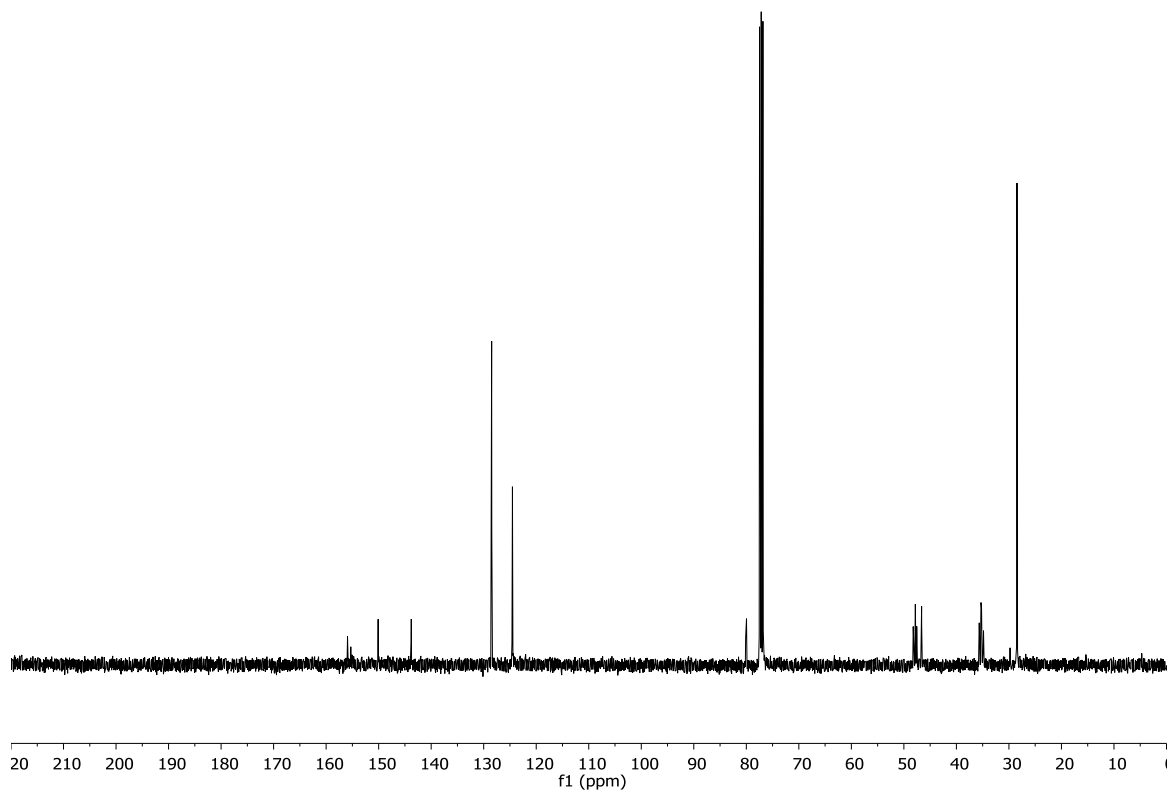


Abbildung 258: ^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3) von **137**.

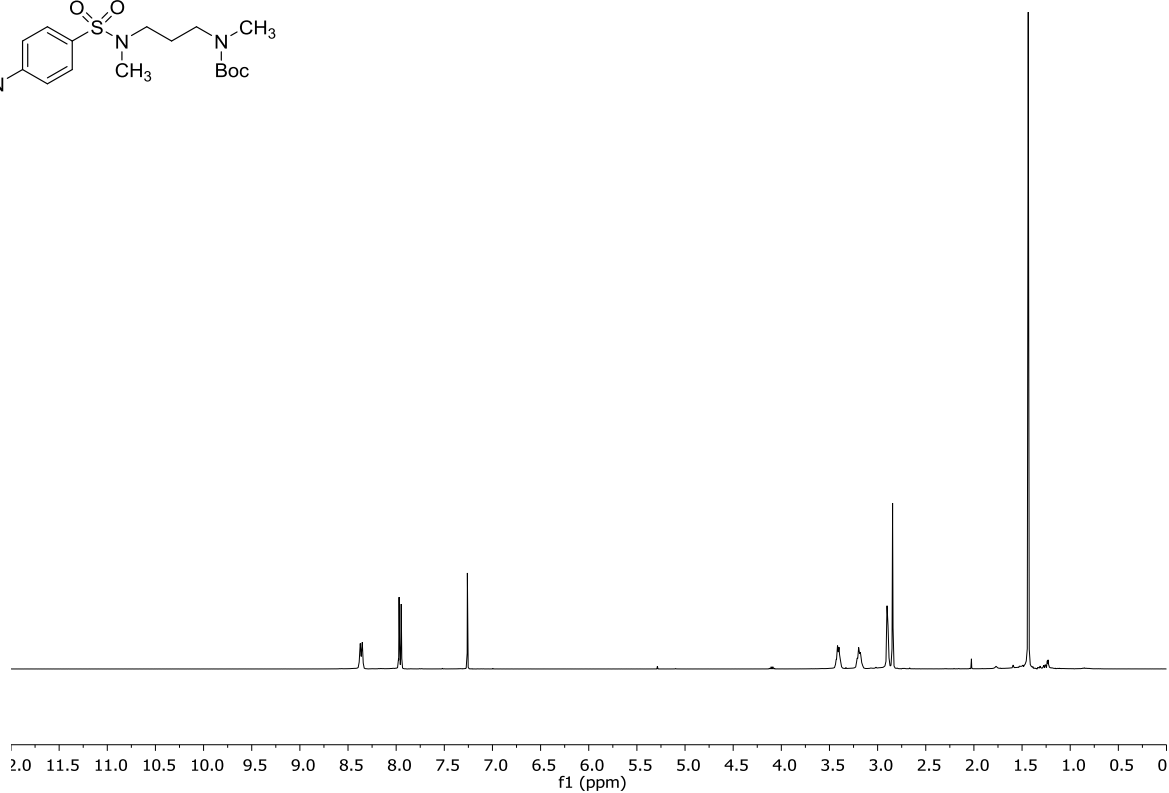
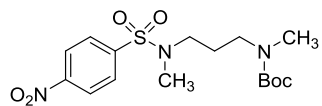


Abbildung 259: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) von **138**.

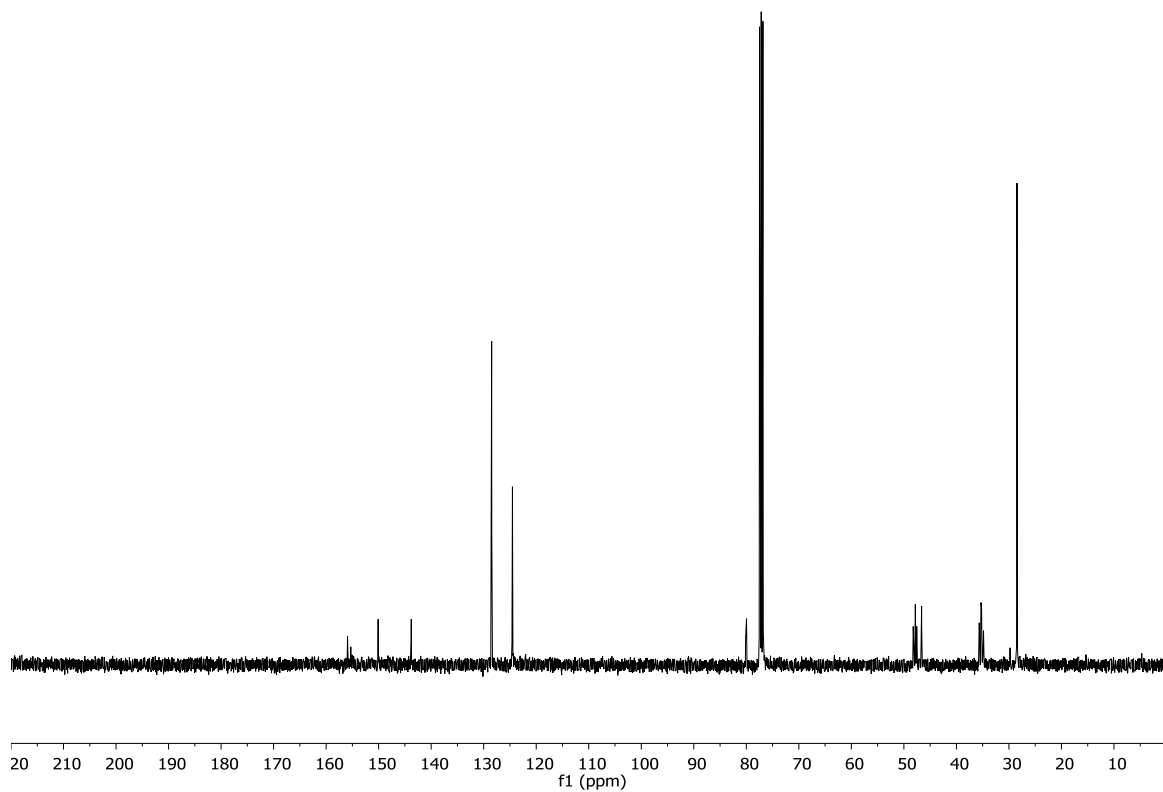


Abbildung 260: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3) von **138**.

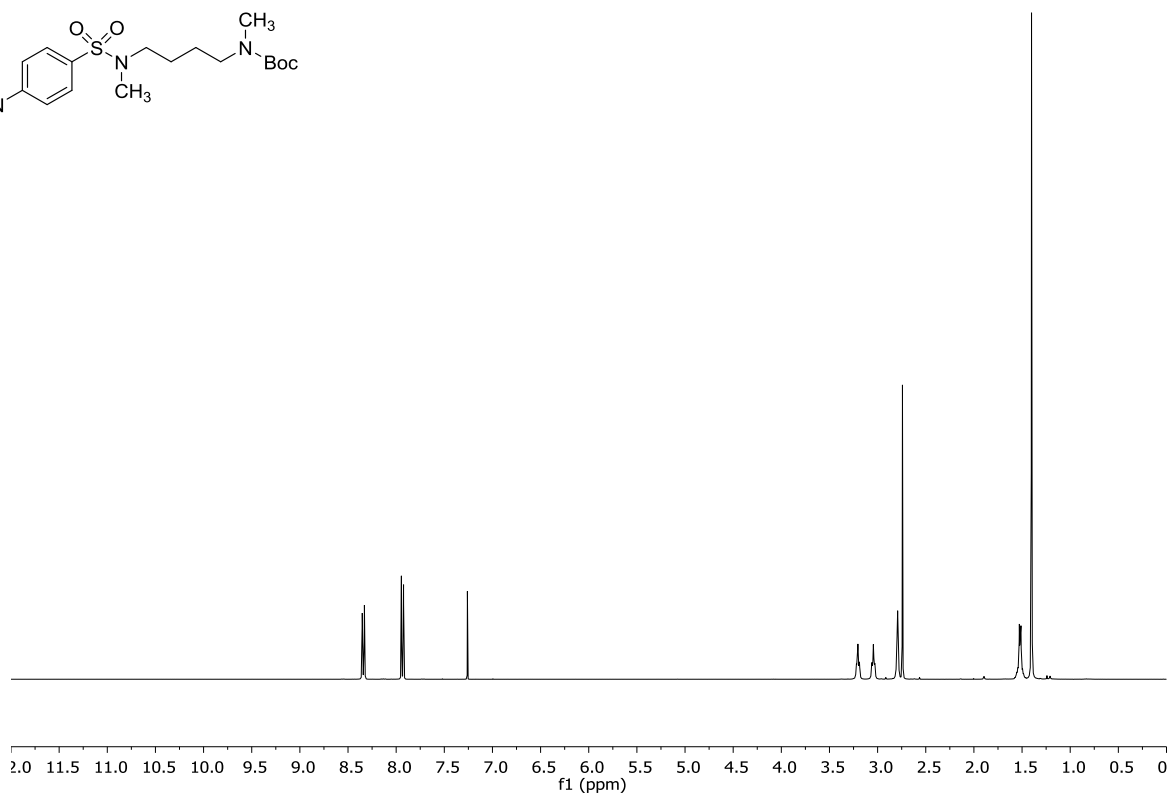
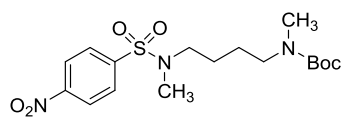


Abbildung 261: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) von **139**.

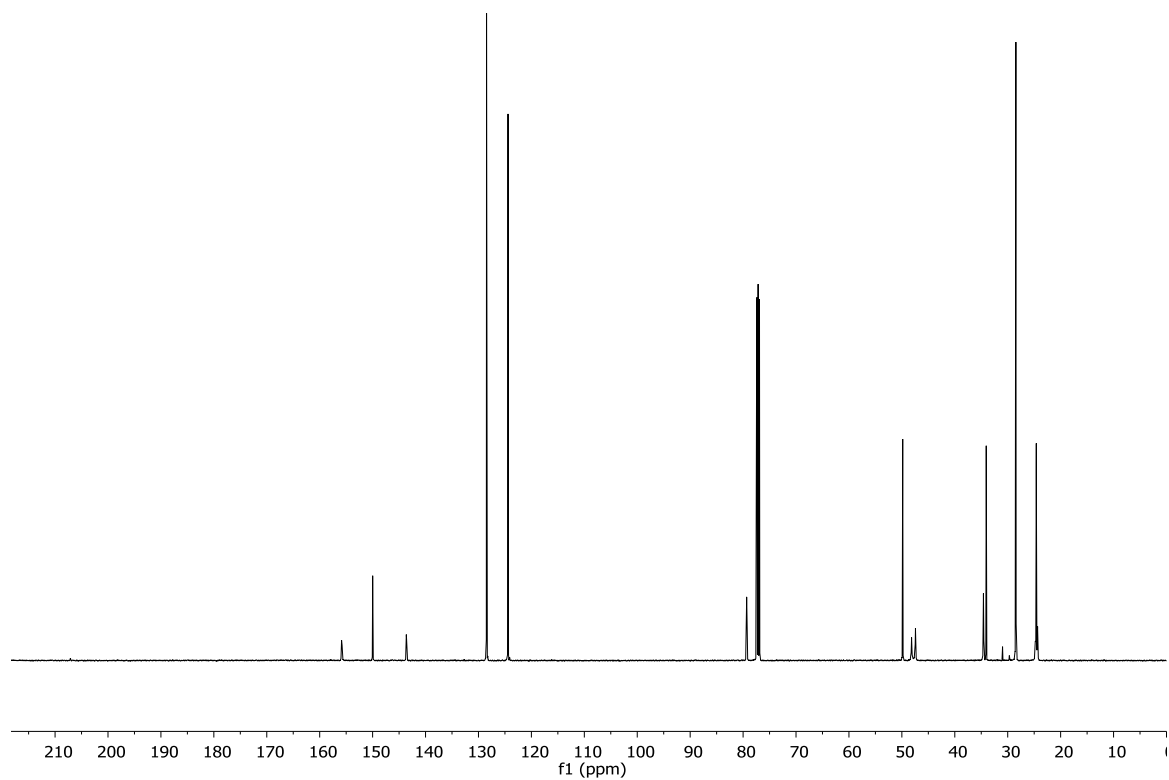
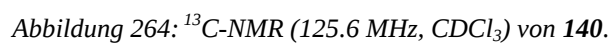
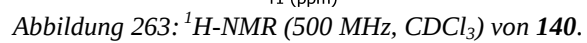


Abbildung 262: $^{13}\text{C-NMR}$ (125.6 MHz, CDCl_3) von **139**.



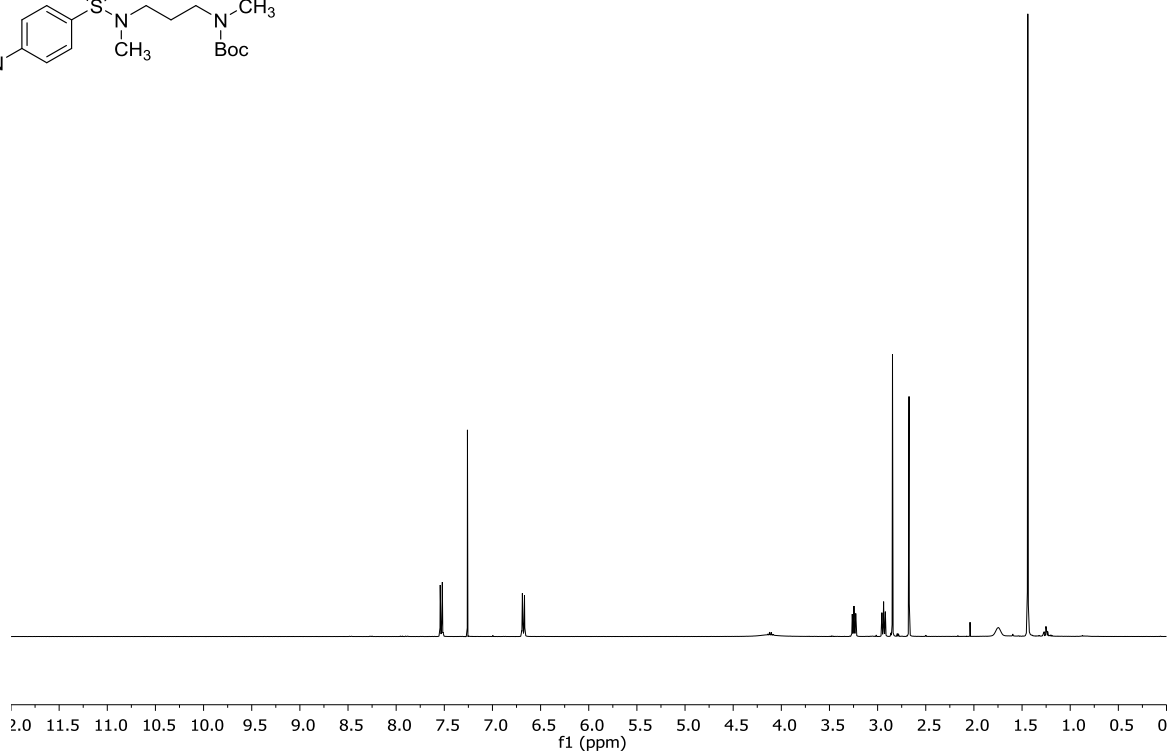
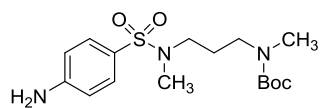


Abbildung 265: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) von **141**.

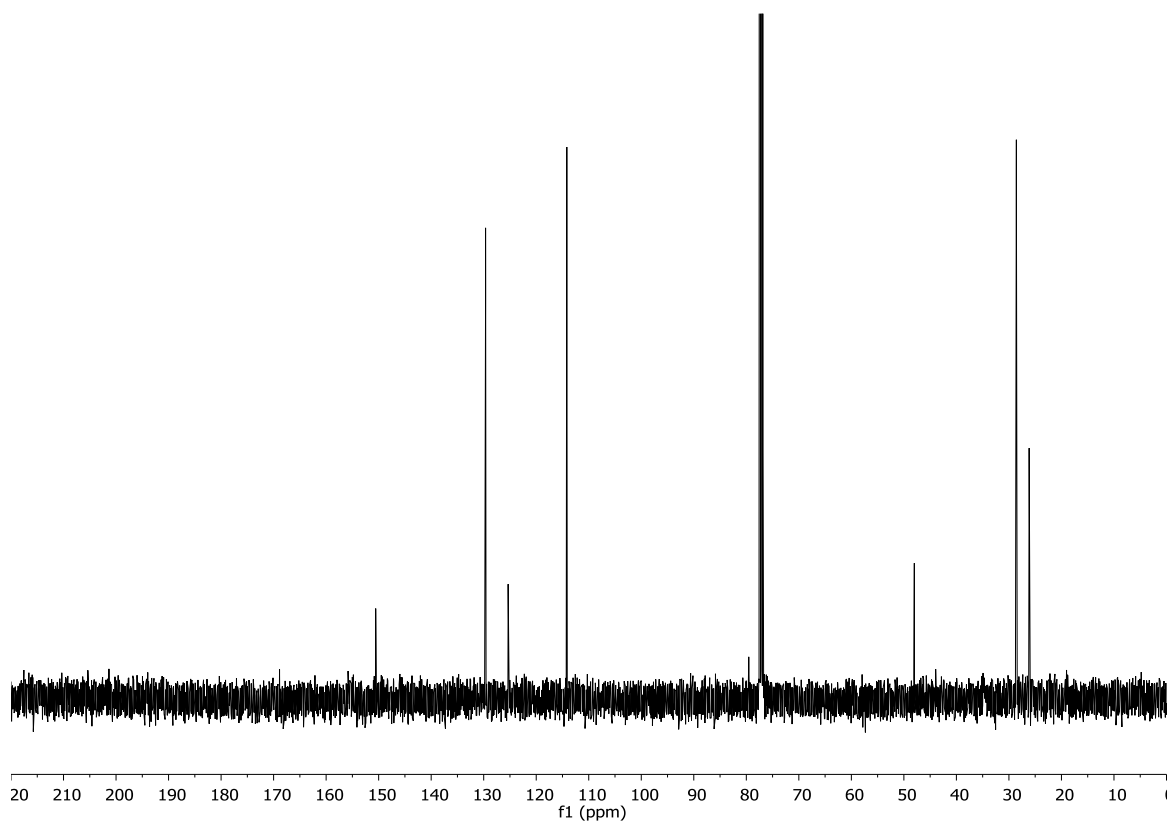


Abbildung 266: $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3) von **141**.

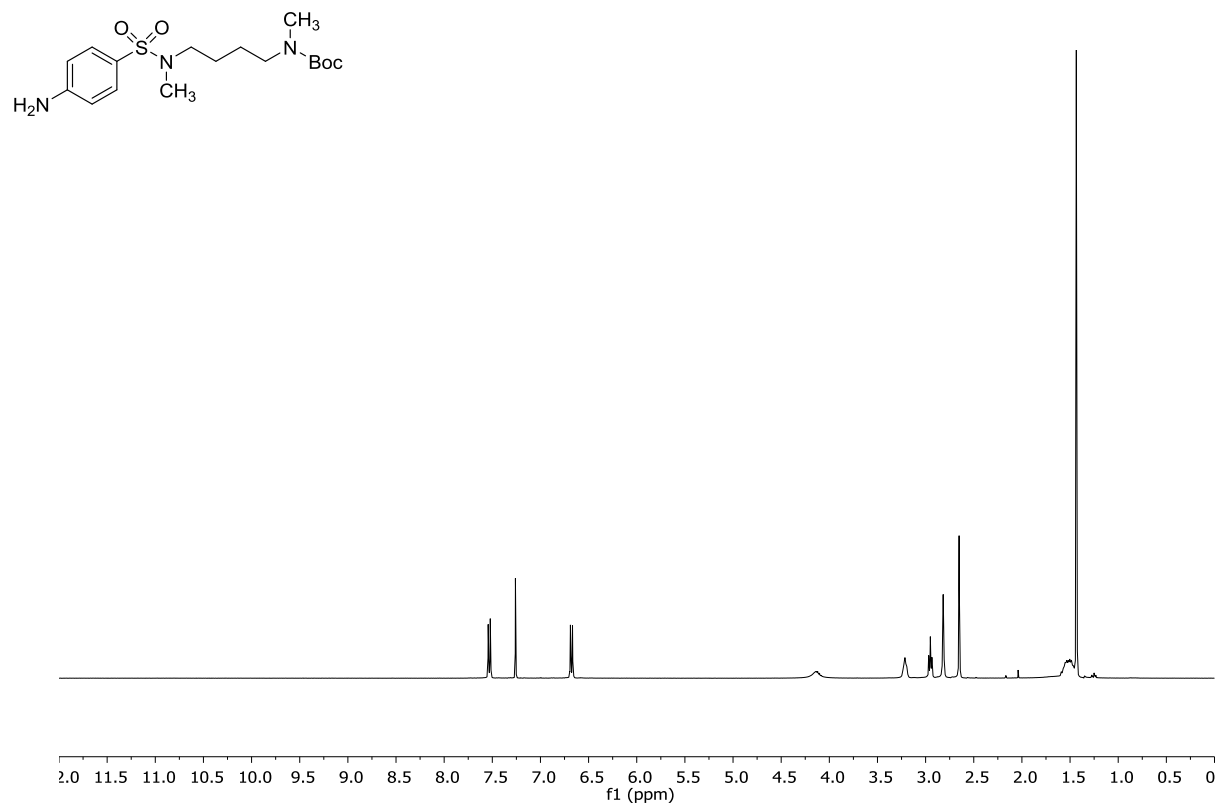


Abbildung 267: ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von **142**.

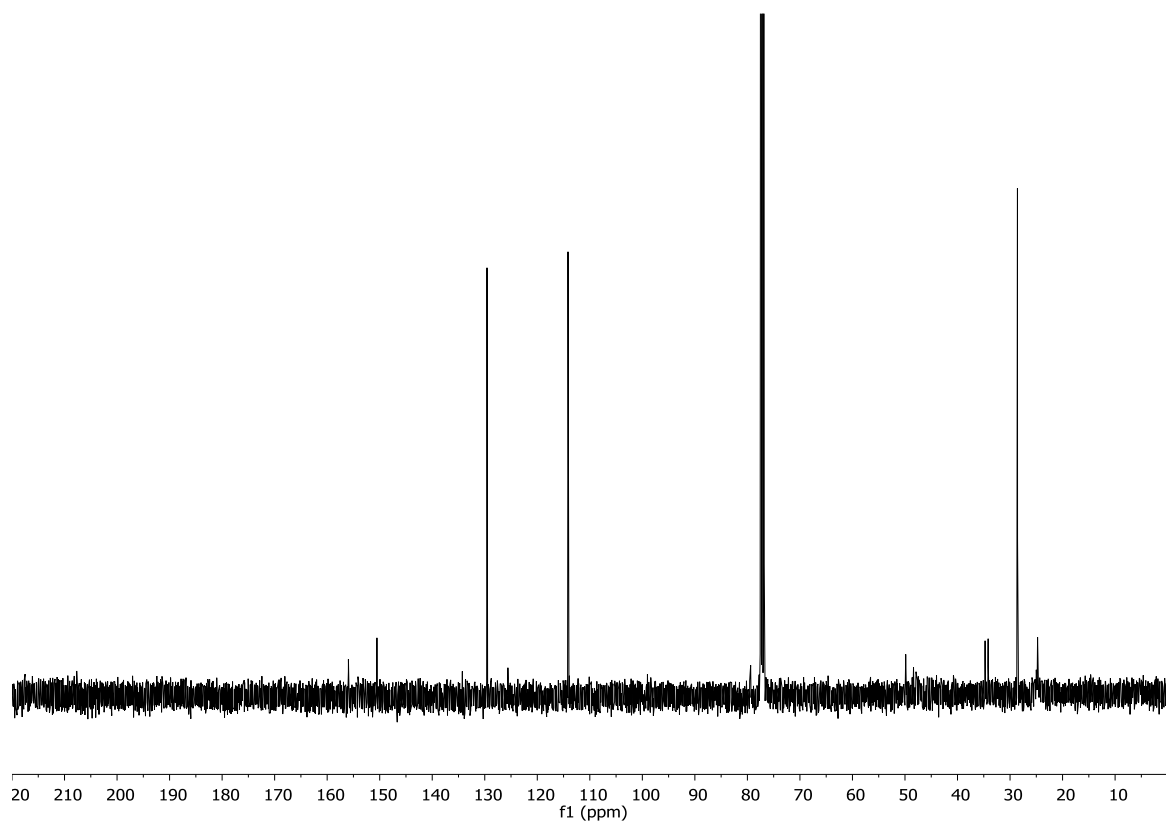


Abbildung 268: ^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3) von **142**.

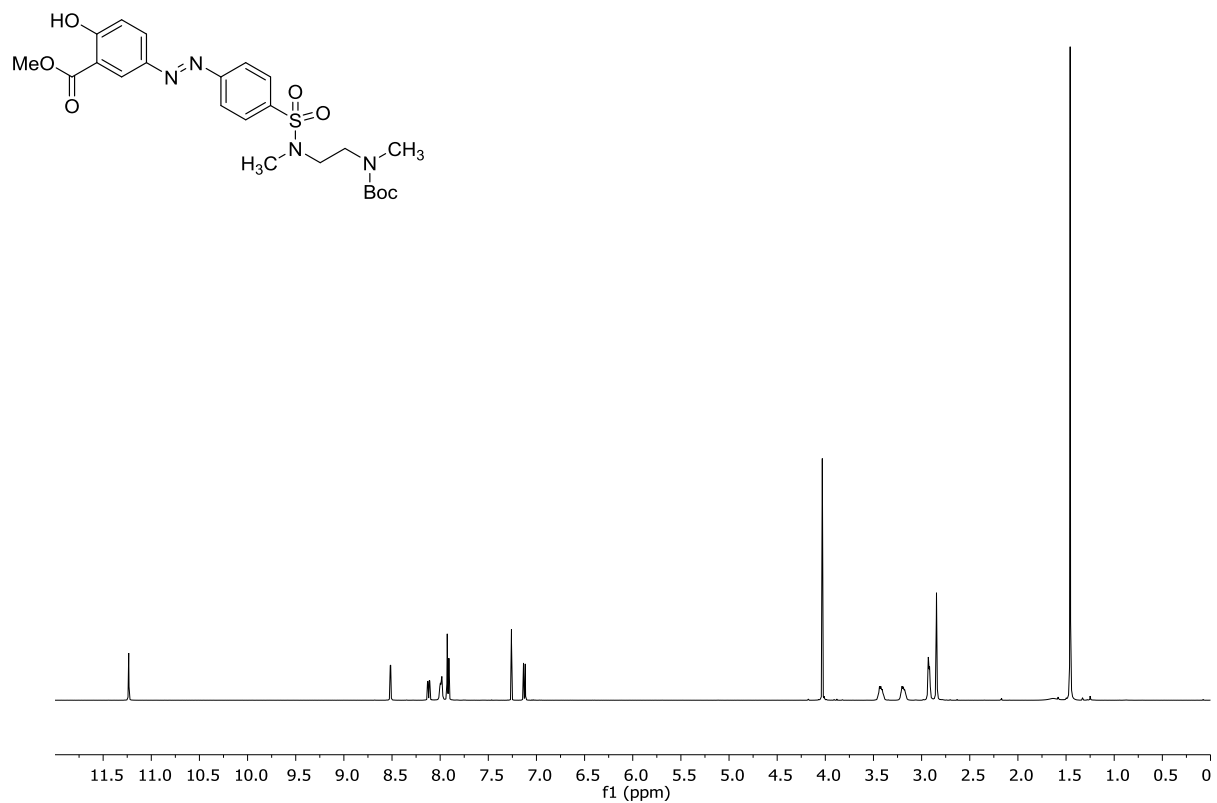


Abbildung 269: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von **143**.

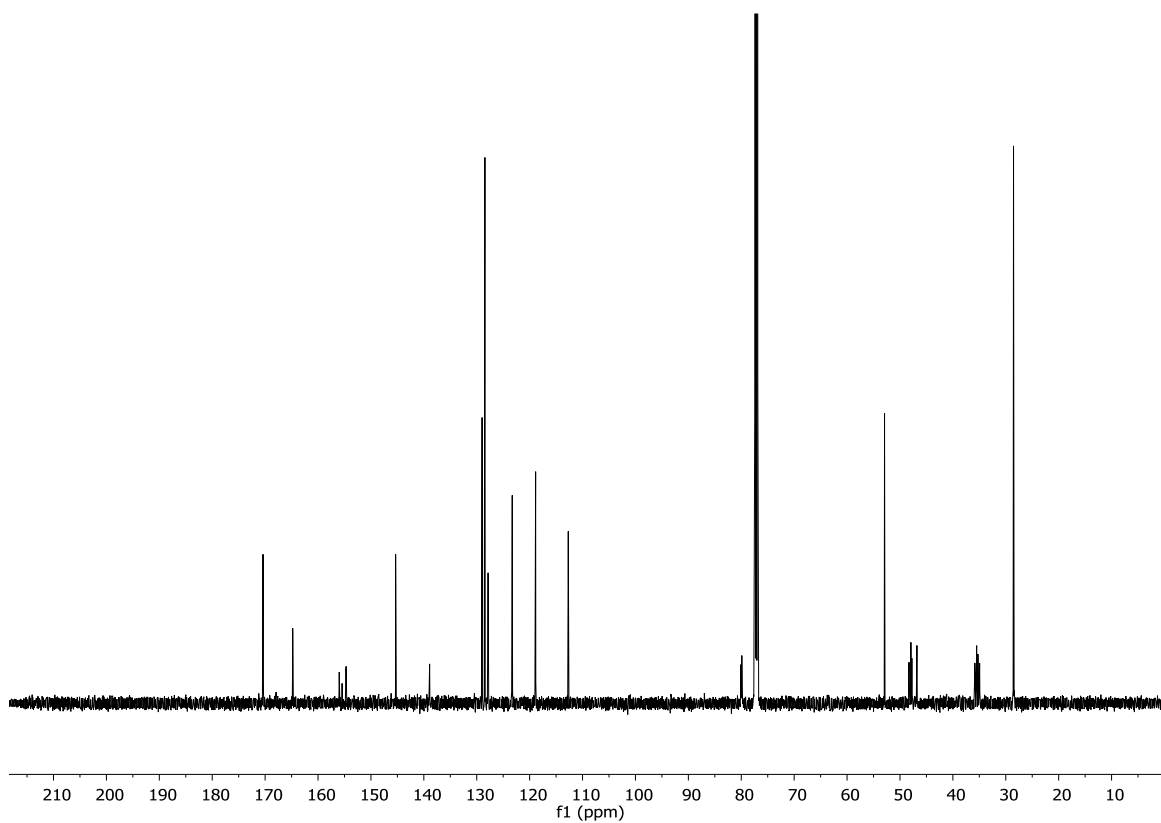
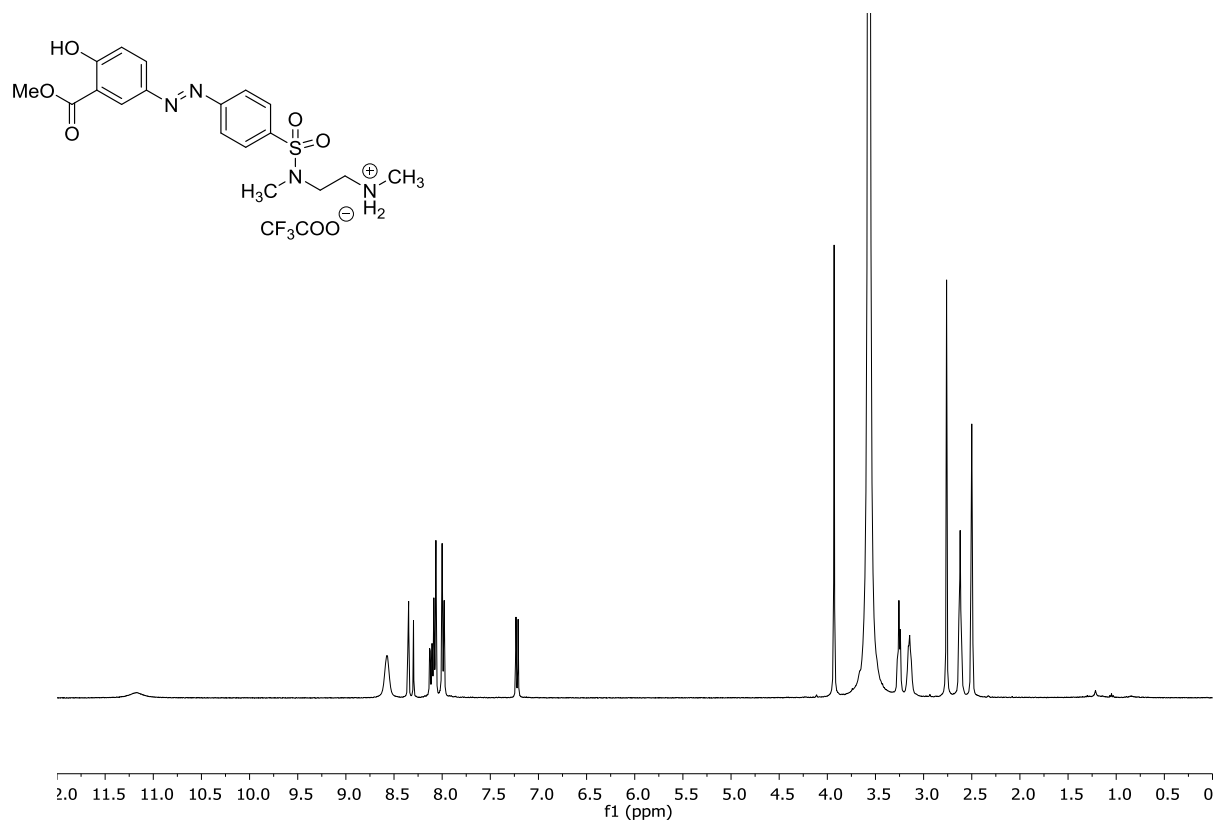
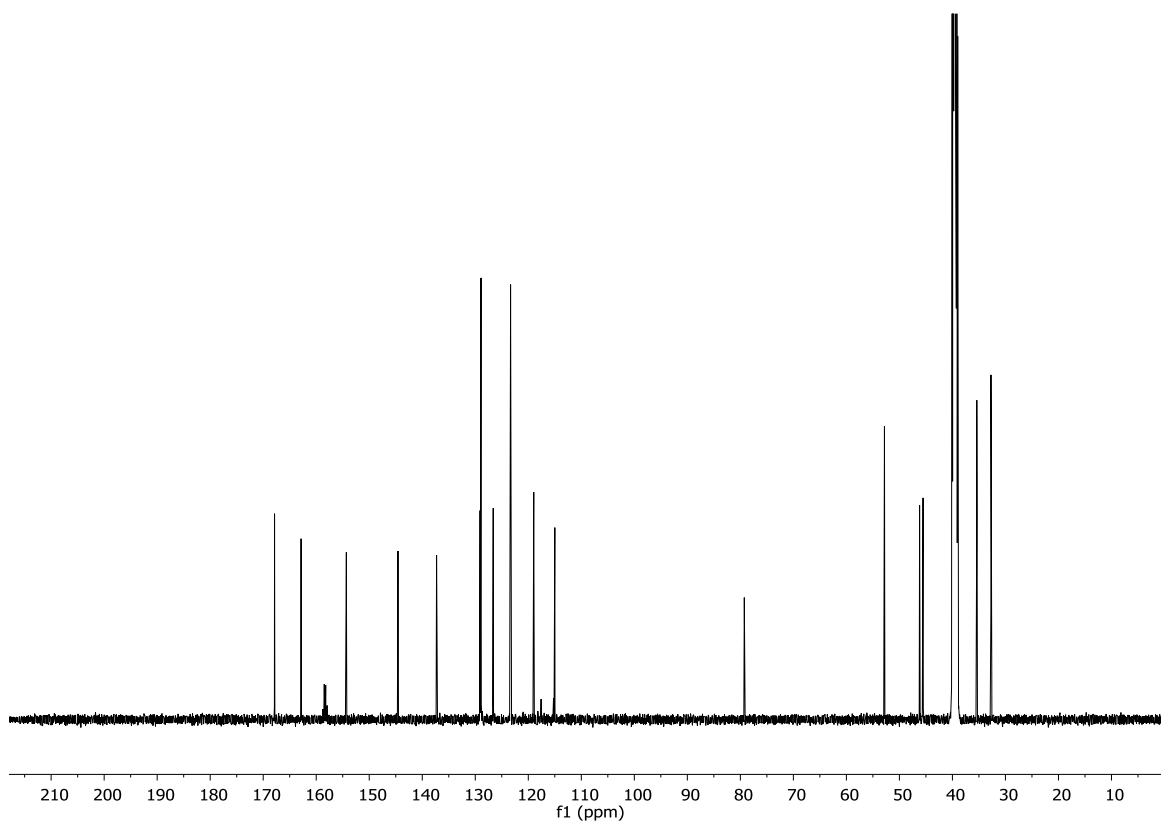


Abbildung 270: $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, CDCl_3) von **143**.

Abbildung 271: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) von **144**.Abbildung 272: $^{13}\text{C-NMR}$ (125.6 MHz, DMSO-d_6) von **144**.

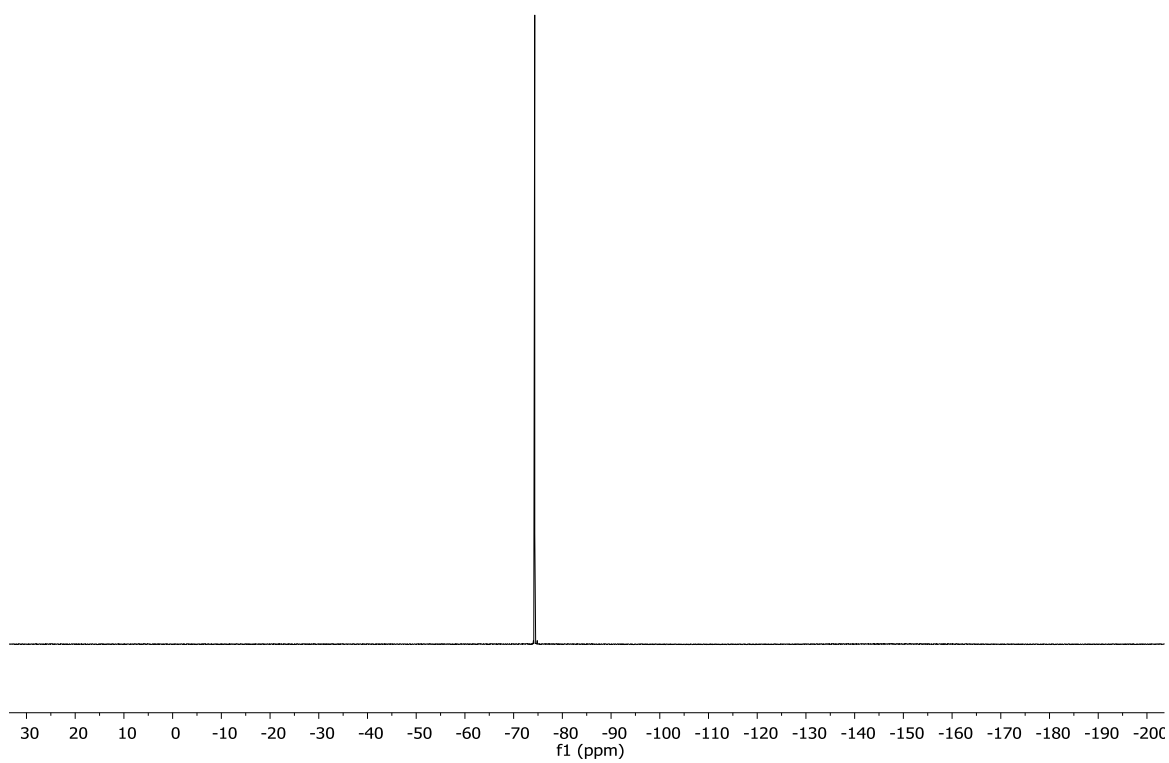
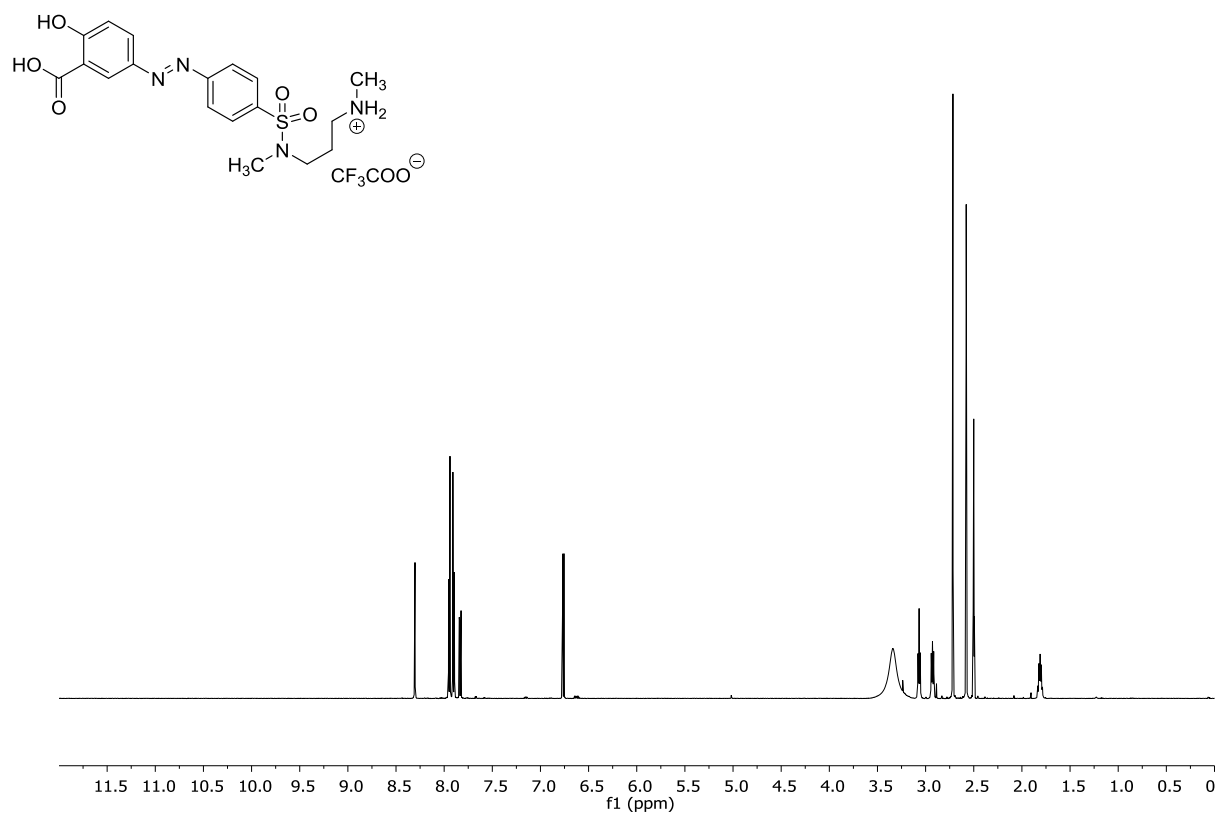
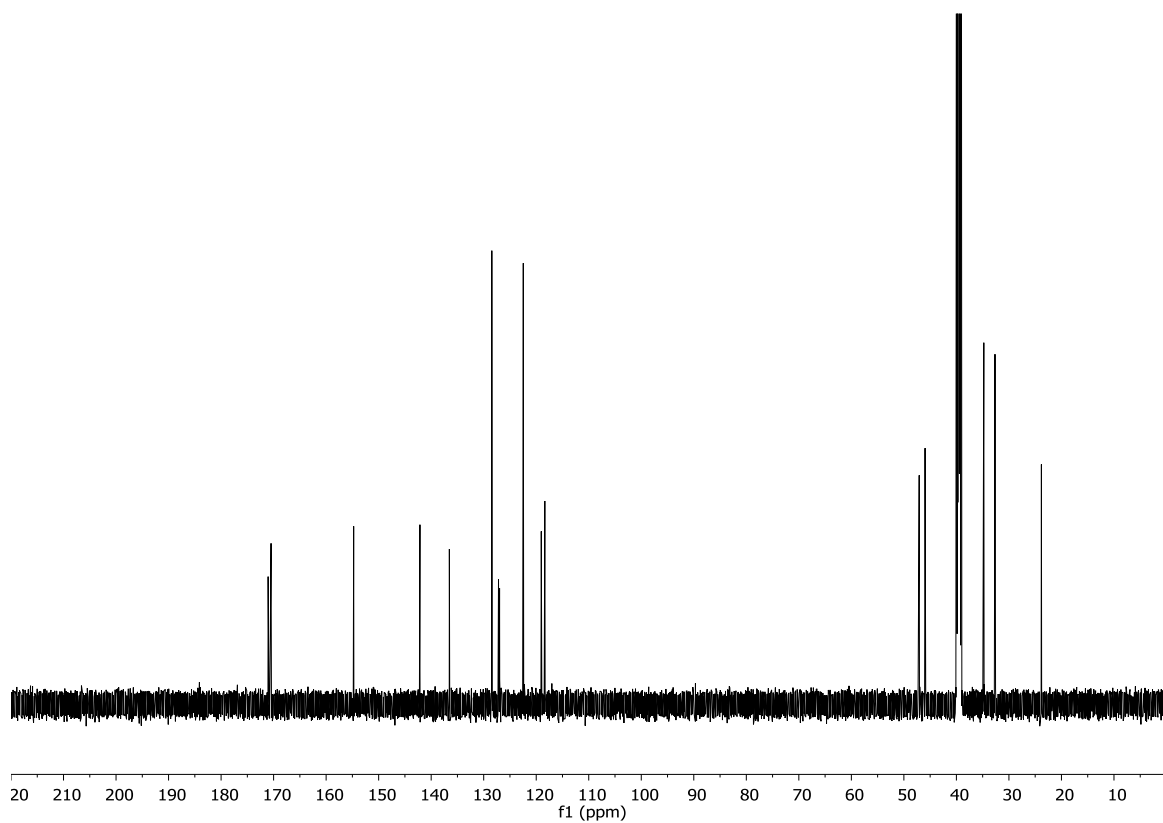


Abbildung 273: ^{19}F -NMR (376 MHz, DMSO-d_6) von **144**.

Abbildung 274: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) von **146**.Abbildung 275: $^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, DMSO-d_6) von **146**.

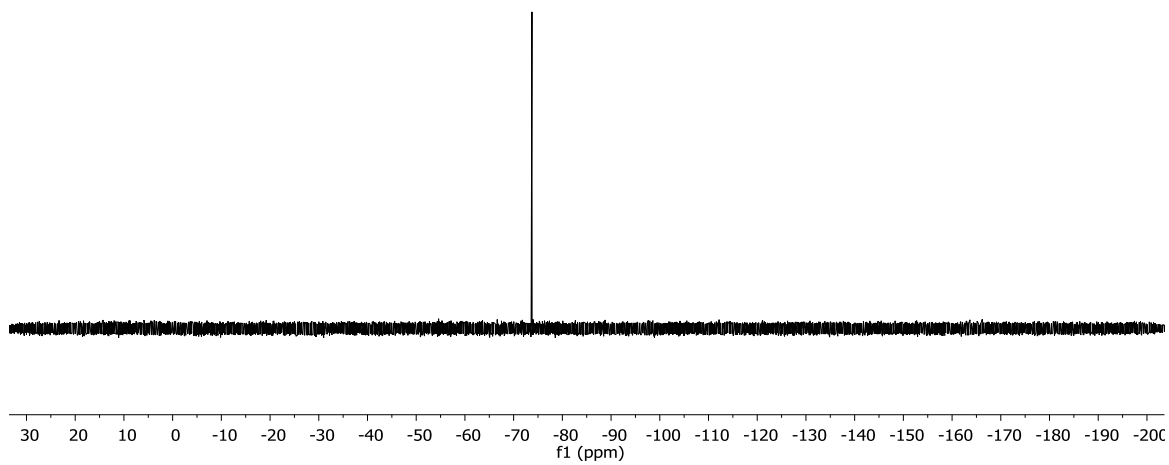


Abbildung 276: ^{19}F -NMR (376 MHz, DMSO-d_6) von **146**.

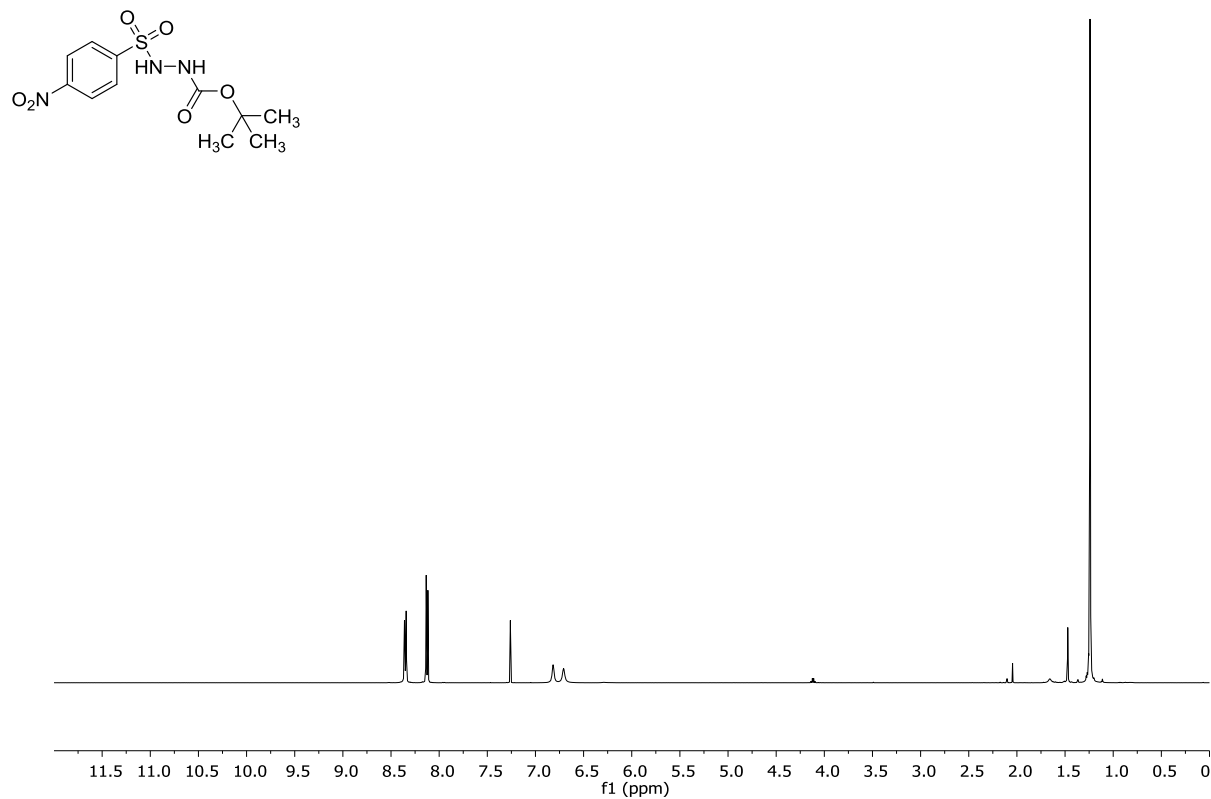


Abbildung 277: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von **147**.

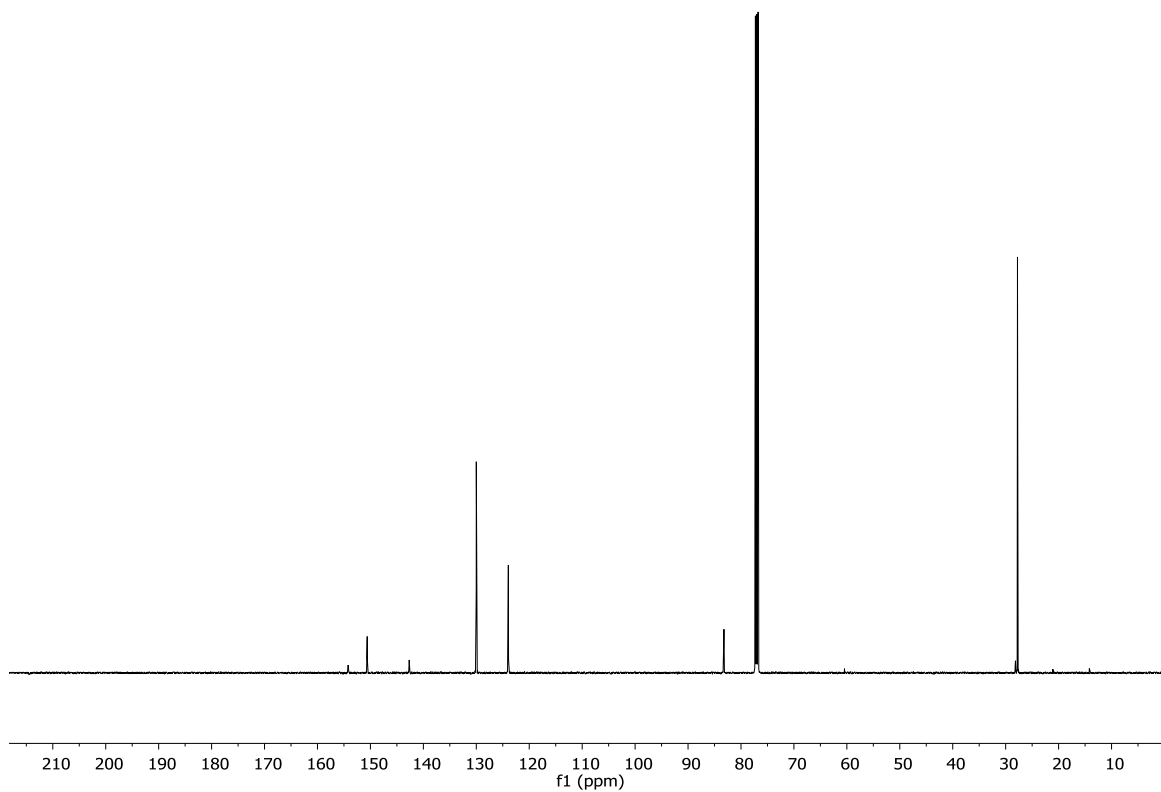


Abbildung 278: $^{13}\text{C-NMR}$ (125.6 MHz, CDCl_3) von **147**.

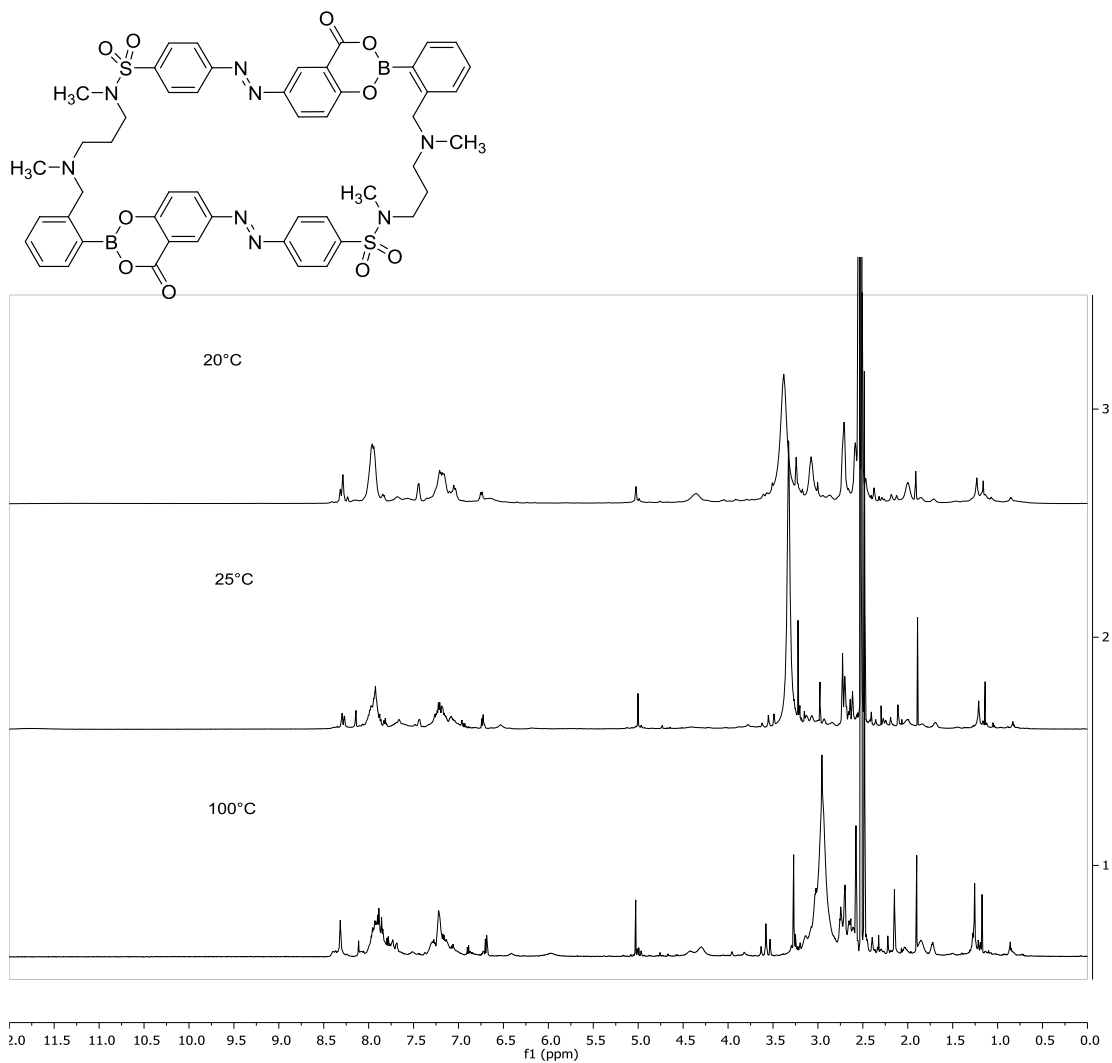


Abbildung 279: 1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) bei verschiedenen Temperaturen von **154**.

8. Kristallstrukturanalysen

Kristallstrukturdaten von 1-Methyl-3-(4-(*N,N*-dimethylamino)styrenyl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazas-indacen (Dimethylamino-BODIPY **100**)

Summenformel	$C_{20}H_{20}BF_2N_3$
Molgewicht	351.21 g mol ⁻¹
Raumgruppe	P -1 (triklin)
Absorption	$\mu = 0.09 \text{ mm}^{-1}$
Kristallgröße	0.02 x 0.08 x 0.15 mm ³ blaue Platte
Gitterkonstanten	$a = 14.1526(13) \text{ \AA}$ $\alpha = 78.797(7)^\circ$
(berechnet aus	$b = 14.7427(13) \text{ \AA}$ $\beta =$ $64.192(7)^\circ$
7683 Reflexen mit	$c = 15.9834(14) \text{ \AA}$ $\gamma = 65.391(6)^\circ$
$2.6^\circ < \theta < 27.4^\circ$)	$V = 2729.2(5) \text{ \AA}^3$ $z = 6$ $F(000) = 1104$
Temperatur	-80°C
Dichte	$d_{\text{rön}} = 1.282 \text{ g cm}^{-3}$

Datensammlung

Diffraktometer	STOE IPDS 2T
Strahlung	Mo-K α Graphitmonochromator
Scan – Typ	ω scans
Scan – Breite	1°
Meßbereich	$2^\circ \leq \theta \leq 28^\circ$
	$-18 \leq h \leq 18$ $-19 \leq k \leq 19$ $-20 \leq l \leq 17$
Reflexzahl:	
gemessen	27761
unabhängige	12360 ($R_{\text{int}} = 0.0827$)
beobachtete	3468 ($ F /\sigma(F) > 4.0$)

Datenkorrektur, Strukturlösung und -verfeinerung

Korrekturen	Lorentz- und Polarisationskorrektur.
Lösung	Programm: SIR-2004 (Direkte Methoden)
Verfeinerung	Programm: SHELXL-2014 (Vollmatrixverfahren). 712 verfeinerte Parameter, gewichtete Verfeinerung: $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0480 \cdot P)^2]$ wobei $P = (\text{Max}(F_o^2, 0) + 2 \cdot F_c^2)/3$. Wasserstoffatome geometrisch eingefügt und reitend verfeinert, Nichtwasserstoffatome anisotrop verfeinert.
Diskrepanzfaktor	$wR2 = 0.1835$ ($R1 = 0.0743$ für beobachtete Reflexe, 0.2617 für alle Reflexe)
Fitgüte	$S = 0.92$
maximale Änderung der Parameter	$0.001 \cdot \text{e.s.d}$
maximale Peakhöhe in diff. Fouriersynthese	$0.32, -0.18 \text{ e \AA}^{-3}$
Bemerkung sind.	Struktur enthält drei unabhängige Reflexe, die nahezu identisch sind.

Endkoordinaten und äquivalente Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2$)

$$U_{\text{äq}} = (1/3) * \sum_{ij} a_i^* a_j^* a_i a_j$$

Atom	X	Y	Z	$U_{\text{äq}}$
C1A	0.4137(5)	-0.0651(4)	0.3780(4)	0.073(3)
C2A	0.3333(5)	-0.0836(4)	0.4597(4)	0.076(4)
C3A	0.3054(4)	-0.0130(4)	0.5219(4)	0.066(3)
C4A	0.3686(4)	0.0465(4)	0.4762(3)	0.055(3)
C5A	0.3751(4)	0.1252(4)	0.5064(3)	0.059(3)
C6A	0.4493(4)	0.1695(4)	0.4495(3)	0.057(3)
C7A	0.4700(4)	0.2505(4)	0.4657(3)	0.061(3)
C8A	0.5553(4)	0.2619(4)	0.3869(3)	0.063(3)
C9A	0.5895(4)	0.1896(4)	0.3214(3)	0.055(3)
N10A	0.4370(3)	0.0121(3)	0.3863(3)	0.059(2)
N11A	0.5238(3)	0.1347(3)	0.3598(2)	0.052(2)
C12A	0.6772(4)	0.1736(4)	0.2296(3)	0.057(3)
C13A	0.7419(4)	0.2278(4)	0.1903(3)	0.059(3)
C14A	0.8284(4)	0.2193(4)	0.0974(3)	0.053(3)
C15A	0.8814(4)	0.2881(4)	0.0626(4)	0.059(3)
C16A	0.9618(4)	0.2849(4)	-0.0263(4)	0.061(3)
C17A	0.9934(4)	0.2111(3)	-0.0872(3)	0.050(3)
C18A	0.9405(4)	0.1415(3)	-0.0540(3)	0.055(3)
C19A	0.8606(4)	0.1454(4)	0.0353(3)	0.057(3)
N20A	1.0736(3)	0.2055(3)	-0.1762(3)	0.062(2)
C21A	1.1000(4)	0.1330(4)	-0.2401(3)	0.068(3)
C22A	1.1419(4)	0.2669(4)	-0.2058(4)	0.075(3)
B23A	0.5289(5)	0.0479(5)	0.3134(4)	0.060(3)
F24A	0.5094(2)	0.0828(2)	0.2331(2)	0.075(2)
F25A	0.6345(2)	-0.0294(2)	0.2907(2)	0.076(2)
C26A	0.4081(4)	0.3069(4)	0.5543(3)	0.081(3)
C1B	0.3885(6)	0.2851(5)	-0.1067(6)	0.120(5)
C2B	0.4765(7)	0.2692(6)	-0.1949(6)	0.132(6)
C3B	0.5124(6)	0.3491(7)	-0.2163(5)	0.128(5)
C4B	0.4470(5)	0.4125(5)	-0.1396(4)	0.084(4)
C5B	0.4472(4)	0.4999(5)	-0.1205(4)	0.082(4)
C6B	0.3779(4)	0.5465(4)	-0.0391(3)	0.068(3)
C7B	0.3711(5)	0.6322(4)	-0.0044(4)	0.072(3)
C8B	0.2895(4)	0.6459(4)	0.0820(4)	0.067(3)
C9B	0.2432(4)	0.5701(4)	0.1031(3)	0.056(3)
N10B	0.3699(4)	0.3707(4)	-0.0740(4)	0.084(3)
N11B	0.2979(3)	0.5100(3)	0.0300(3)	0.059(2)
C12B	0.1562(4)	0.5563(4)	0.1859(3)	0.058(3)
C13B	0.1017(4)	0.6171(4)	0.2601(3)	0.057(3)
C14B	0.0140(4)	0.6103(4)	0.3476(3)	0.057(3)
C15B	-0.0314(4)	0.6797(4)	0.4168(3)	0.061(3)
C16B	-0.1159(4)	0.6750(4)	0.5020(3)	0.065(3)
C17B	-0.1619(4)	0.6017(4)	0.5225(3)	0.059(3)
C18B	-0.1167(4)	0.5324(4)	0.4529(3)	0.059(3)
C19B	-0.0322(4)	0.5373(4)	0.3685(3)	0.057(3)
N20B	-0.2452(4)	0.5981(4)	0.6070(3)	0.076(3)

Atom	X	Y	Z	U _{äq}
C21B	-0.2939(5)	0.5231(5)	0.6294(4)	0.086(4)
C22B	-0.2851(5)	0.6658(4)	0.6811(4)	0.088(3)
B23B	0.2777(5)	0.4189(5)	0.0198(5)	0.070(4)
F24B	0.1700(3)	0.4465(2)	0.0212(2)	0.089(2)
F25B	0.2861(3)	0.3500(2)	0.0930(2)	0.083(2)
C26B	0.4445(5)	0.6923(5)	-0.0573(4)	0.093(4)
C1C	0.2485(5)	0.5379(4)	0.6965(5)	0.084(4)
C2C	0.2166(6)	0.4859(5)	0.7784(5)	0.086(4)
C3C	0.1004(5)	0.5352(4)	0.8256(4)	0.078(4)
C4C	0.0645(5)	0.6147(4)	0.7700(5)	0.071(4)
C5C	-0.0430(4)	0.6884(4)	0.7818(4)	0.068(3)
C6C	-0.0592(4)	0.7570(4)	0.7137(5)	0.065(3)
C7C	-0.1619(5)	0.8341(4)	0.7118(5)	0.070(4)
C8C	-0.1327(5)	0.8773(4)	0.6256(5)	0.076(4)
C9C	-0.0135(5)	0.8302(4)	0.5741(5)	0.068(3)
N10C	0.1579(4)	0.6159(3)	0.6901(4)	0.071(3)
N11C	0.0301(4)	0.7578(3)	0.6291(3)	0.068(3)
C12C	0.0546(5)	0.8484(4)	0.4813(5)	0.073(4)
C13C	0.0142(5)	0.9187(4)	0.4235(5)	0.077(4)
C14C	0.0774(5)	0.9368(4)	0.3262(5)	0.071(4)
C15C	0.0244(5)	1.0161(4)	0.2762(5)	0.083(4)
C16C	0.0827(7)	1.0363(5)	0.1839(6)	0.089(5)
C17C	0.1969(7)	0.9782(5)	0.1367(5)	0.084(5)
C18C	0.2480(6)	0.8985(4)	0.1868(5)	0.086(4)
C19C	0.1905(5)	0.8794(4)	0.2779(5)	0.080(4)
N20C	0.2536(6)	0.9978(4)	0.0461(5)	0.103(4)
C21C	0.3783(8)	0.9575(5)	0.0034(5)	0.132(6)
C22C	0.2007(6)	1.0811(5)	-0.0053(5)	0.123(6)
B23C	0.1549(5)	0.6947(5)	0.6125(6)	0.073(4)
F24C	0.2060(2)	0.7581(2)	0.6137(3)	0.095(2)
F25C	0.2154(3)	0.6499(2)	0.5250(2)	0.091(2)
C26C	-0.2766(4)	0.8596(4)	0.7906(4)	0.086(4)

anisotrope Auslenkungsparameter

Atom	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{12}	U_{13}	U_{23}
C1A	0.075(4)	0.073(4)	0.066(4)	-0.026(3)	-0.028(3)	0.001(3)
C2A	0.073(4)	0.070(4)	0.098(5)	-0.034(3)	-0.043(4)	0.013(4)
C3A	0.054(3)	0.074(4)	0.070(4)	-0.019(3)	-0.032(3)	0.008(3)
C4A	0.043(3)	0.065(3)	0.049(3)	-0.016(3)	-0.017(2)	0.001(3)
C5A	0.049(3)	0.073(4)	0.044(3)	-0.012(3)	-0.016(2)	-0.009(3)
C6A	0.042(3)	0.071(4)	0.044(3)	-0.008(3)	-0.016(2)	-0.003(3)
C7A	0.055(3)	0.067(4)	0.056(3)	-0.012(3)	-0.023(3)	-0.014(3)
C8A	0.051(3)	0.069(4)	0.061(3)	-0.015(3)	-0.019(3)	-0.010(3)
C9A	0.044(3)	0.066(3)	0.048(3)	-0.013(3)	-0.019(2)	-0.003(3)
N10A	0.055(2)	0.067(3)	0.046(2)	-0.017(2)	-0.014(2)	-0.009(2)
N11A	0.040(2)	0.063(3)	0.043(2)	-0.012(2)	-0.013(2)	-0.003(2)
C12A	0.049(3)	0.066(3)	0.047(3)	-0.013(3)	-0.019(2)	-0.001(3)
C13A	0.052(3)	0.068(4)	0.058(3)	-0.023(3)	-0.020(3)	-0.006(3)
C14A	0.045(3)	0.056(3)	0.052(3)	-0.015(2)	-0.018(2)	-0.003(3)
C15A	0.059(3)	0.058(3)	0.069(4)	-0.026(3)	-0.027(3)	-0.007(3)
C16A	0.060(3)	0.058(3)	0.069(4)	-0.032(3)	-0.020(3)	0.000(3)
C17A	0.045(3)	0.049(3)	0.059(3)	-0.020(2)	-0.019(2)	-0.004(2)
C18A	0.052(3)	0.053(3)	0.057(3)	-0.026(2)	-0.010(3)	-0.004(2)
C19A	0.055(3)	0.060(3)	0.060(3)	-0.030(3)	-0.020(3)	0.003(3)
N20A	0.055(2)	0.064(3)	0.059(3)	-0.031(2)	-0.006(2)	-0.007(2)
C21A	0.065(3)	0.077(4)	0.052(3)	-0.028(3)	-0.010(3)	-0.010(3)
C22A	0.069(3)	0.077(4)	0.081(4)	-0.042(3)	-0.020(3)	0.006(3)
B23A	0.058(4)	0.070(4)	0.046(3)	-0.020(3)	-0.023(3)	0.004(3)
F24A	0.074(2)	0.111(2)	0.048(2)	-0.043(2)	-0.024(1)	0.002(2)
F25A	0.053(2)	0.077(2)	0.074(2)	-0.011(1)	-0.011(1)	-0.018(2)
C26A	0.071(4)	0.091(4)	0.065(4)	-0.017(3)	-0.017(3)	-0.027(3)
C1B	0.116(6)	0.090(5)	0.141(7)	0.021(4)	-0.074(5)	-0.055(5)
C2B	0.110(6)	0.116(7)	0.147(8)	0.017(5)	-0.056(6)	-0.080(6)
C3B	0.089(5)	0.157(8)	0.100(6)	0.015(5)	-0.037(4)	-0.062(6)
C4B	0.053(3)	0.103(5)	0.063(4)	0.005(4)	-0.020(3)	-0.017(4)
C5B	0.056(3)	0.092(5)	0.073(4)	-0.003(3)	-0.025(3)	-0.007(4)
C6B	0.042(3)	0.089(4)	0.044(3)	-0.006(3)	-0.014(3)	0.005(3)
C7B	0.065(3)	0.077(4)	0.083(4)	-0.029(3)	-0.040(3)	0.015(3)
C8B	0.057(3)	0.069(4)	0.068(4)	-0.024(3)	-0.022(3)	0.007(3)
C9B	0.052(3)	0.059(3)	0.051(3)	-0.019(3)	-0.020(3)	0.003(3)
N10B	0.080(3)	0.077(4)	0.087(4)	0.001(3)	-0.048(3)	-0.021(3)
N11B	0.053(2)	0.071(3)	0.044(2)	-0.018(2)	-0.016(2)	0.000(2)
C12B	0.059(3)	0.057(3)	0.055(3)	-0.023(3)	-0.020(3)	0.002(3)
C13B	0.058(3)	0.058(3)	0.060(3)	-0.025(3)	-0.023(3)	-0.002(3)
C14B	0.057(3)	0.057(3)	0.057(3)	-0.021(3)	-0.022(3)	-0.003(3)
C15B	0.072(3)	0.059(3)	0.061(3)	-0.028(3)	-0.030(3)	-0.005(3)
C16B	0.070(3)	0.071(4)	0.054(3)	-0.022(3)	-0.025(3)	-0.015(3)
C17B	0.056(3)	0.067(4)	0.056(3)	-0.022(3)	-0.024(3)	-0.004(3)
C18B	0.059(3)	0.063(3)	0.055(3)	-0.024(3)	-0.019(3)	-0.010(3)
C19B	0.066(3)	0.062(3)	0.043(3)	-0.023(3)	-0.019(3)	-0.010(2)
N20B	0.072(3)	0.095(4)	0.052(3)	-0.032(3)	-0.013(2)	-0.008(3)
C21B	0.084(4)	0.100(5)	0.063(4)	-0.038(4)	-0.017(3)	0.004(3)

Atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
C22B 0.079(4)	0.107(5)	0.058(3)	-0.017(3)	-0.017(3)	-0.027(3)	
B23B 0.056(4)	0.073(5)	0.068(4)	-0.006(3)	-0.030(3)	-0.003(4)	
F24B 0.076(2)	0.092(2)	0.103(2)	-0.018(2)	-0.043(2)	-0.024(2)	
F25B 0.098(2)	0.066(2)	0.092(2)	-0.030(2)	-0.046(2)	0.002(2)	
C26B 0.081(4)	0.110(5)	0.097(5)	-0.057(4)	-0.037(4)	0.032(4)	
C1C 0.085(4)	0.057(4)	0.124(6)	-0.012(4)	-0.063(4)	-0.014(4)	
C2C 0.097(5)	0.055(4)	0.119(5)	-0.008(4)	-0.069(4)	-0.014(4)	
C3C 0.088(4)	0.062(4)	0.101(5)	-0.020(3)	-0.056(4)	-0.013(4)	
C4C 0.069(4)	0.055(4)	0.103(5)	-0.019(3)	-0.048(4)	-0.011(3)	
C5C 0.073(4)	0.057(4)	0.093(4)	-0.025(3)	-0.041(3)	-0.019(3)	
C6C 0.062(3)	0.045(3)	0.106(5)	-0.017(3)	-0.051(4)	-0.005(3)	
C7C 0.068(4)	0.060(4)	0.102(5)	-0.027(3)	-0.047(4)	-0.009(3)	
C8C 0.065(4)	0.063(4)	0.119(5)	-0.020(3)	-0.054(4)	-0.009(4)	
C9C 0.070(4)	0.055(4)	0.103(5)	-0.025(3)	-0.052(4)	-0.006(3)	
N10C 0.070(3)	0.048(3)	0.112(4)	-0.013(2)	-0.056(3)	-0.008(3)	
N11C 0.065(3)	0.058(3)	0.097(3)	-0.022(2)	-0.046(3)	-0.005(3)	
C12C 0.080(4)	0.056(4)	0.107(5)	-0.029(3)	-0.056(4)	-0.001(3)	
C13C 0.082(4)	0.052(4)	0.124(5)	-0.026(3)	-0.062(4)	-0.004(4)	
C14C 0.080(4)	0.049(3)	0.109(5)	-0.021(3)	-0.063(4)	0.002(3)	
C15C 0.091(4)	0.049(4)	0.144(6)	-0.026(3)	-0.083(5)	0.006(4)	
C16C 0.123(6)	0.058(4)	0.138(6)	-0.046(4)	-0.096(5)	0.022(4)	
C17C 0.118(6)	0.068(4)	0.108(5)	-0.039(4)	-0.083(5)	0.016(4)	
C18C 0.108(5)	0.062(4)	0.107(5)	-0.022(4)	-0.070(5)	0.005(4)	
C19C 0.092(5)	0.058(4)	0.100(5)	-0.015(3)	-0.059(4)	-0.003(4)	
N20C 0.142(5)	0.091(4)	0.120(5)	-0.052(4)	-0.093(5)	0.029(4)	
C21C 0.182(9)	0.101(6)	0.098(6)	-0.028(6)	-0.065(6)	-0.002(5)	
C22C 0.188(7)	0.099(6)	0.144(6)	-0.071(5)	-0.126(6)	0.051(5)	
B23C 0.062(4)	0.055(4)	0.117(6)	-0.019(3)	-0.046(4)	-0.011(4)	
F24C 0.078(2)	0.076(2)	0.162(3)	-0.036(2)	-0.071(2)	0.008(2)	
F25C 0.087(2)	0.075(2)	0.100(3)	-0.018(2)	-0.037(2)	-0.008(2)	
C26C 0.075(4)	0.071(4)	0.121(5)	-0.021(3)	-0.051(4)	-0.010(4)	

Endkoordinaten und isotrope Auslenkungsparameter der Wasserstoffatome($\text{\AA}^2$)

Atom	X	Y	Z	U_{iso}
H1A	0.44852	-0.10200	0.32273	0.087
H2A	0.30321	-0.13373	0.47116	0.092
H3A	0.25239	-0.00654	0.58468	0.080
H5A	0.32696	0.14864	0.56784	0.070
H8A	0.58713	0.31047	0.37688	0.076
H12A	0.69014	0.12124	0.19460	0.069
H13A	0.72954	0.27758	0.22780	0.071
H15A	0.86095	0.33952	0.10219	0.071
H16A	0.99610	0.33291	-0.04649	0.074
H18A	0.96034	0.09073	-0.09407	0.066
H19A	0.82641	0.09725	0.05560	0.068
H21A	1.02973	0.13583	-0.24039	0.102
H21B	1.13996	0.06606	-0.22051	0.102
H21C	1.14826	0.14780	-0.30273	0.102
H22A	1.17926	0.25533	-0.16343	0.112
H22B	1.09285	0.33749	-0.20486	0.112
H22C	1.19924	0.24897	-0.26903	0.112
H26A	0.41166	0.25990	0.60649	0.121
H26B	0.32880	0.34463	0.56333	0.121
H26C	0.44325	0.35302	0.55123	0.121
H1B	0.34839	0.24215	-0.07499	0.144
H2B	0.50654	0.21396	-0.23353	0.158
H3B	0.57036	0.35870	-0.27230	0.154
H5B	0.49823	0.52797	-0.16656	0.099
H8B	0.26619	0.69743	0.12262	0.080
H12B	0.13474	0.50197	0.18986	0.069
H13B	0.12494	0.67099	0.25287	0.069
H15B	-0.00334	0.73125	0.40487	0.073
H16B	-0.14359	0.72267	0.54776	0.078
H18B	-0.14522	0.48117	0.46438	0.070
H19B	-0.00408	0.48940	0.32283	0.068
H21D	-0.35536	0.53523	0.69143	0.130
H21E	-0.23541	0.45686	0.62841	0.130
H21F	-0.32383	0.52643	0.58348	0.130
H22D	-0.22268	0.65453	0.69864	0.132
H22E	-0.34695	0.65337	0.73519	0.132
H22F	-0.31235	0.73490	0.65935	0.132
H26D	0.45842	0.71843	-0.01370	0.139
H26E	0.40576	0.74796	-0.09030	0.139
H26F	0.51681	0.64946	-0.10225	0.139
H1C	0.32377	0.52132	0.65089	0.101
H2C	0.26445	0.42758	0.79874	0.103
H3C	0.05428	0.51757	0.88506	0.094
H5C	-0.10574	0.69023	0.83871	0.082
H8C	-0.18350	0.93033	0.60329	0.091
H12C	0.13335	0.80897	0.45817	0.087
H13C	-0.06367	0.96049	0.44948	0.092

Atom	X	Y	Z	U _{iso}
H15C	-0.05327	1.05668	0.30660	0.099
H16C	0.04459	1.09023	0.15237	0.107
H18C	0.32501	0.85652	0.15623	0.104
H19C	0.22897	0.82518	0.30905	0.096
H21G	0.40713	0.88614	0.01832	0.199
H21H	0.40660	0.99253	0.02756	0.199
H21I	0.40426	0.96709	-0.06423	0.199
H22G	0.25441	1.07998	-0.07007	0.184
H22H	0.17906	1.14400	0.02285	0.184
H22I	0.13315	1.07551	-0.00323	0.184
H26G	-0.27159	0.86952	0.84714	0.129
H26H	-0.30299	0.80497	0.80089	0.129
H26I	-0.33016	0.92101	0.77500	0.129

Kristallstrukturdaten von HSA kokristallisiert mit NBD-C₁₂ **8**

PDB code 6ezq

Data collection

Space group name C2
 Unit cell parameters 98.478 52.720 123.304 90.000 110.103 90.000
 Wavelength 0.99992 Å

Resolution limits & eigenvectors of ellipsoid fitted to resolution cut-off surface:

3.073 0.9979 0.0000 0.0640 0.942 $_a_*$ - 0.334 $_c_*$
 3.093 0.0000 1.0000 0.0000 $_b_*$
 2.362 -0.0640 0.0000 0.9979 -0.053 $_a_*$ + 0.999 $_c_*$

	Overall	Inner Shell	Outer Shell
Low resolution limit	115.8	115.8	2.725
High resolution limit	2.393	8.098	2.393
R_{merge} (all I+ & I-)	0.084	0.035	0.620
R_{merge} (within I+/I-)	0.082	0.034	0.549
R_{meas} (within I+/I-)	0.113	0.048	0.719
R_{meas} (all I+ & I-)	0.101	0.042	0.737
R_{pim} (within I+/I-)	0.078	0.034	0.461
R_{pim} (all I+ & I-)	0.055	0.023	0.394
Total number of observations	41945	1942	2187
Total number unique	13145	657	643
Mean(I)/ σ (I)	8.4	22.4	1.6
Completeness (spherical)	55.3	98.8	8.5
Completeness (ellipsoidal)	89.9	98.8	65.0
Multiplicity	3.2	3.0	3.4
CC(1/2)	0.998	0.998	0.694

Refinement

protein atoms: 4426
 ligand atoms: 54
 water atoms: 78
 resolution (Å) 115.79-2.39 (2.58-2.39)¹⁷
 R_{work} (%) 18.2 (24.4)
 R_{free} (%) 29.8 (30.6)
 average Bfactors (Å²)
 protein: 51.30
 inhibitor: 46.17
 water: 34.82
 rmsd bond lengths (Å) 0.010
 rmsd bond angles (°) 1.26

¹⁷ The highest resolution bin is given in brackets

Kristallstrukturdaten von Dimer **154**

Table 1. Crystal data and structure refinement for dimer **154**.

Empirical formula	$C_{52}H_{56}B_2N_8O_{12}S_2$	
Formula weight	1070.78 g mol^{-1}	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	1.54184 Å	
Crystal system	monoclinic	
Space group	P 21/n	
Unit cell dimensions	$a = 15.9133(4)$ Å	$\alpha = 90^\circ$.
	$b = 38.1475(8)$ Å	$\beta = 98.959(2)^\circ$.
	$c = 19.7073(5)$ Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	11817.4(5) Å ³	
Z	8	
Density (calculated)	1.204 mg/m^3	
Absorption coefficient	1.338 mm^{-1}	
F(000)	4496	
Crystal size	0.160 x 0.130 x 0.100 mm^3	
Theta range for data collection	2.316 to 75.770°.	
Index ranges	-19 ≤ h ≤ 19, -47 ≤ k ≤ 44, -24 ≤ l ≤ 14	
Reflections collected	43308	
Independent reflections	23407 [R(int) = 0.1229]	
Completeness to theta = 67.684°	99.0 %	
Absorption correction	Gaussian and multi-scan	
Max. and min. transmission	1.00 and 0.700	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	23407 / 912 / 1381	
Goodness-of-fit on F ²	1.074	
Final R indices [I > 2sigma(I)]	R1 = 0.1029, wR2 = 0.2442	
R indices (all data)	R1 = 0.1465, wR2 = 0.2868	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.866 and -0.767 e.Å^{-3}	

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for 1. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
C1	8881(3)	2136(1)	6583(3)	38(1)
C2	8398(4)	1873(1)	6211(3)	46(1)
C3	7730(4)	1721(1)	6472(3)	47(1)
C4	7520(3)	1823(1)	7096(3)	42(1)
C5	7999(3)	2085(1)	7478(3)	37(1)
C6	8667(3)	2244(1)	7216(3)	38(1)
C7	9184(3)	2522(1)	7627(3)	37(1)
C8	6049(3)	1507(1)	8129(3)	40(1)
C9	5366(3)	1381(1)	7666(3)	36(1)
C10	4731(3)	1193(1)	7897(3)	38(1)
C11	4775(3)	1126(1)	8596(3)	36(1)
C12	5462(4)	1250(2)	9060(3)	49(1)
C13	6096(4)	1437(2)	8821(3)	50(1)
C14	2651(4)	1204(1)	8093(3)	44(1)
C15	1740(4)	1080(2)	8017(3)	55(2)
C16	1651(3)	684(2)	8064(3)	48(1)
C17	3128(4)	1453(2)	9242(3)	49(1)
C18	2086(4)	113(2)	7641(3)	50(1)
C19	1244(3)	528(2)	6830(3)	43(1)
C20	1459(3)	352(1)	6187(3)	38(1)
C21	2142(3)	463(1)	5858(3)	36(1)
C22	2240(3)	296(1)	5248(3)	41(1)
C23	1679(3)	35(1)	4955(3)	41(1)
C24	1021(3)	-69(1)	5284(3)	43(1)
C25	911(3)	88(1)	5901(3)	42(1)
C26	3814(3)	406(1)	6933(3)	43(1)
C27	3895(3)	1108(1)	5765(2)	35(1)
C28	4692(3)	1114(1)	5553(2)	36(1)
C29	5143(3)	1423(1)	5583(2)	39(1)
C30	4800(3)	1731(1)	5807(2)	38(1)
C31	4009(3)	1726(1)	6025(3)	37(1)

C32	3551(3)	1414(1)	6011(2)	36(1)
C33	2705(3)	1411(1)	6223(2)	34(1)
C34	5529(4)	2610(1)	6014(3)	44(1)
C35	6377(4)	2593(1)	5935(3)	49(1)
C36	6862(4)	2897(2)	5975(3)	51(1)
C37	6463(4)	3216(1)	6069(3)	43(1)
C38	5619(4)	3234(2)	6144(3)	50(1)
C39	5148(4)	2930(2)	6108(3)	50(1)
C40	8081(4)	3355(2)	7261(3)	57(2)
C41	8933(5)	3507(2)	7613(3)	65(2)
C42	9409(5)	3714(2)	7121(3)	60(2)
C43	6887(5)	3752(2)	7420(4)	74(2)
C44	9914(5)	3676(2)	6001(3)	61(2)
C45	10652(4)	3330(2)	6985(3)	55(2)
C46	11048(4)	3078(2)	6530(3)	51(1)
C47	10685(4)	2742(2)	6355(3)	46(1)
C48	11105(4)	2529(2)	5963(3)	52(1)
C49	11874(4)	2620(2)	5741(3)	63(2)
C50	12210(4)	2953(2)	5907(4)	69(2)
C51	11792(4)	3175(2)	6303(4)	66(2)
C52	8920(4)	2839(2)	5517(3)	55(1)
C53	4170(3)	3897(1)	8437(3)	37(1)
C54	3843(3)	4158(1)	8800(3)	37(1)
C55	3077(3)	4316(1)	8531(2)	34(1)
C56	2650(3)	4209(1)	7891(2)	33(1)
C57	2981(3)	3949(1)	7533(2)	33(1)
C58	3741(3)	3782(1)	7805(2)	35(1)
C59	4101(3)	3504(1)	7415(3)	37(1)
C60	811(3)	4525(1)	6806(2)	30(1)
C61	592(3)	4543(1)	6099(2)	33(1)
C62	-111(3)	4739(1)	5809(2)	31(1)
C63	-588(3)	4914(1)	6236(2)	30(1)
C64	-380(3)	4895(1)	6954(2)	30(1)
C65	320(3)	4698(1)	7235(2)	28(1)
C66	-2515(3)	4763(1)	6552(3)	37(1)
C67	-3421(3)	4855(2)	6615(3)	44(1)

C68	-3619(3)	5244(2)	6541(3)	45(1)
C69	-2387(3)	4572(2)	5362(3)	45(1)
C70	-3240(4)	5840(2)	6946(3)	47(1)
C71	-3702(3)	5407(1)	7741(3)	39(1)
C72	-3359(3)	5615(1)	8394(3)	37(1)
C73	-2527(3)	5562(1)	8754(2)	31(1)
C74	-2310(3)	5760(1)	9362(2)	37(1)
C75	-2885(4)	5979(1)	9612(3)	43(1)
C76	-3695(4)	6018(2)	9258(3)	50(1)
C77	-3926(3)	5840(2)	8638(3)	44(1)
C78	-1186(3)	5674(1)	7807(2)	34(1)
C79	-629(3)	4963(1)	9017(2)	31(1)
C80	-1012(3)	4644(1)	8784(2)	31(1)
C81	-540(3)	4337(1)	8808(2)	33(1)
C82	332(3)	4347(1)	9032(2)	29(1)
C83	724(3)	4667(1)	9251(2)	31(1)
C84	247(3)	4969(1)	9253(2)	31(1)
C85	-1947(3)	4630(1)	8528(2)	34(1)
C86	1032(3)	3468(1)	8916(2)	34(1)
C87	1892(3)	3493(1)	8865(2)	36(1)
C88	2380(3)	3191(1)	8871(2)	38(1)
C89	1986(3)	2863(1)	8912(3)	40(1)
C90	1126(3)	2838(1)	8955(3)	42(1)
C91	643(3)	3143(1)	8949(3)	39(1)
C92	3141(4)	2639(2)	7717(3)	55(2)
C93	3866(4)	2464(2)	7438(3)	62(2)
C94	4515(4)	2290(2)	7974(4)	63(2)
C95	1890(4)	2238(2)	7671(4)	64(2)
C96	5458(4)	2366(2)	9090(3)	66(2)
C97	5784(4)	2686(2)	8075(3)	55(2)
C98	6356(3)	2947(2)	8503(3)	54(2)
C99	6057(3)	3279(2)	8694(3)	50(1)
C100	6647(4)	3503(2)	9086(3)	59(2)
C101	7499(4)	3406(2)	9280(3)	71(2)
C102	7767(4)	3080(2)	9092(3)	74(2)
C103	7199(4)	2851(2)	8718(3)	66(2)

C104	4642(4)	3200(2)	9590(3)	56(2)
N1	6851(3)	1637(1)	7327(2)	42(1)
N2	6727(3)	1703(1)	7923(2)	43(1)
N3	3115(3)	1147(1)	8793(2)	38(1)
N4	1913(3)	489(1)	7468(2)	39(1)
N5	5314(3)	2036(1)	5803(2)	40(1)
N6	4994(3)	2307(1)	6013(2)	44(1)
N7	7485(4)	3637(1)	6975(3)	60(1)
N8	9803(3)	3484(1)	6644(2)	51(1)
N9	1890(2)	4401(1)	7645(2)	34(1)
N10	1535(2)	4316(1)	7060(2)	33(1)
N11	-2298(2)	4856(1)	5873(2)	34(1)
N12	-3228(2)	5465(1)	7149(2)	36(1)
N13	874(2)	4048(1)	9060(2)	31(1)
N14	489(3)	3765(1)	8903(2)	36(1)
N15	2655(3)	2390(1)	8078(3)	53(1)
N16	5087(3)	2543(1)	8428(3)	54(1)
O1	9558(2)	2268(1)	6344(2)	42(1)
O2	9766(2)	2676(1)	7316(2)	43(1)
O3	9080(2)	2870(1)	6235(2)	42(1)
O4	9102(2)	2595(1)	8210(2)	49(1)
O5	3444(2)	807(1)	5706(2)	37(1)
O6	2323(2)	1101(1)	6230(2)	38(1)
O7	3234(2)	696(1)	6870(2)	35(1)
O8	2354(2)	1674(1)	6387(2)	49(1)
O9	7806(3)	3545(1)	5809(2)	53(1)
O10	6546(3)	3895(1)	5973(3)	69(1)
O11	3729(2)	596(1)	8472(2)	38(1)
O12	4200(2)	849(1)	9630(2)	47(1)
O13	4950(2)	3758(1)	8695(2)	41(1)
O14	4774(2)	3334(1)	7751(2)	42(1)
O15	4514(2)	3163(1)	8850(2)	41(1)
O16	3817(2)	3427(1)	6828(2)	44(1)
O17	-1096(2)	5255(1)	9033(2)	33(1)
O18	-2340(2)	4935(1)	8436(2)	32(1)
O19	-1648(2)	5354(1)	7842(2)	31(1)

O20	-2332(2)	4355(1)	8421(2)	44(1)
O21	3447(3)	2556(1)	9184(2)	53(1)
O22	2138(3)	2200(1)	9134(2)	62(1)
O23	-1678(2)	5415(1)	6306(2)	38(1)
O24	-1452(2)	5201(1)	5169(2)	39(1)
S1	7098(1)	3600(1)	6155(1)	53(1)
S2	3948(1)	894(1)	8907(1)	35(1)
S3	2589(1)	2478(1)	8877(1)	48(1)
S4	-1524(1)	5132(1)	5869(1)	31(1)
B1	9775(4)	2631(2)	6563(3)	42(1)
B2	2801(4)	763(2)	6163(3)	35(1)
B3	5074(3)	3394(2)	8505(3)	42(1)
B4	-1879(3)	5279(1)	8522(3)	32(1)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for dimer **154**.

C1-O1	1.339(6)	C16-H16A	0.99
C1-C2	1.399(7)	C16-H16B	0.99
C1-C6	1.406(7)	C17-N3	1.464(6)
C2-C3	1.380(7)	C17-H17A	0.98
C2-H2	0.95	C17-H17B	0.98
C3-C4	1.379(8)	C17-H17C	0.98
C3-H3	0.95	C18-N4	1.492(7)
C4-C5	1.404(7)	C18-H18A	0.98
C4-N1	1.412(6)	C18-H18B	0.98
C5-C6	1.389(7)	C18-H18C	0.98
C5-H5	0.95	C19-C20	1.519(7)
C6-C7	1.500(7)	C19-N4	1.523(7)
C7-O4	1.209(6)	C19-H19A	0.99
C7-O2	1.325(6)	C19-H19B	0.99
C8-C13	1.379(8)	C20-C25	1.394(7)
C8-C9	1.391(7)	C20-C21	1.413(6)
C8-N2	1.424(6)	C21-C22	1.391(7)
C9-C10	1.374(7)	C21-B2	1.605(7)
C9-H9	0.95	C22-C23	1.399(7)
C10-C11	1.391(7)	C22-H22	0.95
C10-H10	0.95	C23-C24	1.374(7)
C11-C12	1.394(8)	C23-H23	0.95
C11-S2	1.772(5)	C24-C25	1.391(8)
C12-C13	1.378(8)	C24-H24	0.95
C12-H12	0.95	C25-H25	0.95
C13-H13	0.95	C26-O7	1.433(6)
C14-N3	1.477(7)	C26-H26A	0.98
C14-C15	1.510(8)	C26-H26B	0.98
C14-H14A	0.99	C26-H26C	0.98
C14-H14B	0.99	C27-O5	1.349(6)
C15-C16	1.522(9)	C27-C28	1.397(6)
C15-H15A	0.99	C27-C32	1.406(6)
C15-H15B	0.99	C28-C29	1.378(7)
C16-N4	1.503(6)	C28-H28	0.95

C29-C30	1.395(7)	C44-H44A	0.98
C29-H29	0.95	C44-H44B	0.98
C30-C31	1.391(7)	C44-H44C	0.98
C30-N5	1.425(6)	C45-C46	1.514(9)
C31-C32	1.395(7)	C45-N8	1.530(8)
C31-H31	0.95	C45-H45A	0.99
C32-C33	1.471(6)	C45-H45B	0.99
C33-O8	1.218(6)	C46-C51	1.380(8)
C33-O6	1.329(6)	C46-C47	1.426(8)
C34-C35	1.383(8)	C47-C48	1.365(8)
C34-C39	1.389(7)	C47-B1	1.622(8)
C34-N6	1.433(7)	C48-C49	1.404(8)
C35-C36	1.388(8)	C48-H48	0.95
C35-H35	0.95	C49-C50	1.398(10)
C36-C37	1.399(8)	C49-H49	0.95
C36-H36	0.95	C50-C51	1.390(10)
C37-C38	1.377(8)	C50-H50	0.95
C37-S1	1.772(5)	C51-H51	0.95
C38-C39	1.376(8)	C52-O3	1.404(7)
C38-H38	0.95	C52-H52A	0.98
C39-H39	0.95	C52-H52B	0.98
C40-N7	1.488(9)	C52-H52C	0.98
C40-C41	1.536(9)	C53-O13	1.372(5)
C40-H40A	0.99	C53-C54	1.377(7)
C40-H40B	0.99	C53-C58	1.394(7)
C41-C42	1.537(8)	C54-C55	1.389(6)
C41-H41A	0.99	C54-H54	0.95
C41-H41B	0.99	C55-C56	1.397(7)
C42-N8	1.493(8)	C55-H55	0.95
C42-H42A	0.99	C56-C57	1.370(6)
C42-H42B	0.99	C56-N9	1.432(5)
C43-N7	1.458(7)	C57-C58	1.398(6)
C43-H43A	0.98	C57-H57	0.95
C43-H43B	0.98	C58-C59	1.478(7)
C43-H43C	0.98	C59-O16	1.210(6)
C44-N8	1.499(7)	C59-O14	1.334(6)

C60-C61	1.384(7)	C73-C74	1.412(7)
C60-C65	1.402(6)	C73-B4	1.607(7)
C60-N10	1.426(6)	C74-C75	1.385(7)
C61-C62	1.390(6)	C74-H74	0.95
C61-H61	0.95	C75-C76	1.376(8)
C62-C63	1.390(6)	C75-H75	0.95
C62-H62	0.95	C76-C77	1.397(8)
C63-C64	1.403(7)	C76-H76	0.95
C63-S4	1.759(5)	C77-H77	0.95
C64-C65	1.386(6)	C78-O19	1.430(5)
C64-H64	0.95	C78-H78A	0.98
C65-H65	0.95	C78-H78B	0.98
C66-N11	1.477(6)	C78-H78C	0.98
C66-C67	1.507(6)	C79-O17	1.341(5)
C66-H66A	0.99	C79-C80	1.404(6)
C66-H66B	0.99	C79-C84	1.399(6)
C67-C68	1.519(8)	C80-C81	1.391(6)
C67-H67A	0.99	C80-C85	1.495(6)
C67-H67B	0.99	C81-C82	1.390(6)
C68-N12	1.515(7)	C81-H81	0.95
C68-H68A	0.99	C82-C83	1.407(6)
C68-H68B	0.99	C82-N13	1.426(6)
C69-N11	1.472(7)	C83-C84	1.383(6)
C69-H69A	0.98	C83-H83	0.95
C69-H69B	0.98	C84-H84	0.95
C69-H69C	0.98	C85-O20	1.218(6)
C70-N12	1.486(7)	C85-O18	1.319(5)
C70-H70A	0.98	C86-C91	1.390(7)
C70-H70B	0.98	C86-C87	1.392(7)
C70-H70C	0.98	C86-N14	1.425(6)
C71-N12	1.502(6)	C87-C88	1.386(7)
C71-C72	1.538(7)	C87-H87	0.95
C71-H71A	0.99	C88-C89	1.408(7)
C71-H71B	0.99	C88-H88	0.95
C72-C77	1.384(7)	C89-C90	1.387(7)
C72-C73	1.417(7)	C89-S3	1.763(5)

C90-C91	1.392(7)	C102-H102	0.95
C90-H90	0.95	C103-H103	0.95
C91-H91	0.95	C104-O15	1.449(7)
C92-N15	1.474(8)	C104-H10A	0.98
C92-C93	1.511(8)	C104-H10B	0.98
C92-H92A	0.99	C104-H10C	0.98
C92-H92B	0.99	N1-N2	1.247(6)
C93-C94	1.508(9)	N3-S2	1.627(4)
C93-H93A	0.99	N5-N6	1.251(6)
C93-H93B	0.99	N7-S1	1.643(6)
C94-N16	1.518(9)	N9-N10	1.246(6)
C94-H94A	0.99	N11-S4	1.623(4)
C94-H94B	0.99	N13-N14	1.254(5)
C95-N15	1.470(8)	N15-S3	1.628(5)
C95-H95A	0.98	O1-B1	1.478(7)
C95-H95B	0.98	O2-B1	1.497(7)
C95-H95C	0.98	O3-B1	1.499(7)
C96-N16	1.505(8)	O5-B2	1.473(6)
C96-H96A	0.98	O6-B2	1.516(6)
C96-H96B	0.98	O7-B2	1.476(7)
C96-H96C	0.98	O9-S1	1.421(4)
C97-N16	1.500(8)	O10-S1	1.438(5)
C97-C98	1.514(9)	O11-S2	1.434(4)
C97-H97A	0.99	O12-S2	1.430(4)
C97-H97B	0.99	O13-B3	1.460(7)
C98-C103	1.393(8)	O14-B3	1.506(7)
C98-C99	1.425(9)	O15-B3	1.492(7)
C99-C100	1.408(9)	O17-B4	1.478(6)
C99-B3	1.611(7)	O18-B4	1.503(6)
C100-C101	1.401(8)	O19-B4	1.471(6)
C100-H100	0.95	O21-S3	1.436(4)
C101-C102	1.384(11)	O22-S3	1.416(5)
C101-H101	0.95	O23-S4	1.423(4)
C102-C103	1.384(11)	O24-S4	1.427(3)

O1-C1-C2	119.4(5)	C12-C13-C8	120.6(5)
O1-C1-C6	121.5(5)	C12-C13-H13	119.7
C2-C1-C6	119.0(4)	C8-C13-H13	119.7
C3-C2-C1	119.9(5)	N3-C14-C15	112.2(5)
C3-C2-H2	120.1	N3-C14-H14A	109.2
C1-C2-H2	120.1	C15-C14-H14A	109.2
C4-C3-C2	121.5(5)	N3-C14-H14B	109.2
C4-C3-H3	119.2	C15-C14-H14B	109.2
C2-C3-H3	119.2	H14A-C14-H14B	107.9
C3-C4-C5	119.4(5)	C14-C15-C16	113.8(5)
C3-C4-N1	116.5(5)	C14-C15-H15A	108.8
C5-C4-N1	124.0(5)	C16-C15-H15A	108.8
C6-C5-C4	119.6(5)	C14-C15-H15B	108.8
C6-C5-H5	120.2	C16-C15-H15B	108.8
C4-C5-H5	120.2	H15A-C15-H15B	107.7
C5-C6-C1	120.6(5)	N4-C16-C15	113.7(4)
C5-C6-C7	119.6(5)	N4-C16-H16A	108.8
C1-C6-C7	119.8(4)	C15-C16-H16A	108.8
O4-C7-O2	121.5(5)	N4-C16-H16B	108.8
O4-C7-C6	123.0(4)	C15-C16-H16B	108.8
O2-C7-C6	115.5(4)	H16A-C16-H16B	107.7
C13-C8-C9	119.8(5)	N3-C17-H17A	109.5
C13-C8-N2	117.3(5)	N3-C17-H17B	109.5
C9-C8-N2	122.9(5)	H17A-C17-H17B	109.5
C10-C9-C8	120.2(5)	N3-C17-H17C	109.5
C10-C9-H9	119.9	H17A-C17-H17C	109.5
C8-C9-H9	119.9	H17B-C17-H17C	109.5
C9-C10-C11	119.8(5)	N4-C18-H18A	109.5
C9-C10-H10	120.1	N4-C18-H18B	109.5
C11-C10-H10	120.1	H18A-C18-H18B	109.5
C10-C11-C12	120.1(5)	N4-C18-H18C	109.5
C10-C11-S2	120.5(4)	H18A-C18-H18C	109.5
C12-C11-S2	119.3(4)	H18B-C18-H18C	109.5
C13-C12-C11	119.5(5)	C20-C19-N4	115.2(4)
C13-C12-H12	120.3	C20-C19-H19A	108.5
C11-C12-H12	120.3	N4-C19-H19A	108.5

C20-C19-H19B	108.5	C29-C30-C31	120.3(5)
N4-C19-H19B	108.5	C29-C30-N5	115.6(4)
H19A-C19-H19B	107.5	C31-C30-N5	124.0(5)
C25-C20-C21	120.5(5)	C32-C31-C30	119.9(4)
C25-C20-C19	116.7(4)	C32-C31-H31	120.0
C21-C20-C19	122.7(5)	C30-C31-H31	120.0
C22-C21-C20	117.2(5)	C31-C32-C27	119.1(4)
C22-C21-B2	119.8(4)	C31-C32-C33	119.9(4)
C20-C21-B2	123.0(4)	C27-C32-C33	120.9(5)
C21-C22-C23	122.2(5)	O8-C33-O6	120.1(4)
C21-C22-H22	118.9	O8-C33-C32	123.1(5)
C23-C22-H22	118.9	O6-C33-C32	116.8(4)
C24-C23-C22	119.7(5)	C35-C34-C39	120.6(5)
C24-C23-H23	120.2	C35-C34-N6	123.6(5)
C22-C23-H23	120.2	C39-C34-N6	115.8(5)
C23-C24-C25	119.8(5)	C34-C35-C36	120.0(5)
C23-C24-H24	120.1	C34-C35-H35	120.0
C25-C24-H24	120.1	C36-C35-H35	120.0
C20-C25-C24	120.6(5)	C35-C36-C37	118.3(5)
C20-C25-H25	119.7	C35-C36-H36	120.9
C24-C25-H25	119.7	C37-C36-H36	120.9
O7-C26-H26A	109.5	C38-C37-C36	121.8(5)
O7-C26-H26B	109.5	C38-C37-S1	120.1(4)
H26A-C26-H26B	109.5	C36-C37-S1	118.0(4)
O7-C26-H26C	109.5	C39-C38-C37	119.1(5)
H26A-C26-H26C	109.5	C39-C38-H38	120.4
H26B-C26-H26C	109.5	C37-C38-H38	120.4
O5-C27-C28	118.9(4)	C38-C39-C34	120.1(5)
O5-C27-C32	120.3(4)	C38-C39-H39	119.9
C28-C27-C32	120.7(5)	C34-C39-H39	119.9
C29-C28-C27	119.5(4)	N7-C40-C41	111.3(5)
C29-C28-H28	120.3	N7-C40-H40A	109.4
C27-C28-H28	120.3	C41-C40-H40A	109.4
C28-C29-C30	120.5(4)	N7-C40-H40B	109.4
C28-C29-H29	119.8	C41-C40-H40B	109.4
C30-C29-H29	119.8	H40A-C40-H40B	108.0

C42-C41-C40	113.4(6)	C47-C48-C49	123.9(6)
C42-C41-H41A	108.9	C47-C48-H48	118.1
C40-C41-H41A	108.9	C49-C48-H48	118.1
C42-C41-H41B	108.9	C50-C49-C48	118.1(7)
C40-C41-H41B	108.9	C50-C49-H49	121.0
H41A-C41-H41B	107.7	C48-C49-H49	121.0
N8-C42-C41	113.1(5)	C51-C50-C49	119.1(6)
N8-C42-H42A	109.0	C51-C50-H50	120.4
C41-C42-H42A	109.0	C49-C50-H50	120.4
N8-C42-H42B	109.0	C46-C51-C50	121.9(7)
C41-C42-H42B	109.0	C46-C51-H51	119.0
H42A-C42-H42B	107.8	C50-C51-H51	119.0
N7-C43-H43A	109.5	O3-C52-H52A	109.5
N7-C43-H43B	109.5	O3-C52-H52B	109.5
H43A-C43-H43B	109.5	H52A-C52-H52B	109.5
N7-C43-H43C	109.5	O3-C52-H52C	109.5
H43A-C43-H43C	109.5	H52A-C52-H52C	109.5
H43B-C43-H43C	109.5	H52B-C52-H52C	109.5
N8-C44-H44A	109.5	O13-C53-C54	118.6(4)
N8-C44-H44B	109.5	O13-C53-C58	120.0(4)
H44A-C44-H44B	109.5	C54-C53-C58	121.4(4)
N8-C44-H44C	109.5	C53-C54-C55	119.7(5)
H44A-C44-H44C	109.5	C53-C54-H54	120.2
H44B-C44-H44C	109.5	C55-C54-H54	120.2
C46-C45-N8	113.8(5)	C54-C55-C56	119.5(4)
C46-C45-H45A	108.8	C54-C55-H55	120.2
N8-C45-H45A	108.8	C56-C55-H55	120.2
C46-C45-H45B	108.8	C57-C56-C55	120.3(4)
N8-C45-H45B	108.8	C57-C56-N9	124.6(4)
H45A-C45-H45B	107.7	C55-C56-N9	115.0(4)
C51-C46-C47	119.8(6)	C56-C57-C58	120.7(4)
C51-C46-C45	118.6(6)	C56-C57-H57	119.6
C47-C46-C45	121.5(5)	C58-C57-H57	119.6
C48-C47-C46	117.2(5)	C53-C58-C57	118.3(4)
C48-C47-B1	121.6(5)	C53-C58-C59	121.0(4)
C46-C47-B1	121.1(5)	C57-C58-C59	120.7(4)

O16-C59-O14	120.6(5)	N12-C68-H68B	108.7
O16-C59-C58	123.6(4)	C67-C68-H68B	108.7
O14-C59-C58	115.8(4)	H68A-C68-H68B	107.6
C61-C60-C65	120.4(4)	N11-C69-H69A	109.5
C61-C60-N10	116.4(4)	N11-C69-H69B	109.5
C65-C60-N10	123.1(4)	H69A-C69-H69B	109.5
C60-C61-C62	120.0(4)	N11-C69-H69C	109.5
C60-C61-H61	120.0	H69A-C69-H69C	109.5
C62-C61-H61	120.0	H69B-C69-H69C	109.5
C63-C62-C61	119.4(4)	N12-C70-H70A	109.5
C63-C62-H62	120.3	N12-C70-H70B	109.5
C61-C62-H62	120.3	H70A-C70-H70B	109.5
C62-C63-C64	121.2(4)	N12-C70-H70C	109.5
C62-C63-S4	119.1(4)	H70A-C70-H70C	109.5
C64-C63-S4	119.4(3)	H70B-C70-H70C	109.5
C65-C64-C63	118.8(4)	N12-C71-C72	114.7(4)
C65-C64-H64	120.6	N12-C71-H71A	108.6
C63-C64-H64	120.6	C72-C71-H71A	108.6
C64-C65-C60	120.2(4)	N12-C71-H71B	108.6
C64-C65-H65	119.9	C72-C71-H71B	108.6
C60-C65-H65	119.9	H71A-C71-H71B	107.6
N11-C66-C67	112.3(4)	C77-C72-C73	121.6(5)
N11-C66-H66A	109.1	C77-C72-C71	116.4(5)
C67-C66-H66A	109.1	C73-C72-C71	121.8(4)
N11-C66-H66B	109.1	C74-C73-C72	115.8(4)
C67-C66-H66B	109.1	C74-C73-B4	121.1(4)
H66A-C66-H66B	107.9	C72-C73-B4	123.0(4)
C66-C67-C68	114.1(4)	C75-C74-C73	122.4(5)
C66-C67-H67A	108.7	C75-C74-H74	118.8
C68-C67-H67A	108.7	C73-C74-H74	118.8
C66-C67-H67B	108.7	C76-C75-C74	120.3(5)
C68-C67-H67B	108.7	C76-C75-H75	119.8
H67A-C67-H67B	107.6	C74-C75-H75	119.8
N12-C68-C67	114.4(4)	C75-C76-C77	119.2(5)
N12-C68-H68A	108.7	C75-C76-H76	120.4
C67-C68-H68A	108.7	C77-C76-H76	120.4

C72-C77-C76	120.6(5)	C87-C88-C89	118.9(5)
C72-C77-H77	119.7	C87-C88-H88	120.5
C76-C77-H77	119.7	C89-C88-H88	120.5
O19-C78-H78A	109.5	C90-C89-C88	121.1(5)
O19-C78-H78B	109.5	C90-C89-S3	119.6(4)
H78A-C78-H78B	109.5	C88-C89-S3	119.2(4)
O19-C78-H78C	109.5	C91-C90-C89	119.4(5)
H78A-C78-H78C	109.5	C91-C90-H90	120.3
H78B-C78-H78C	109.5	C89-C90-H90	120.3
O17-C79-C80	120.9(4)	C86-C91-C90	119.6(5)
O17-C79-C84	120.2(4)	C86-C91-H91	120.2
C80-C79-C84	118.9(4)	C90-C91-H91	120.2
C81-C80-C79	121.0(4)	N15-C92-C93	112.3(6)
C81-C80-C85	118.9(4)	N15-C92-H92A	109.2
C79-C80-C85	120.0(4)	C93-C92-H92A	109.2
C80-C81-C82	119.6(4)	N15-C92-H92B	109.2
C80-C81-H81	120.2	C93-C92-H92B	109.2
C82-C81-H81	120.2	H92A-C92-H92B	107.9
C81-C82-C83	119.6(4)	C94-C93-C92	114.7(5)
C81-C82-N13	123.9(4)	C94-C93-H93A	108.6
C83-C82-N13	116.5(4)	C92-C93-H93A	108.6
C84-C83-C82	120.5(4)	C94-C93-H93B	108.6
C84-C83-H83	119.7	C92-C93-H93B	108.6
C82-C83-H83	119.7	H93A-C93-H93B	107.6
C83-C84-C79	120.2(4)	C93-C94-N16	114.7(5)
C83-C84-H84	119.9	C93-C94-H94A	108.6
C79-C84-H84	119.9	N16-C94-H94A	108.6
O20-C85-O18	121.4(4)	C93-C94-H94B	108.6
O20-C85-C80	122.5(4)	N16-C94-H94B	108.6
O18-C85-C80	116.1(4)	H94A-C94-H94B	107.6
C91-C86-C87	121.0(4)	N15-C95-H95A	109.5
C91-C86-N14	116.0(4)	N15-C95-H95B	109.5
C87-C86-N14	123.0(4)	H95A-C95-H95B	109.5
C88-C87-C86	119.9(5)	N15-C95-H95C	109.5
C88-C87-H87	120.1	H95A-C95-H95C	109.5
C86-C87-H87	120.1	H95B-C95-H95C	109.5

N16-C96-H96A	109.5	N2-N1-C4	116.0(5)
N16-C96-H96B	109.5	N1-N2-C8	113.6(4)
H96A-C96-H96B	109.5	C17-N3-C14	113.8(4)
N16-C96-H96C	109.5	C17-N3-S2	117.1(4)
H96A-C96-H96C	109.5	C14-N3-S2	119.6(3)
H96B-C96-H96C	109.5	C18-N4-C16	111.2(4)
N16-C97-C98	113.9(5)	C18-N4-C19	111.3(4)
N16-C97-H97A	108.8	C16-N4-C19	110.7(4)
C98-C97-H97A	108.8	N6-N5-C30	114.3(4)
N16-C97-H97B	108.8	N5-N6-C34	113.1(4)
C98-C97-H97B	108.8	C43-N7-C40	115.2(6)
H97A-C97-H97B	107.7	C43-N7-S1	115.9(5)
C103-C98-C99	120.1(6)	C40-N7-S1	115.5(4)
C103-C98-C97	117.5(6)	C42-N8-C44	111.2(5)
C99-C98-C97	122.4(5)	C42-N8-C45	112.2(5)
C100-C99-C98	117.6(5)	C44-N8-C45	110.3(5)
C100-C99-B3	120.1(6)	N10-N9-C56	114.7(4)
C98-C99-B3	122.2(6)	N9-N10-C60	113.9(4)
C101-C100-C99	121.5(7)	C69-N11-C66	115.6(4)
C101-C100-H100	119.3	C69-N11-S4	117.9(3)
C99-C100-H100	119.3	C66-N11-S4	116.4(3)
C102-C101-C100	119.5(7)	C70-N12-C71	111.3(4)
C102-C101-H101	120.2	C70-N12-C68	109.6(4)
C100-C101-H101	120.2	C71-N12-C68	109.9(4)
C103-C102-C101	120.4(6)	N14-N13-C82	114.1(4)
C103-C102-H102	119.8	N13-N14-C86	114.1(4)
C101-C102-H102	119.8	C95-N15-C92	116.3(5)
C102-C103-C98	120.9(7)	C95-N15-S3	115.8(4)
C102-C103-H103	119.6	C92-N15-S3	116.9(4)
C98-C103-H103	119.5	C97-N16-C96	110.2(5)
O15-C104-H10A	109.5	C97-N16-C94	112.1(5)
O15-C104-H10B	109.5	C96-N16-C94	110.2(5)
H10A-C104-H10B	109.5	C1-O1-B1	114.4(4)
O15-C104-H10C	109.5	C7-O2-B1	121.4(4)
H10A-C104-H10C	109.5	C52-O3-B1	112.9(4)
H10B-C104-H10C	109.5	C27-O5-B2	117.1(4)

C33-O6-B2	121.3(4)	O24-S4-N11	107.4(2)
C26-O7-B2	114.5(4)	O23-S4-C63	108.9(2)
C53-O13-B3	114.9(4)	O24-S4-C63	107.1(2)
C59-O14-B3	121.6(4)	N11-S4-C63	106.6(2)
C104-O15-B3	113.6(5)	O1-B1-O2	111.1(5)
C79-O17-B4	116.6(4)	O1-B1-O3	108.7(4)
C85-O18-B4	122.9(4)	O2-B1-O3	103.7(4)
C78-O19-B4	114.4(3)	O1-B1-C47	110.4(5)
O9-S1-O10	119.7(3)	O2-B1-C47	111.6(5)
O9-S1-N7	106.3(3)	O3-B1-C47	111.2(5)
O10-S1-N7	107.4(3)	O7-B2-O5	109.3(4)
O9-S1-C37	108.3(2)	O7-B2-O6	103.4(4)
O10-S1-C37	107.9(3)	O5-B2-O6	111.2(4)
N7-S1-C37	106.6(3)	O7-B2-C21	114.4(4)
O11-S2-O12	120.3(2)	O5-B2-C21	109.1(4)
O11-S2-N3	105.7(2)	O6-B2-C21	109.4(4)
O12-S2-N3	107.7(2)	O13-B3-O15	109.4(4)
O11-S2-C11	108.3(2)	O13-B3-O14	111.3(4)
O12-S2-C11	107.3(2)	O15-B3-O14	103.8(4)
N3-S2-C11	106.8(2)	O13-B3-C99	111.4(5)
O22-S3-O21	120.3(3)	O15-B3-C99	111.2(5)
O22-S3-N15	107.8(3)	O14-B3-C99	109.5(4)
O21-S3-N15	104.5(3)	O17-B4-O19	109.2(4)
O22-S3-C89	107.4(3)	O17-B4-O18	111.5(4)
O21-S3-C89	107.4(3)	O19-B4-O18	104.7(4)
N15-S3-C89	109.1(2)	O17-B4-C73	111.0(4)
O23-S4-O24	119.6(2)	O19-B4-C73	113.0(4)
O23-S4-N11	106.6(2)	O18-B4-C73	107.3(4)

Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for dimer **154**. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
C1	38(2)	30(2)	48(3)	2(2)	10(2)	-3(2)
C2	52(3)	40(3)	49(3)	-9(2)	15(2)	-8(2)
C3	50(3)	36(3)	58(3)	-8(2)	16(2)	-5(2)
C4	43(3)	35(2)	50(3)	4(2)	12(2)	-4(2)
C5	41(2)	31(2)	39(3)	-4(2)	4(2)	-3(2)
C6	38(2)	32(2)	44(3)	4(2)	4(2)	-2(2)
C7	37(2)	37(2)	34(3)	2(2)	1(2)	-5(2)
C8	44(3)	32(2)	45(3)	-2(2)	9(2)	-4(2)
C9	46(3)	32(2)	32(2)	-1(2)	7(2)	4(2)
C10	43(2)	30(2)	39(3)	-4(2)	3(2)	4(2)
C11	43(2)	30(2)	36(3)	-3(2)	6(2)	2(2)
C12	57(3)	54(3)	33(3)	4(2)	2(2)	-4(2)
C13	50(3)	51(3)	45(3)	2(3)	-3(2)	-11(2)
C14	56(3)	36(3)	38(3)	-5(2)	7(2)	7(2)
C15	51(3)	67(4)	45(3)	-14(3)	4(2)	23(3)
C16	36(2)	67(4)	45(3)	-3(3)	14(2)	0(2)
C17	68(4)	44(3)	35(3)	-10(2)	8(2)	18(3)
C18	49(3)	49(3)	49(3)	2(3)	3(2)	-8(2)
C19	32(2)	50(3)	46(3)	-1(2)	9(2)	4(2)
C20	33(2)	37(2)	43(3)	0(2)	3(2)	1(2)
C21	35(2)	37(2)	36(2)	-1(2)	4(2)	4(2)
C22	38(2)	37(2)	47(3)	-3(2)	2(2)	2(2)
C23	45(3)	40(3)	36(3)	-9(2)	-2(2)	2(2)
C24	40(3)	43(3)	42(3)	0(2)	-7(2)	-1(2)
C25	38(2)	41(3)	45(3)	1(2)	-3(2)	0(2)
C26	40(3)	44(3)	44(3)	-10(2)	5(2)	9(2)
C27	41(2)	37(2)	27(2)	-5(2)	9(2)	0(2)
C28	46(3)	36(2)	29(2)	-9(2)	12(2)	1(2)
C29	41(2)	45(3)	32(2)	-5(2)	10(2)	-4(2)
C30	47(3)	37(3)	31(2)	-4(2)	8(2)	-4(2)
C31	42(2)	33(2)	37(3)	-4(2)	9(2)	4(2)

C32	38(2)	40(3)	29(2)	-7(2)	5(2)	4(2)
C33	37(2)	35(2)	31(2)	-2(2)	4(2)	2(2)
C34	52(3)	37(3)	47(3)	-2(2)	19(2)	-2(2)
C35	53(3)	34(3)	61(3)	-12(2)	16(3)	-2(2)
C36	50(3)	48(3)	59(3)	-13(3)	17(3)	-8(2)
C37	60(3)	32(2)	39(3)	-6(2)	15(2)	-3(2)
C38	60(3)	35(3)	60(3)	-2(2)	26(3)	4(2)
C39	54(3)	40(3)	60(3)	-5(3)	25(3)	-6(2)
C40	83(4)	45(3)	47(3)	-4(3)	20(3)	-15(3)
C41	89(5)	55(4)	51(3)	-6(3)	16(3)	-18(3)
C42	76(4)	40(3)	62(4)	-6(3)	9(3)	-23(3)
C43	94(5)	61(4)	78(5)	-28(4)	45(4)	-29(4)
C44	92(5)	42(3)	51(3)	7(3)	14(3)	-21(3)
C45	61(3)	54(3)	47(3)	6(3)	-1(3)	-22(3)
C46	49(3)	59(3)	44(3)	8(3)	-1(2)	-18(3)
C47	44(3)	49(3)	46(3)	9(2)	4(2)	-8(2)
C48	44(3)	62(4)	49(3)	2(3)	5(2)	-9(2)
C49	50(3)	85(5)	54(3)	2(3)	12(3)	-9(3)
C50	52(3)	89(5)	65(4)	8(4)	9(3)	-23(3)
C51	61(4)	72(4)	66(4)	11(3)	8(3)	-26(3)
C52	55(3)	55(4)	51(3)	-4(3)	2(3)	3(3)
C53	27(2)	45(3)	37(3)	4(2)	2(2)	4(2)
C54	35(2)	40(3)	34(2)	-3(2)	-4(2)	2(2)
C55	34(2)	33(2)	36(2)	0(2)	6(2)	6(2)
C56	24(2)	34(2)	39(3)	7(2)	1(2)	2(2)
C57	31(2)	37(2)	29(2)	3(2)	2(2)	1(2)
C58	28(2)	40(2)	35(2)	6(2)	4(2)	4(2)
C59	29(2)	49(3)	31(3)	9(2)	-1(2)	6(2)
C60	27(2)	28(2)	34(2)	1(2)	6(2)	1(2)
C61	33(2)	31(2)	35(2)	2(2)	8(2)	4(2)
C62	37(2)	33(2)	25(2)	4(2)	6(2)	1(2)
C63	34(2)	27(2)	29(2)	1(2)	7(2)	-4(2)
C64	24(2)	28(2)	35(2)	0(2)	-2(2)	2(2)
C65	33(2)	28(2)	21(2)	1(2)	1(2)	1(2)
C66	31(2)	42(3)	38(3)	-3(2)	7(2)	0(2)
C67	29(2)	61(3)	43(3)	-15(2)	8(2)	-10(2)

C68	26(2)	66(3)	43(3)	-8(3)	0(2)	2(2)
C69	45(3)	49(3)	42(3)	-2(2)	9(2)	-2(2)
C70	45(3)	51(3)	45(3)	0(3)	5(2)	8(2)
C71	28(2)	46(3)	43(3)	-10(2)	7(2)	-2(2)
C72	36(2)	38(2)	39(3)	-2(2)	8(2)	0(2)
C73	35(2)	32(2)	28(2)	3(2)	7(2)	0(2)
C74	50(3)	33(2)	27(2)	-2(2)	5(2)	-5(2)
C75	61(3)	36(2)	33(3)	-7(2)	10(2)	-4(2)
C76	53(3)	48(3)	53(3)	-9(3)	20(2)	0(2)
C77	34(2)	48(3)	52(3)	-4(2)	12(2)	1(2)
C78	36(2)	36(2)	30(2)	-4(2)	5(2)	-5(2)
C79	36(2)	33(2)	23(2)	3(2)	4(2)	-1(2)
C80	35(2)	33(2)	24(2)	2(2)	4(2)	-3(2)
C81	39(2)	30(2)	29(2)	1(2)	6(2)	-2(2)
C82	33(2)	32(2)	23(2)	0(2)	6(2)	0(2)
C83	34(2)	33(2)	26(2)	3(2)	1(2)	-4(2)
C84	35(2)	31(2)	27(2)	0(2)	4(2)	-1(2)
C85	36(2)	29(2)	38(2)	1(2)	8(2)	-1(2)
C86	37(2)	33(2)	30(2)	0(2)	2(2)	6(2)
C87	40(2)	38(2)	30(2)	3(2)	6(2)	4(2)
C88	36(2)	44(3)	33(2)	-2(2)	5(2)	3(2)
C89	45(3)	39(3)	33(2)	2(2)	4(2)	13(2)
C90	41(3)	33(2)	48(3)	1(2)	0(2)	3(2)
C91	34(2)	37(3)	45(3)	-1(2)	5(2)	1(2)
C92	58(3)	60(4)	47(3)	-3(3)	6(3)	9(3)
C93	66(4)	72(4)	46(3)	-16(3)	5(3)	15(3)
C94	70(4)	54(3)	67(4)	-8(3)	14(3)	27(3)
C95	71(4)	51(4)	69(4)	-18(3)	0(3)	17(3)
C96	65(4)	74(5)	59(4)	19(3)	10(3)	31(3)
C97	58(3)	62(4)	44(3)	2(3)	8(3)	28(3)
C98	39(3)	85(4)	38(3)	3(3)	5(2)	23(3)
C99	36(3)	81(4)	31(3)	2(3)	2(2)	16(2)
C100	45(3)	97(5)	34(3)	0(3)	3(2)	11(3)
C101	46(3)	119(6)	45(3)	-3(4)	-4(3)	13(3)
C102	46(3)	120(6)	53(4)	-4(4)	1(3)	30(4)
C103	47(3)	102(5)	48(3)	-1(3)	4(3)	28(3)

C104	59(3)	59(4)	52(3)	3(3)	14(3)	10(3)
N1	43(2)	37(2)	48(3)	3(2)	12(2)	-2(2)
N2	50(2)	38(2)	40(2)	3(2)	3(2)	-4(2)
N3	47(2)	33(2)	37(2)	-1(2)	12(2)	5(2)
N4	41(2)	41(2)	36(2)	-3(2)	6(2)	1(2)
N5	46(2)	40(2)	36(2)	-5(2)	7(2)	-2(2)
N6	50(2)	37(2)	48(3)	-6(2)	12(2)	-4(2)
N7	76(3)	42(3)	69(3)	-13(2)	35(3)	-14(2)
N8	65(3)	47(3)	42(3)	6(2)	8(2)	-20(2)
N9	28(2)	35(2)	39(2)	-1(2)	6(2)	6(2)
N10	32(2)	36(2)	32(2)	6(2)	5(2)	5(2)
N11	29(2)	42(2)	31(2)	-8(2)	2(2)	-1(2)
N12	28(2)	41(2)	36(2)	-5(2)	1(2)	5(2)
N13	34(2)	28(2)	31(2)	1(2)	4(2)	-1(1)
N14	39(2)	30(2)	36(2)	0(2)	2(2)	4(2)
N15	59(3)	46(3)	53(3)	-7(2)	5(2)	16(2)
N16	56(3)	59(3)	47(3)	1(2)	7(2)	22(2)
O1	40(2)	38(2)	51(2)	2(2)	10(2)	-1(1)
O2	45(2)	44(2)	40(2)	5(2)	4(2)	-10(2)
O3	47(2)	40(2)	39(2)	1(2)	2(2)	-5(2)
O4	45(2)	57(2)	44(2)	-1(2)	5(2)	-16(2)
O5	40(2)	38(2)	37(2)	-6(2)	12(1)	1(1)
O6	36(2)	37(2)	41(2)	-4(2)	7(1)	6(1)
O7	31(2)	34(2)	39(2)	-3(1)	5(1)	5(1)
O8	44(2)	36(2)	69(3)	-11(2)	15(2)	9(2)
O9	65(2)	48(2)	52(2)	0(2)	28(2)	-9(2)
O10	86(3)	36(2)	93(3)	4(2)	40(3)	-4(2)
O11	45(2)	24(2)	49(2)	-1(2)	15(2)	2(1)
O12	53(2)	42(2)	47(2)	6(2)	11(2)	0(2)
O13	30(2)	49(2)	39(2)	0(2)	-6(1)	6(1)
O14	31(2)	52(2)	40(2)	1(2)	2(1)	13(1)
O15	39(2)	48(2)	38(2)	1(2)	8(1)	13(2)
O16	43(2)	54(2)	33(2)	-2(2)	-2(2)	18(2)
O17	37(2)	30(2)	31(2)	2(1)	1(1)	2(1)
O18	33(2)	26(2)	38(2)	-2(1)	4(1)	0(1)
O19	28(1)	30(2)	35(2)	-3(1)	3(1)	-2(1)

O20	34(2)	30(2)	67(2)	-6(2)	1(2)	-4(1)
O21	48(2)	61(3)	49(2)	3(2)	4(2)	12(2)
O22	62(3)	54(3)	69(3)	12(2)	5(2)	24(2)
O23	37(2)	36(2)	38(2)	2(2)	1(1)	7(1)
O24	38(2)	46(2)	34(2)	4(2)	6(1)	5(1)
S1	72(1)	34(1)	60(1)	-5(1)	32(1)	-9(1)
S2	43(1)	29(1)	35(1)	2(1)	11(1)	1(1)
S3	51(1)	40(1)	50(1)	2(1)	4(1)	14(1)
S4	30(1)	35(1)	28(1)	2(1)	3(1)	2(1)
B1	41(3)	37(3)	46(3)	-3(3)	2(2)	-6(2)
B2	39(3)	33(3)	38(3)	-1(2)	15(2)	2(2)
B3	29(2)	56(3)	40(3)	1(3)	1(2)	12(2)
B4	34(2)	27(2)	33(3)	-5(2)	2(2)	0(2)

Table 5. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for dimer **154**.

	x	y	z	U(eq)
H2	8531	1800	5779	55
H3	7407	1542	6216	56
H5	7868	2154	7913	45
H9	5338	1426	7189	44
H10	4263	1108	7580	45
H12	5492	1205	9538	58
H13	6569	1519	9135	60
H14A	2946	1078	7759	52
H14B	2658	1458	7983	52
H15A	1435	1160	7567	66
H15B	1464	1191	8379	66
H16A	2003	601	8493	58
H16B	1051	627	8092	58
H17A	3484	1637	9085	74
H17B	3361	1387	9714	74
H17C	2547	1542	9228	74
H18A	2516	96	8054	74
H18B	2297	-4	7257	74
H18C	1560	-1	7725	74
H19A	701	430	6930	51
H19B	1153	781	6734	51
H22	2703	361	5023	49
H23	1752	-69	4530	50
H24	643	-248	5091	52
H25	458	15	6129	51
H26A	3523	198	6723	64
H26B	4018	361	7421	64
H26C	4299	462	6701	64
H28	4922	906	5390	44
H29	5692	1427	5450	47
H31	3780	1936	6182	44

H35	6626	2374	5853	59
H36	7451	2888	5939	62
H38	5364	3453	6219	60
H39	4561	2939	6148	60
H40A	8185	3195	6886	68
H40B	7821	3216	7599	68
H41A	8825	3664	7990	78
H41B	9300	3313	7818	78
H42A	9007	3877	6848	72
H42B	9861	3856	7395	72
H43A	6505	3558	7489	111
H43B	6552	3949	7206	111
H43C	7202	3825	7865	111
H44A	9374	3785	5802	92
H44B	10093	3511	5670	92
H44C	10349	3858	6110	92
H45A	11056	3524	7120	66
H45B	10564	3205	7408	66
H48	10863	2307	5832	62
H49	12157	2459	5486	75
H50	12718	3026	5751	82
H51	12025	3400	6420	80
H52A	9447	2880	5330	82
H52B	8491	3012	5328	82
H52C	8709	2602	5392	82
H54	4141	4230	9234	45
H55	2845	4496	8780	41
H57	2690	3881	7095	39
H61	922	4422	5811	39
H62	-263	4753	5325	38
H64	-713	5014	7241	36
H65	468	4680	7719	33
H66A	-2126	4888	6914	44
H66B	-2430	4508	6629	44
H67A	-3540	4776	7068	53
H67B	-3807	4726	6258	53

H68A	-3413	5332	6124	55
H68B	-4244	5276	6473	55
H69A	-1976	4386	5516	68
H69B	-2278	4664	4920	68
H69C	-2965	4476	5310	68
H70A	-3824	5910	6765	71
H70B	-2878	5874	6592	71
H70C	-3025	5984	7349	71
H71A	-3683	5154	7856	47
H71B	-4306	5471	7595	47
H74	-1748	5742	9608	44
H75	-2719	6102	10030	52
H76	-4093	6166	9433	60
H77	-4478	5873	8382	53
H78A	-1567	5874	7836	51
H78B	-963	5683	7371	51
H78C	-713	5684	8189	51
H81	-812	4121	8671	39
H83	1321	4675	9399	38
H84	514	5183	9414	37
H87	2145	3716	8826	43
H88	2971	3206	8848	45
H90	869	2616	8987	50
H91	51	3129	8967	47
H92A	3370	2828	8038	66
H92B	2753	2748	7333	66
H93A	3629	2284	7098	74
H93B	4159	2641	7193	74
H94A	4876	2135	7739	76
H94B	4212	2142	8269	76
H95A	1459	2421	7558	97
H95B	1664	2053	7937	97
H95C	2036	2138	7246	97
H96A	5774	2157	8988	99
H96B	4999	2298	9341	99
H96C	5844	2528	9371	99

H97A	5525	2801	7642	66
H97B	6136	2488	7954	66
H100	6463	3726	9223	71
H101	7890	3562	9538	86
H102	8345	3013	9220	89
H103	7387	2625	8606	79
H10A	5253	3196	9767	85
H10B	4361	3006	9792	85
H10C	4399	3423	9712	85

Table 6. Torsion angles [°] for dimer **154**.

O1-C1-C2-C3	176.2(5)	C19-C20-C21-B2	5.2(8)
C6-C1-C2-C3	-0.8(8)	C20-C21-C22-C23	1.7(8)
C1-C2-C3-C4	0.2(9)	B2-C21-C22-C23	-179.3(5)
C2-C3-C4-C5	-0.5(9)	C21-C22-C23-C24	-2.0(8)
C2-C3-C4-N1	-176.9(5)	C22-C23-C24-C25	0.9(8)
C3-C4-C5-C6	1.4(8)	C21-C20-C25-C24	-0.6(8)
N1-C4-C5-C6	177.5(5)	C19-C20-C25-C24	175.2(5)
C4-C5-C6-C1	-2.0(8)	C23-C24-C25-C20	0.4(8)
C4-C5-C6-C7	-179.5(5)	O5-C27-C28-C29	177.2(4)
O1-C1-C6-C5	-175.2(5)	C32-C27-C28-C29	-0.3(8)
C2-C1-C6-C5	1.7(8)	C27-C28-C29-C30	-1.5(8)
O1-C1-C6-C7	2.3(7)	C28-C29-C30-C31	2.1(8)
C2-C1-C6-C7	179.2(5)	C28-C29-C30-N5	-178.7(5)
C5-C6-C7-O4	7.1(8)	C29-C30-C31-C32	-0.7(8)
C1-C6-C7-O4	-170.4(5)	N5-C30-C31-C32	-179.8(5)
C5-C6-C7-O2	-175.2(5)	C30-C31-C32-C27	-1.1(7)
C1-C6-C7-O2	7.3(7)	C30-C31-C32-C33	-178.3(5)
C13-C8-C9-C10	1.0(8)	O5-C27-C32-C31	-175.9(4)
N2-C8-C9-C10	179.9(5)	C28-C27-C32-C31	1.7(7)
C8-C9-C10-C11	-0.3(7)	O5-C27-C32-C33	1.3(7)
C9-C10-C11-C12	0.0(7)	C28-C27-C32-C33	178.8(5)
C9-C10-C11-S2	178.2(4)	C31-C32-C33-O8	3.2(8)
C10-C11-C12-C13	-0.3(8)	C27-C32-C33-O8	-174.0(5)
S2-C11-C12-C13	-178.5(5)	C31-C32-C33-O6	-176.8(4)
C11-C12-C13-C8	0.9(9)	C27-C32-C33-O6	6.0(7)
C9-C8-C13-C12	-1.3(9)	C39-C34-C35-C36	2.4(9)
N2-C8-C13-C12	179.7(5)	N6-C34-C35-C36	-176.9(6)
N3-C14-C15-C16	-67.8(6)	C34-C35-C36-C37	-2.4(9)
C14-C15-C16-N4	-68.4(6)	C35-C36-C37-C38	2.0(9)
N4-C19-C20-C25	118.4(5)	C35-C36-C37-S1	177.4(5)
N4-C19-C20-C21	-65.9(7)	C36-C37-C38-C39	-1.6(9)
C25-C20-C21-C22	-0.4(7)	S1-C37-C38-C39	-176.9(5)
C19-C20-C21-C22	-175.9(5)	C37-C38-C39-C34	1.5(9)
C25-C20-C21-B2	-179.3(5)	C35-C34-C39-C38	-1.9(9)

N6-C34-C39-C38	177.5(6)	C61-C62-C63-C64	-0.7(7)
N7-C40-C41-C42	-61.7(7)	C61-C62-C63-S4	-175.0(3)
C40-C41-C42-N8	-73.9(8)	C62-C63-C64-C65	0.5(7)
N8-C45-C46-C51	112.4(6)	S4-C63-C64-C65	174.8(3)
N8-C45-C46-C47	-69.9(7)	C63-C64-C65-C60	0.5(6)
C51-C46-C47-C48	0.1(9)	C61-C60-C65-C64	-1.3(7)
C45-C46-C47-C48	-177.7(5)	N10-C60-C65-C64	-179.5(4)
C51-C46-C47-B1	-175.3(6)	N11-C66-C67-C68	-61.6(6)
C45-C46-C47-B1	7.0(9)	C66-C67-C68-N12	-72.2(6)
C46-C47-C48-C49	1.6(9)	N12-C71-C72-C77	121.7(5)
B1-C47-C48-C49	176.9(6)	N12-C71-C72-C73	-62.7(6)
C47-C48-C49-C50	-2.8(10)	C77-C72-C73-C74	-1.7(7)
C48-C49-C50-C51	2.3(11)	C71-C72-C73-C74	-177.2(4)
C47-C46-C51-C50	-0.4(10)	C77-C72-C73-B4	174.5(5)
C45-C46-C51-C50	177.4(6)	C71-C72-C73-B4	-0.9(7)
C49-C50-C51-C46	-0.8(11)	C72-C73-C74-C75	3.1(7)
O13-C53-C54-C55	176.5(4)	B4-C73-C74-C75	-173.2(5)
C58-C53-C54-C55	-1.1(8)	C73-C74-C75-C76	-1.9(8)
C53-C54-C55-C56	-0.5(7)	C74-C75-C76-C77	-0.9(8)
C54-C55-C56-C57	0.5(7)	C73-C72-C77-C76	-0.9(8)
C54-C55-C56-N9	-176.9(4)	C71-C72-C77-C76	174.7(5)
C55-C56-C57-C58	1.1(7)	C75-C76-C77-C72	2.3(9)
N9-C56-C57-C58	178.2(4)	O17-C79-C80-C81	-175.9(4)
O13-C53-C58-C57	-175.0(4)	C84-C79-C80-C81	2.4(6)
C54-C53-C58-C57	2.5(7)	O17-C79-C80-C85	1.9(6)
O13-C53-C58-C59	1.9(7)	C84-C79-C80-C85	-179.9(4)
C54-C53-C58-C59	179.4(5)	C79-C80-C81-C82	-3.4(6)
C56-C57-C58-C53	-2.5(7)	C85-C80-C81-C82	178.8(4)
C56-C57-C58-C59	-179.4(4)	C80-C81-C82-C83	1.7(6)
C53-C58-C59-O16	-169.7(5)	C80-C81-C82-N13	-178.5(4)
C57-C58-C59-O16	7.0(8)	C81-C82-C83-C84	0.9(6)
C53-C58-C59-O14	10.6(7)	N13-C82-C83-C84	-179.0(4)
C57-C58-C59-O14	-172.7(4)	C82-C83-C84-C79	-1.9(7)
C65-C60-C61-C62	1.1(7)	O17-C79-C84-C83	178.5(4)
N10-C60-C61-C62	179.5(4)	C80-C79-C84-C83	0.3(6)
C60-C61-C62-C63	-0.1(7)	C81-C80-C85-O20	9.4(7)

C79-C80-C85-O20	-168.4(5)	C15-C16-N4-C19	-74.4(6)
C81-C80-C85-O18	-171.7(4)	C20-C19-N4-C18	-57.9(6)
C79-C80-C85-O18	10.4(6)	C20-C19-N4-C16	177.9(4)
C91-C86-C87-C88	-2.3(7)	C29-C30-N5-N6	-179.4(5)
N14-C86-C87-C88	-179.0(4)	C31-C30-N5-N6	-0.2(7)
C86-C87-C88-C89	1.5(7)	C30-N5-N6-C34	179.1(5)
C87-C88-C89-C90	-0.8(7)	C35-C34-N6-N5	-13.0(8)
C87-C88-C89-S3	176.9(4)	C39-C34-N6-N5	167.7(5)
C88-C89-C90-C91	0.7(8)	C41-C40-N7-C43	-94.9(6)
S3-C89-C90-C91	-176.9(4)	C41-C40-N7-S1	125.5(5)
C87-C86-C91-C90	2.3(8)	C41-C42-N8-C44	154.9(6)
N14-C86-C91-C90	179.2(5)	C41-C42-N8-C45	-81.0(6)
C89-C90-C91-C86	-1.5(8)	C46-C45-N8-C42	176.7(4)
N15-C92-C93-C94	-59.7(8)	C46-C45-N8-C44	-58.8(6)
C92-C93-C94-N16	-72.5(8)	C57-C56-N9-N10	-0.6(7)
N16-C97-C98-C103	113.5(6)	C55-C56-N9-N10	176.6(4)
N16-C97-C98-C99	-65.7(7)	C56-N9-N10-C60	-176.2(4)
C103-C98-C99-C100	1.5(9)	C61-C60-N10-N9	155.6(4)
C97-C98-C99-C100	-179.3(5)	C65-C60-N10-N9	-26.1(6)
C103-C98-C99-B3	-175.7(6)	C67-C66-N11-C69	-95.1(5)
C97-C98-C99-B3	3.4(9)	C67-C66-N11-S4	120.1(4)
C98-C99-C100-C101	0.4(9)	C72-C71-N12-C70	-58.8(5)
B3-C99-C100-C101	177.7(6)	C72-C71-N12-C68	179.6(4)
C99-C100-C101-C102	-1.1(10)	C67-C68-N12-C70	163.3(4)
C100-C101-C102-C103	-0.2(11)	C67-C68-N12-C71	-74.1(5)
C101-C102-C103-C98	2.2(11)	C81-C82-N13-N14	-4.3(6)
C99-C98-C103-C102	-2.9(10)	C83-C82-N13-N14	175.6(4)
C97-C98-C103-C102	178.0(6)	C82-N13-N14-C86	178.7(4)
C3-C4-N1-N2	172.3(5)	C91-C86-N14-N13	161.7(4)
C5-C4-N1-N2	-3.9(8)	C87-C86-N14-N13	-21.5(7)
C4-N1-N2-C8	-179.6(4)	C93-C92-N15-C95	-95.1(6)
C13-C8-N2-N1	151.6(5)	C93-C92-N15-S3	122.2(5)
C9-C8-N2-N1	-27.4(7)	C98-C97-N16-C96	-58.6(7)
C15-C14-N3-C17	-95.5(6)	C98-C97-N16-C94	178.3(5)
C15-C14-N3-S2	118.9(4)	C93-C94-N16-C97	-78.7(6)
C15-C16-N4-C18	161.3(5)	C93-C94-N16-C96	158.2(5)

C2-C1-O1-B1	153.0(5)	C10-C11-S2-O12	176.6(4)
C6-C1-O1-B1	-30.1(7)	C12-C11-S2-O12	-5.2(5)
O4-C7-O2-B1	-169.7(5)	C10-C11-S2-N3	-68.2(4)
C6-C7-O2-B1	12.5(7)	C12-C11-S2-N3	110.0(5)
C28-C27-O5-B2	156.3(5)	C95-N15-S3-O22	40.1(5)
C32-C27-O5-B2	-26.1(7)	C92-N15-S3-O22	-177.1(4)
O8-C33-O6-B2	-168.1(5)	C95-N15-S3-O21	169.2(4)
C32-C33-O6-B2	11.9(6)	C92-N15-S3-O21	-48.0(5)
C54-C53-O13-B3	151.3(5)	C95-N15-S3-C89	-76.3(5)
C58-C53-O13-B3	-31.1(6)	C92-N15-S3-C89	66.5(5)
O16-C59-O14-B3	-172.5(5)	C90-C89-S3-O22	-19.9(5)
C58-C59-O14-B3	7.2(7)	C88-C89-S3-O22	162.4(4)
C80-C79-O17-B4	-28.5(6)	C90-C89-S3-O21	-150.6(4)
C84-C79-O17-B4	153.3(4)	C88-C89-S3-O21	31.7(5)
O20-C85-O18-B4	-176.2(4)	C90-C89-S3-N15	96.7(5)
C80-C85-O18-B4	4.9(6)	C88-C89-S3-N15	-80.9(5)
C43-N7-S1-O9	170.5(4)	C69-N11-S4-O23	168.6(4)
C40-N7-S1-O9	-50.3(5)	C66-N11-S4-O23	-47.5(4)
C43-N7-S1-O10	41.2(5)	C69-N11-S4-O24	39.3(4)
C40-N7-S1-O10	-179.6(4)	C66-N11-S4-O24	-176.8(3)
C43-N7-S1-C37	-74.2(5)	C69-N11-S4-C63	-75.2(4)
C40-N7-S1-C37	65.1(5)	C66-N11-S4-C63	68.8(4)
C38-C37-S1-O9	-158.0(5)	C62-C63-S4-O23	-152.7(4)
C36-C37-S1-O9	26.5(5)	C64-C63-S4-O23	32.9(4)
C38-C37-S1-O10	-27.1(6)	C62-C63-S4-O24	-22.1(4)
C36-C37-S1-O10	157.4(5)	C64-C63-S4-O24	163.5(4)
C38-C37-S1-N7	88.0(5)	C62-C63-S4-N11	92.6(4)
C36-C37-S1-N7	-87.5(5)	C64-C63-S4-N11	-81.8(4)
C17-N3-S2-O11	172.7(4)	C1-O1-B1-O2	46.3(6)
C14-N3-S2-O11	-42.8(4)	C1-O1-B1-O3	-67.2(6)
C17-N3-S2-O12	42.9(4)	C1-O1-B1-C47	170.6(4)
C14-N3-S2-O12	-172.6(4)	C7-O2-B1-O1	-38.9(7)
C17-N3-S2-C11	-72.0(4)	C7-O2-B1-O3	77.8(6)
C14-N3-S2-C11	72.4(4)	C7-O2-B1-C47	-162.5(5)
C10-C11-S2-O11	45.3(5)	C52-O3-B1-O1	-55.3(6)
C12-C11-S2-O11	-136.5(4)	C52-O3-B1-O2	-173.6(4)

C52-O3-B1-C47	66.4(6)	C104-O15-B3-O14	-175.1(4)
C48-C47-B1-O1	6.8(8)	C104-O15-B3-C99	67.3(6)
C46-C47-B1-O1	-178.1(5)	C59-O14-B3-O13	-34.7(6)
C48-C47-B1-O2	130.9(6)	C59-O14-B3-O15	82.9(6)
C46-C47-B1-O2	-54.0(7)	C59-O14-B3-C99	-158.3(5)
C48-C47-B1-O3	-113.9(6)	C100-C99-B3-O13	8.7(7)
C46-C47-B1-O3	61.2(7)	C98-C99-B3-O13	-174.1(5)
C26-O7-B2-O5	-54.9(5)	C100-C99-B3-O15	-113.6(6)
C26-O7-B2-O6	-173.4(4)	C98-C99-B3-O15	63.6(7)
C26-O7-B2-C21	67.7(5)	C100-C99-B3-O14	132.3(5)
C27-O5-B2-O7	-72.8(5)	C98-C99-B3-O14	-50.5(7)
C27-O5-B2-O6	40.7(6)	C79-O17-B4-O19	-74.6(5)
C27-O5-B2-C21	161.4(4)	C79-O17-B4-O18	40.6(5)
C33-O6-B2-O7	82.7(5)	C79-O17-B4-C73	160.2(4)
C33-O6-B2-O5	-34.4(6)	C78-O19-B4-O17	-59.7(5)
C33-O6-B2-C21	-155.0(4)	C78-O19-B4-O18	-179.3(3)
C22-C21-B2-O7	-123.2(5)	C78-O19-B4-C73	64.4(5)
C20-C21-B2-O7	55.7(6)	C85-O18-B4-O17	-29.4(6)
C22-C21-B2-O5	-0.4(6)	C85-O18-B4-O19	88.5(5)
C20-C21-B2-O5	178.5(4)	C85-O18-B4-C73	-151.2(4)
C22-C21-B2-O6	121.4(5)	C74-C73-B4-O17	2.2(6)
C20-C21-B2-O6	-59.7(6)	C72-C73-B4-O17	-173.8(4)
C53-O13-B3-O15	-68.5(5)	C74-C73-B4-O19	-120.9(5)
C53-O13-B3-O14	45.6(6)	C72-C73-B4-O19	63.1(6)
C53-O13-B3-C99	168.2(4)	C74-C73-B4-O18	124.3(4)
C104-O15-B3-O13	-56.1(5)	C72-C73-B4-O18	-51.8(6)

9. Danksagung

Mein erster und ganz besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater [REDACTED] für das Ermöglichen sowie die Betreuung dieser teils extern durchgeführten Forschungsarbeit, die hilfreichen Anregungen und Diskussionen sowie die Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes in Austin (TX, USA).

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt [REDACTED] für die Bereitstellung dieses äußerst interessanten Themas, das mir eine spannende Zusammenarbeit mit verschiedenen Disziplinen ermöglichte, für die zahlreichen Diskussionen und für die Betreuung bei der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH.

[REDACTED] danke ich für die Betreuung während meines Forschungsaufenthaltes in Austin (TX), die hilfreichen Anregungen und diese erfahrungsreiche Zeit in einer tollen Atmosphäre.

Ebenfalls danken möchte ich [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] für die Einweisung in die Proteinkristallographie, das Fischen der Kristalle und die Prozessierung der Daten. Für die tolle Zusammenarbeit bei den radioaktiven Experimenten und das Vertrauen möchte ich mich bei [REDACTED] bedanken.

[REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] möchte ich für die Durchführung der NMR-Experimente, und [REDACTED] und Mitarbeitern, [REDACTED] sowie [REDACTED] möchte ich für die Aufnahme der HRMS-Spektren danken. [REDACTED] und [REDACTED] danke ich für die Durchführung der Kristallstrukturanalysen.

Ein herzlicher Dank gilt [REDACTED] für die stete Hilfsbereitschaft.

Bei [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] und dem restlichen Team des Kooperationspartners möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Ein großer Dank gebührt [REDACTED] und [REDACTED] für die große Hilfsbereitschaft.

Ich danke auch [REDACTED], die mich in ihrem Forschungsmodul nicht nur synthetisch unterstützt hat.

Ein besonders großer Dank geht an [REDACTED], [REDACTED],
[REDACTED] und [REDACTED] für die sehr gründliche Durchsicht dieser Arbeit.

Bei meinen Laborkollegen [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED],
[REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED],
[REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] sowie den
restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe [REDACTED] und der Arbeitsgruppe Anslyn möchte ich
mich für die angenehme und lustige Arbeitsatmosphäre sowie für die stete
Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein letzter ganz besonderer Dank gebührt meinem Freund [REDACTED], der immer ein
offenes Ohr für mich hatte, mich motiviert und immer an mich geglaubt hat sowie an
meinen Vater, ohnen dessen Rückhalt und finanzielle Unterstützung dieser Weg für mich
nicht machbar gewesen wäre.