

Untersuchungen an Flavonsäurederivaten mit hoher β -Glukanaffinität

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Björn Torp-Patragst
geb. Torp
aus Sanderbusch

Göttingen 2002

D7

Referent: Prof. Dr. H. Laatsch

Korreferent: Prof. Dr. R. Rüchel

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1997 bis Mai 2002 im Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität zu Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. H. Laatsch angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Laatsch danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit und seine ständige Bereitschaft, auftretende Probleme zu diskutieren.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Pilze	1
1.2	System-Mykosen	3
1.3	Diagnostische Methoden	7
1.3.1	Klinisches Bild	8
1.3.2	Kulturelle Verfahren	8
1.3.3	Serologische Verfahren	8
1.3.4	Endoskopie	9
1.3.5	Biopsie	9
1.3.6	Polymerase-Kettenreaktion	10
1.3.7	Bildgebende Verfahren	10
1.3.8	Färbung und Mikroskopie	11
1.4	Optische Aufheller / Weißtöner	13
2.	AUFGABENSTELLUNG	18
3.	PLANUNG UND DURCHFÜHRUNG	21
3.1	Einführung und Vorüberlegungen	21
3.2	Überlegungen zu antimykotisch aktiven Diaminostilbenderivaten	29
3.3	Untersuchungen zu antimykotisch aktiven Diaminostilben- disulfonsäurederivaten	36
3.4	Untersuchungen an Diaminostilbentetrasulfonsäurederivaten	39
3.4.1	Herkömmliche Syntheseverfahren von Diaminostilbentetrasulfon- säurederivaten	39
3.4.2	Untersuchungen zu modifizierten Synthesen von Diaminostilben- tetrasulfonsäurederivaten	48
3.4.3	Syntheseversuche an Harzen	60
3.5	HSCCC	63
3.5.1	Einführung	63
3.5.2	Lösungsmittelauswahl und Trennversuche	65
3.6	Elektrophorese	69

3.7	Vortests zur Bindungsfähigkeit	74
4.	SPEZIFISCHE DETEKTION SYSTEMISCHER MYKOSEN.....	75
4.1	Einführung	75
4.2	Synthese radioaktiv markierter Stilbenderivate.....	80
4.3	Radiomarkierung	82
4.4	Bindungs-Studien	83
4.5	Bioverteilungs-Studien.....	87
4.6	Untersuchungen zur Bindungs-Spezifität.....	90
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	93
6.	MATERIALIEN UND METHODEN.....	96
6.1	Allgemeines	96
6.2	Materialien	97
6.3	Elektrophorese	98
6.3.1	Pufferlösungen.....	99
6.3.2	Betriebsparameter	99
6.3.3	Vorproben an der Miniaturelektrophorese	101
6.4	Inbetriebnahme der HSCCC.....	102
6.5	Herstellung der Puffersalzmischung	103
6.6	Tierversuche.....	103
7.	UNTERSUCHUNGEN ZUM AUFBAU DER AUFHELLER	104
7.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	104
7.1.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 zur Umsetzung von Tetranatrium-4,4'-bis- [(4-chloro)-6-(<i>p</i> -sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl))-amino]- <i>trans</i> -stilben-2,2'- disulfonat (6) mit Aminen und Alkoholen (AAV 1).....	104
7.1.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 zum Aufbau von 4,4'-Bis- {[4-(<i>p</i> -sulfo-phenylamino)-6-(alkylamino/alkoxy)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}- <i>trans</i> -stilben-2,2'- disulfonsäuren (AAV 2).....	105
7.1.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 zum Aufbau von 4,4'-Bis- {[4-(<i>p</i> -sulfo-phenylamino)-6-(alkylamino/alkoxy)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}- <i>trans</i> -stilben-2,2'- disulfonsäuren (AAV 3).....	105

7.1.4	Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 zum Aufbau von 4,4'-Bis-{{4-(<i>p</i> -sulfo-phenylamino)-6-(alkylamino/alkoxy)-1,3,5-triazin-2-yl}amino}- <i>trans</i> -stilben-2,2'-disulfonsäuren (AAV 4).....	106
7.1.5	Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 zur Umsetzung von Tetranatrium-4,4'-bis-{{(4-chloro)-6-(<i>p</i> -sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)}-amino}- <i>trans</i> -stilben-2,2'-disulfonat mit Aminen und Alkoholen (AAV 5):.....	107
7.1.6	Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 zur Umsetzung von Tetranatrium-4,4'-bis-{{(4-chloro)-6-(<i>p</i> -sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)}-amino}- <i>trans</i> -stilben-2,2'-disulfonat (AAV 6):.....	107
7.1.7	Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 zur Umsetzung von Tetranatrium-4,4'-bis-{{(4-chloro)-6-(<i>p</i> -sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)}-amino}- <i>trans</i> -stilben-2,2'-disulfonat mit Aminen und Alkoholen (AAV 7).....	108
7.2	Umsetzungen mit Tyramin-Hydrochlorid.....	108
7.3	Synthesversuche an Amberlyst 15.....	118
7.4	Kupplungsversuche am Harz.....	119
7.5	Umsetzung mit 6-Aminohexansäure (25).....	120
7.6	Umsetzungen mit 11-Aminoundecansäure (26).....	120
7.7	Umsetzungen mit Polyethylenglycolhomologen mit einer mittleren Molmasse von 600 (PEG600) (30).....	123
7.8	Umsetzungen mit Histidin (31).....	124
7.9	Umsetzungen mit 1,6-Diaminohexan (28).....	126
7.10	Umsetzungen mit 1,12-Diaminododecan (27).....	126
7.11	Umsetzungen mit 1,12-Dodecandiol (39).....	128
7.12	Umsetzung mit D, L-Lysin (23).....	129
7.13	Umsetzung mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan (29).....	130
7.14	Untersuchungen zu Dichlortriazinen.....	130
7.15	Radiomarkierung.....	133
7.15.1	Bindungs-Studien.....	133
7.15.2	Bioverteilungs-Studien.....	134
8.	LITERATURVERZEICHNIS UND ANMERKUNGEN.....	135

1. Einleitung

1.1 Pilze

Mit dem Begriff Pilz assoziieren wir in der Regel den eßbaren oder giftigen Fruchtkörper eines „Speisepilzes“ oder eines „Giftpilzes“. Der eigentliche Pilzkörper, das Myzel, befindet sich bei diesen Pilzen großflächig ring- oder strahlenförmig ausgehend im Erdboden. Es besteht aus feinsten, oftmals durch regelmäßig angeordnete Querwände (Septen) unterteilten Zellfäden. Diese Hyphen sind bei der überwiegenden Anzahl Fruchtkörper bildender Pilze netzartig miteinander verflochten. Von den im biologischen, engeren Sinne als echte Pilze zu bezeichnenden Eumykota sind derzeit etwa 60.000 Arten beschrieben worden, womit etwa ein Viertel der tatsächlich existierenden Spezies erreicht sein dürfte. Damit ziehen die Pilze in ihrer Vielfalt mit den Blütenpflanzen gleich. Pilze können einzellig sein, coenocytisch im Zellverband leben oder vielzellige Organismen darstellen. Zur Vermehrung werden – artunterschiedlich – geschlechtliche oder ungeschlechtliche Sporen gebildet oder man kann Sprossung beobachten. Einzellige, sich durch Sprossung vermehrende Pilze werden auch als Hefen bezeichnet.

Pilze besitzen kein Chlorophyll und müssen daher die benötigten organischen Materialien auf anderem Wege als durch Photosynthese erlangen. Dazu leben sie parasitär oder in Symbiose z. B. in den Wurzelbereichen der Orchideen oder zusammen mit Algen oder Cyanobakterien, wodurch Flechten gebildet werden. Besonders häufig zersetzen sie organisches Material, wie tote Pflanzen oder Tiere, und können dabei auf viele Enzyme zurückgreifen. Auf diese Weise können sich die Pilze verschiedenste Lebensräume erobern. In Modellstudien auf durch Sprengstoffherstellung kontaminierten Standorten konnte gezeigt werden, daß speziell ausgewählte Pilze sogar hochnitrierte Aromaten im Erdboden bis nahe an die Nachweisgrenze heran abzubauen vermögen.

Die so angedeutete Vielfalt für Pilze nutzbarer Ressourcen bringt ein ebenso reiches Spektrum an Sekundärmetaboliten mit sich, was sich die Menschen schon seit alters

her nutzbar machten. Pilze werden bei der Herstellung von alkoholischen Getränken, Brot und zur Veredelung von Käse verwendet, wobei mit Zitronensäure, Milchsäure oder Gluconsäure häufig auch Substanzen gebildet werden, die im menschlichen Stoffwechsel ebenfalls zu finden sind. Viele andere aus Pilzen isolierbare Substanzen haben ein beträchtliches pharmakologisches Potential und werden als pharmazeutische Produkte eingesetzt. Dazu zählen z. B. die oft eindrucksvoll farbigen Chinone, Azulene, Carotinoide und Xanthene. Pilze, ihre Metabolite und von deren Grundstrukturen abgeleitete Derivate sind deshalb nach wie vor, in einigen Bereichen sogar in wachsendem Maße, Forschungsgegenstand^[1].

Neben diesen vorwiegend positiv geschilderten Eigenschaften haben Pilze aber auch negative Aspekte. Dabei kann man sich über die Wirkung der Pilze im Blauschimmelkäse, in der Rinde des Limburger Käses oder nach dem Verzehr verschiedener *Psilocybe sp.* als „Geschmacksache“ noch trefflich streiten. Eindeutig ist das Urteil bei der Bewertung der erheblichen wirtschaftlichen und gesundheitlichen Schäden, die durch Pilze verursacht werden. Die direkten Vergiftungen mit irrtümlich als Speisepilz angesprochenen Giftpilzen sind dabei zwar im Einzelfall besonders drastisch, stellen für den Normalbürger jedoch kein wesentliches Problem dar. Wegen ihrer chemoorganoheterotrophen Lebensweise zerstören Pilze z. B. Textilien, Holz, Leder und Papier (Bücher, Tapeten), aber auch Farben, Lacke und Gummiprodukte. Anders als bei der Lebensmittelherstellung können Pilze auch zu deren Verderben führen. Besonders anfällig sind Getreide und Obst, die nach Befall vom Gemeinen Brotschimmel *Rhizopus nigricans* oder Gemeinen Köpfchenschimmel *Mucor mucedo* ungenießbar werden. Insbesondere auf Nüssen findet man *Aspergillus flavus*, der mit den Aflatoxinen die oral wirkstärksten Carcinogene bildet. Neben diesen indirekten, durch Stoffwechselprodukte vermittelten Gesundheitsschäden können Pilze beim Menschen auch direkt zu Erkrankungen führen. Dafür müssen die in Frage kommenden Spezies nicht einmal besonders aggressiv oder anpassungsfähig sein: „... without a hard-won accumulation of agents of immunity ... man is probably the best culture medium in existence. From scrotum to brain, almost any temperature suitable for pathogen or saprophyte is available. Substrate nutrients and variations in oxygen, carbon dioxide and pH are available in almost any needed combination ...“^[2].

1.2 System-Mykosen

Wegen der enormen Oberfläche und der intensiven Exposition mit potentiellen Pathogenen sind die Haut, der Magen-Darm-Trakt und die Lunge in Bezug auf die Immunantwort des menschlichen Körpers sehr wichtige Organe^[3]. Es ist daher nicht verwunderlich, daß Vorgänge auf diesen Oberflächen systemische Auswirkungen auf das Immunsystem haben können. Dabei ist eine unspezifische Immunreaktion auf Fremdkörper natürlich und notwendig für die Ausbildung eines leistungsfähigen Immunsystems.

Üblicherweise befinden sich auf der Haut und auf Schleimhäuten neben einer Vielzahl von Bakterien auch unterschiedliche Pilze, ohne daß von ihnen für den Menschen eine Gesundheitsgefahr ausgeht. *Candida sp.* sind zum Beispiel Teil der normalen unteren Darmflora gesunder Erwachsener^[4].

Andere Pilze können ein davon wesentlich zu unterscheidendes Gefährdungspotential aufweisen. Einige dieser pathogenen oder fakultativ pathogenen Pilze siedeln meist nur oberflächlich auf der Haut oder auf Schleimhäuten. Sie sind daher recht einfach zu erkennen und wirksam mit Salben, Cremes oder Zäpfchen zu behandeln. Andere können über die Atmungsorgane oder durch Wunden in das Blut gelangen. Disseminativ fortschreitende Infektionen können nahezu alle Organe betreffen und ernsthafte bleibende Schäden verursachen. In diesem Fall spricht man von tiefen Organmykosen oder systemischen Mykosen.

In der klinischen Praxis tritt *Candida albicans* besonders oft in Erscheinung^[5-8]. Durch *C. albicans* wird die einzige als ansteckend eingestufte systemische Mykose ausgelöst. Als Krankheitsursache wird darüberhinaus ein sehr breites Spektrum von Hefen, diamorphen und fadenförmigen Pilzen benannt, das weiterhin zunimmt^[9-20]. Unter anderem wird von Infektionen mit *Aspergillus*-^[21], *Mucor*- *Blastomyces*- und *Histoplasma*-, *Fusarium*, *Scedosporium* sowie *C. non-albicans* sp. berichtet^[22-28]. Eine von mehreren Instituten in den USA gleichzeitig durchgeführte Erhebung kam zu dem Ergebnis, daß Pilzerkrankungen schon häufiger sind als Erkrankungen aufgrund Gram-negativer Bakterien^[29]. In einem spektakulären Einzelfall ist von der Infektion

mit einer *Coprinus species*, einem *Basidiomyceten*, der als Tintling in Wäldern und Parks Mitteleuropas vorkommt, berichtet worden^[30].

Seit vierzig Jahren werden in wachsendem Maße ernste Infektionen mit *Candida albicans* festgestellt und Untersuchungen zu möglichen Ursachen veröffentlicht^[31]. Trotz großer Anstrengungen im diagnostischen und therapeutischen Bereich steigt die Anzahl lebensbedrohlicher Pilzinfektionen bei Personen mit geschwächter Immunreaktion und die Vielfalt der auslösenden Organismen weiter an^[32-36]. In der Fachliteratur wird häufig auch über Fälle systemischer Mykosen mit Todesfolge berichtet^[37].

Ausgangspunkt für eine Betrachtung dieser Entwicklung soll zunächst eine Beschäftigung mit ihren Gründen sein^[38,39].

Spätestens seit Beginn der 1980er Jahre ist das Human Immunodeficiency Virus (HIV) nicht nur in das Bewußtsein der Weltöffentlichkeit, sondern in besonderem Maße auch in den Fokus der Mykologen gelangt^[40], da AIDS-Patienten besonders empfindlich gegenüber Hirnhautentzündung und Sproßpilzen auf der Haut sind^[41-43]. In Europa und den USA ist die an erster Stelle stehende Todesursache dieser Personengruppe eine durch *Pneumocystis carinii* hervorgerufene Lungenentzündung^[44].

Chemotherapeutika haben ihrem pharmakologischen Prinzip nach einen besonders ausgeprägten Einfluß auf Zellen mit hoher Proliferationsrate. Dementsprechend negativ sind die Auswirkungen auf die Leukozytenzahlen der einer solchen Therapie unterworfenen Patienten, was z. B. im Zusammenhang mit Knochenmarktransplantationen gut dokumentiert ist^[45,46]. Nach intensiver Chemotherapie, individuell aber auch nach weniger aggressiven Zytostatikakombinationen kann sich weiterhin eine langanhaltende, gravierende Neutropenie einstellen^[47-50].

Durch Untersuchungen an obduzierten Personen in den Jahren 1976 bis 1979 sowie 1986 bis 1990 konnte ein Anstieg vorliegender tiefer Organmykosen von 10 % auf 16 % nachgewiesen werden^[51]. Bei einer entsprechenden Erhebung der Jahre 1978 bis 1982 sowie 1990 bis 1994 mußte mit den zugehörigen Werten von 2.2 % und 5.1 % sogar mehr als eine Verdoppelung registriert werden^[52]. Ist schon vormals eine sys-

temische Pilzinfektion aufgetreten, stellt eine nochmalige intensive Chemotherapie ein bedeutendes Risiko für das Wiederauftreten entsprechender Infektionen dar^[53,54].

Eine schon früh und immer noch häufig anzutreffende Erklärung für die wachsende Zahl lebensbedrohlicher Mykosen ist der vermehrte Einsatz immunsuppressiver Arzneimittel^[55]. Mit entsprechender Häufigkeit werden Pilzinfektionen bei der Obduktion von Patienten festgestellt, die nach einer allogenen Knochenmarktransplantation mit begleitender immunsuppressiver Behandlung verstarben^[56].

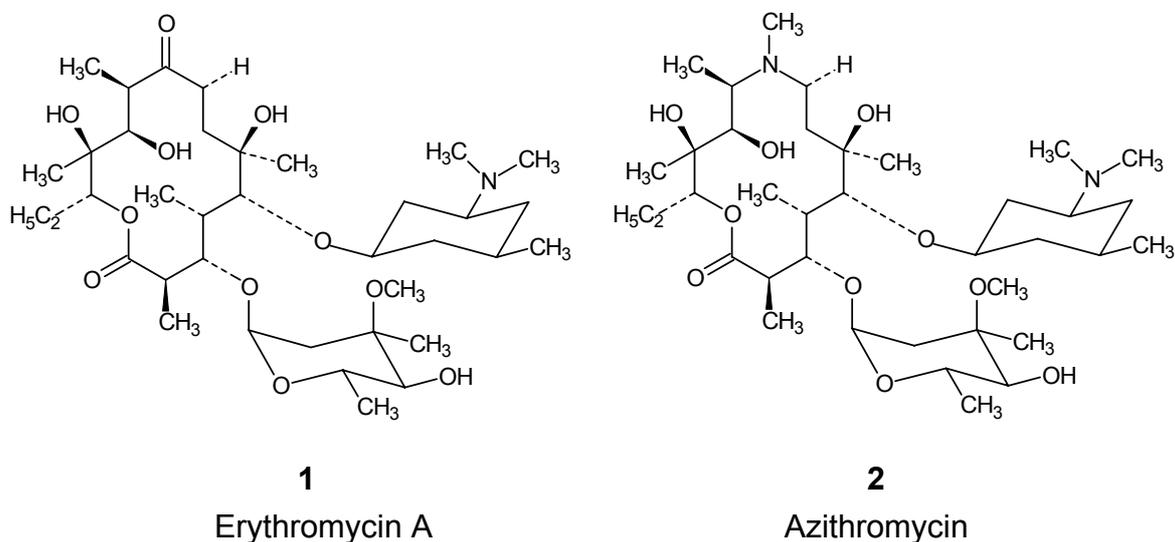
Eine Mykose kann lange bestehen, bevor sie ein klinisches Bild zeigt. Auch dann können die auftretenden Symptome sehr variabel sein^[57-60]. Bekannt für eine schleichende Entwicklung sind Mykosen der Atmungsorgane, die aber auch akut und außerordentlich heftig werden können^[61].

Eine ernste Gefahr geht in bestimmten Situationen von bereits bestehenden Mykosen aus, wenn sie unerkannt bleiben. Die Wahrscheinlichkeit eines Aspergilloserzidivs nach Knochenmarktransplantationen wird z. B. mit einem Drittel angegeben^[62]. Insgesamt werden Systemmykosen für 25 % der infektbedingten letalen Verläufe einer Leukämie verantwortlich gemacht^[63]. Nach Knochenmarktransplantationen werden Pilzinfektionen sogar für die Mehrheit der Todesfälle als ursächlich angegeben^[64].

Eine demoskopische Betrachtung eröffnet einen weiteren Erklärungsansatz für die beobachtete Entwicklung. Durch den größer werdenden Anteil älterer Menschen an der Gesamtbevölkerung steigt auch die Zahl der Personen, die intensivmedizinisch behandelt werden, Prothesen benötigen und ausgedehnte Glucocorticoid-Gaben^[65], parenterale Hyperalimentation^[66] oder anhaltende Therapien mit wechselnden Breitpektrumantibiotika^[67,68] erhalten.

Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen verbirgt sich hier immer auch ein Infektionsrisiko, zumal durch die Entwicklung neuartiger Beschichtungen, Grundmaterialien und chirurgischer Hilfsmittel immer öfter die Entscheidung zugunsten einer invasiven Vorgehensweise getroffen werden kann.

Im Rampenlicht der aktuellen Diskussion stehen die sogenannten Krankenhauskeime oder Problemkeime. Unter diesem Begriff werden unterschiedlichste multiresistente Bakterienstämme zusammengefaßt. Als Beispiel sei dazu erneut auf Lungenentzündungen hingewiesen, gegen deren Erreger *Streptococcus pneumoniae* nach einer US-amerikanischen Untersuchung schon 1995 in 11 % und 1999 sogar bei 20 % der erfaßten Fälle mit den Makrolid-Antibiotika Erythromycin (**1**) und Azithromycin (**2**) nicht mehr erfolgreich vorgegangen werden konnte^[69]. Dabei ist anzumerken, daß **2** ein ringsubstituiertes Azalid ist und wegen seiner ähnlichen Wirkung wie die im engeren Sinne als Macrolide bezeichneten Substanzen ebenfalls zu den Macrolidantibiotika gezählt wird^[70].



Multiresistente Keime können oft nur unter Schwierigkeiten und infolgedessen zeitverzögert behandelt werden und beanspruchen dadurch in hohem Maße das Immunsystem der Patienten. So führen sie, wenn auch indirekt, zur Anfälligkeit gegenüber Pilzinfektionen. Bei Pilzen selbst ist demgegenüber erst sehr selten von Resistenzen berichtet worden^[71-75].

Pilzinfektionen können jedoch nicht nur bei immunsupprimierten Personen auftreten. So ist z. B. *Candida albicans* ein bekanntes Allergen. Über 90 % aller gesunden Erwachsenen zeigen bei Hauttests Hypersensibilitätsreaktionen auf Antigen-Extrakte von *C. albicans*^[76]. Auf diese Weise wirkt *C. albicans* ausweislich verschiedener Fallstudien selber immunsupprimierend^[77-78].

Bei einer Patientin mit langjähriger chronischer Candidiasis der Schleimhäute wurde im Blutplasma ein Faktor nachgewiesen, der die normale Reaktion von Lymphozyten nicht nur gegen *Candida albicans* sondern auch gegen Mumps verhinderte. Die Autoren wiesen darauf hin, daß dieser Inhibitor-Faktor auf die *Candida*-Infektion zurückzuführen sei, da er sich nach der erfolgreichen *Candida*-Eradikation nicht mehr nachweisen ließ und die entsprechende lymphozyten-vermittelte Immunreaktion anhaltend wieder normale Werte erreichte. In weiteren Untersuchungen wurde Mannanen^[79-80], wasserlöslichen Polysacchariden aus Hefe-Zellmembranen, oder mannanhaltigen Glycoproteinen^[81-82] die Rolle dieses Inhibitor-Faktors zugewiesen.

Aus diesem Zustandsbild ergeben sich nicht nur für die Epidemiologie der jeweiligen Klinik Konsequenzen. Die hier gezeigte Situation nimmt insbesondere ganz wesentlich Einfluß auf die (Weiter-) Behandlung einer Grunderkrankung überlebender Patienten nach einer (vorherigen) Pilzinfektion.

1.3 Diagnostische Methoden

Weil die Diagnostik von Systemmykosen komplex ist, werden Pilzinfektionen häufig nicht sofort als solche erkannt^[83-86]. Erste Symptome, wie die Abnahme der Leukozytenzahl und Fieber, sind uncharakteristisch. So kann es zur - hier unwirksamen - Gabe von Breitspektrumantibiotika kommen^[87-89]. Da Pilze wie die menschlichen Zellen Eukarionten sind und dementsprechend einen abgeschlossenen Zellkern, Zellorganellen, endoplasmatisches Retikulum und ein Cytoskelett aufweisen, ist die Diagnose ohne einen Anfangsverdacht zusätzlich erschwert. Daher wird eine gesicherte Diagnose oft erst *post mortem* gestellt. Für eine exakte Diagnose einer Systemmykose ist der Nachweis durch die Sicherung einer Reinkultur aus normalerweise sterilen Körperflüssigkeiten bzw. Gewebebiopsien oder aus Sekreten des Respirationstraktes unumgänglich^[90]. Um dieser Forderung zu genügen, muß allerdings in der überwiegenden Mehrzahl ein fortgeschrittenes Stadium der Pilzinfektion vorliegen. Im Frühstadium, insbesondere wenn der Patient immunsupprimiert ist und / oder bereits präventiv antimykotisch therapiert wird, ist dieser Befund kaum zu erbringen. Nachdem die frühe empirische antimykotische Therapie etabliert werden konnte, stellt die Diagnostik von Pilzinfektionen keine notwendige Bedingung für den Beginn einer Be-

handlung dar, sondern bietet Hilfestellungen bei der Festsetzung von Art und Dauer der Therapie an und gibt Entscheidungshilfen bei einer im Rahmen anderer Maßnahmen möglicherweise später notwendigen Prophylaxe. Für die Auswahl des wirksamsten Mittels oder der besten Kombination mehrerer Medikamente ist eine genaue Diagnose aber unerlässlich. Weiterhin ist sie aber auch Grundlage für die mittlerweile bereitwilliger aufgenommenen chirurgischen Sanierungen. Die möglichst rasch zu stellende exakte Diagnose stützt sich auf mehrere Verfahren und Vorgehensweisen.

1.3.1 Klinisches Bild

Aus dem klinischen Bild allein läßt sich keine sichere Diagnose ableiten. Eine zu spät oder gar nicht als solche behandelte systemische Pilzinfektion kann jedoch zu erheblichen Langzeitfolgen führen, falls der Patient die Erkrankung überhaupt überleben sollte. Die betroffenen Organe, z. B. Herz, Lunge und Leber und sogar die Augen können bleibend geschädigt werden.

1.3.2 Kulturelle Verfahren

Zur Sicherung von Pilzkulturen können respiratorische Sekrete, Proben aus dem Gastrointestinaltrakt oder aus dem Urogenitaltrakt herangezogen werden. Biopsiematerialien und Proben primär steriler Körperflüssigkeiten wie Blut oder Liquor liefern die zuverlässigsten Ergebnisse. Vorwiegend sind Hefepilze erfaßbar, Schimmelpilze sind kaum nachweisbar^[91,92]. Moderne Blutkultursysteme erreichen bei Hefepilzen eine maximale Detektionsrate von 60 % innerhalb von 5 Tagen^[93,94].

1.3.3 Serologische Verfahren

Seit geraumer Zeit wird im Zusammenhang mit *Candida sp.* und *Aspergillus sp.* auch über Antigen- und Antikörperbestimmungen berichtet^[95-97]. Trotz manch positiver Beurteilung konnten einige Unstimmigkeiten und prinzipielle Schwierigkeiten nicht ganz ausgeräumt werden. Die Sensitivitäten dieser Tests wird sehr unterschiedlich mit 20% - 80 % angegeben^[98].

Gerade bei einer der Hochrisikogruppen, den immunsupprimierten Patienten, können Antikörpertests später oder schwächer als gewöhnlich reagieren. Das erhaltene Ergebnis läßt sich daher nur erschwert interpretieren^[99].

Im Unterschied dazu ist der Effekt des Immunstatus auf die Ergebnisse von Antigen-Tests weniger stark. Die Parameter Spezifität (88 % - 100 %) und Sensitivität (26 % - 77 %) sind allerdings nicht voll befriedigend^[100,101]. Kombinierte Antigen- und Antikörpertests könnten deutlich bessere Werte erzielen^[102-106]. Ein weiterer serologischer Test detektiert 1,3-β-D-Glukane^[107], die generelle Zellwandbestandteile von Pilzen, nicht aber von Bakterien sind. Die Ergebnisse dieses und der vorher genannten Tests können aber starke Streuungen aufweisen^[108].

1.3.4 Endoskopie

Die Lunge ist das am häufigsten im Zuge von Systemmykosen infiltrierte Organ. Der Möglichkeit, direkt aus der Lunge des Patienten Proben zur Sicherung der Erreger entnehmen zu können, sind jedoch Grenzen gesetzt. In erster Linie muß auf den Zustand des Patienten geachtet werden. Weiterhin muß die notwendige technische Ausstattung bereitgehalten werden. Zum dritten ist immer auch eine Risiko / Nutzen-Abwägung durchzuführen, zumal die Sensitivität sehr verschieden beurteilt wird, insgesamt aber bei 50 % liegt^[109-112].

1.3.5 Biopsie

Die direkte Entnahme von Gewebe der infiltrierten Organe zur histologischen und kulturellen Bearbeitung, z. B. der Leber oder der Lunge, ist insbesondere dann wichtig, wenn eine intensive Chemotherapie oder eine Knochenmarktransplantation geplant ist, die durch eine chirurgische Herdsanierung vorbereitet werden soll. Maximale diagnostische Werte von 50 % - 80 % werden dabei durch Biopsien der Lunge erreicht^[113-116].

1.3.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Detektion pilzspezifischer DNA über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist bislang aufgrund zu geringer Sensitivität und Spezifität, aber auch wegen einer zu kleinen Zahl erfaßbarer Erreger nicht für den klinischen Routineeinsatz geeignet. Mittlerweile konnten modifizierte PCR-Methoden entwickelt werden^[117], mit Hilfe derer *Aspergillus*-DNA aus Blut und bronchoalveolären Lavagen (BAL) mit Sensitivitäten von 91.6 % bzw. 100 % und Spezifitäten von 81.4 % bzw. 93.2 %^[118,119] nachgewiesen werden konnte. Ein diagnostisches Routinewerkzeug können PCR-vermittelte Screeningverfahren aber erst dann sein, wenn zum einen die DNA-Extraktions- und Amplifikationsverfahren vereinfacht werden und weiterhin geeignete Standards eingeführt werden, so daß reproduzierbare und übertragbare Ergebnisse erhalten werden können.

1.3.7 Bildgebende Verfahren

Bislang gehört eine Röntgenaufnahme des Thorax zu den ersten Untersuchungen, die bei Verdachtsmomenten auf eine Systemmykose vorgenommen werden. Obwohl die Lunge Hauptinfektionsherd ist, zeigt sie sich in der Frühphase einer *Aspergillus*-Pneumonie im Röntgenbild nicht selten unauffällig^[120,121]. Die schon bald gebildeten typischen Infiltrationsmuster können jedoch mit der Dünnschicht-Computertomographie (Hochauflösende CT, HRCT) sichtbar gemacht werden^[122-124].

Bei durch *Candida sp.* ausgelösten Systemmykosen werden mehrheitlich auch die Leber und die Milz infiltriert^[125]. Eine sonographische Untersuchung gilt als einfach und zuverlässig. Weil auch erfahrene Diagnostiker dennoch zu falsch negativen Ergebnissen kommen können, wird die zusätzliche Verwendung eines Kontrastmittels empfohlen^[126]. Gerade Milz, Leber und Niere können gut computertomographisch oder durch Magnetresonanztomographie (MRT) untersucht werden^[127,128], wobei diese beiden Verfahren aber nicht bei allen Organen erfolgreich eingesetzt werden können^[129].

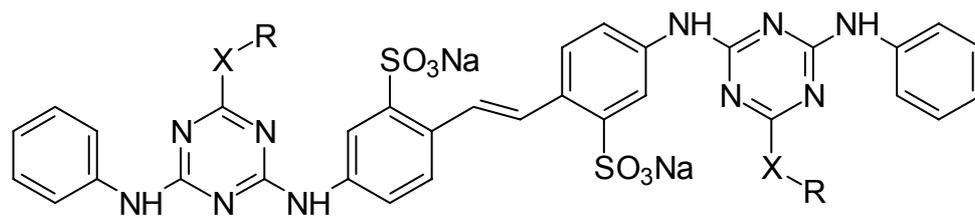
1.3.8 Färbung und Mikroskopie

Das Mikroskop ist nach wie vor unentbehrlich für die Untersuchung und Befundung von mykologischem Probenmaterial. Nach Gram-Färbung (bei erfahrenen Diagnostikern sogar unbehandelt) kann die Mikroskopie entsprechender Präparate die Diagnose wesentlich voranbringen. Oft sind andere Doppel-Färbemethoden zu verwenden, wobei die Hämatoxylin-Eosin-Färbung auch zu Fehlinterpretationen führen kann. In anderen Fällen werden spezielle Färbemethoden verwendet. Dazu zählen das Perjodsäure-Schiff-Reagenz (PAS) oder die Versilberung nach Grocott, die insbesondere bei nekrotischem Material Anwendungen findet. Diese üblichen Färbemethoden gelten jedoch zum Teil als schwierig und langwierig oder liefern wegen unspezifischer Färbungen ungenaue Aussagen^[130,131]. Die Unterscheidung zwischen schlanken Pseudohyphen, Hefeformen und Fadenpilzen ist jedoch in der Regel problemlos. Genaue morphologische Unterscheidungsmerkmale sind aber nur im Idealfall anzutreffen. Besonders wenn nur wenige Hyphenfragmente vorliegen, ist eine Unterscheidung kaum möglich^[132].

Auf dieser Grundlage stellt die Fluoreszenzmikroskopie von Pilzen nach Behandlung mit optischen Aufhellern eine wichtige Ergänzung dar, die durch die Verwendung dieser Farbstoffe in stark alkalischen Lösungen eine wesentliche Weiterentwicklung erfahren hat^[133,134].

Rüchel und Margraf^[135] konnten ein Verfahren entwickeln, das zur Schnelldiagnose von Pilzen und deren Hyphen aus Biopsien und respiratorischen Sekreten eingesetzt werden kann und sicher zwischen körpereigenen Zellen und Pilzzellen unterscheiden kann.

Dazu werden Gewebeproben mit einer 0.1proz. Lösung von optischen Aufhellern aus der Reihe der 6-substituierten 4,4'-Bis-[*p*-phenylamino-1,3,5-triazin-2-yl]-4,4'-diaminostilben-2,2'-disulfonsäuren **3b** in 20proz. wässriger Natronlauge behandelt. Diese Verbindungen waren vorher insbesondere durch ihre Verwendung in der textil- und papierverarbeitenden Industrie bekannt.



3a X = Cl

3b X = NH, O, S; R = Alkyl, ω -Hydroxyalkyl, ω -Aminoalkyl

3c X = NH R = Alky-COOH, Aryl-COOH

Die spezifische Bindungsfähigkeit^[136] der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe an die vorhandenen Erreger bleibt bei dieser Behandlung bestehen und ermöglicht binnen weniger Minuten die sichere Detektion mit Hilfe eines Mikroskops und eines UV-Strahlers durch intensive blaue Fluoreszenz^[137].

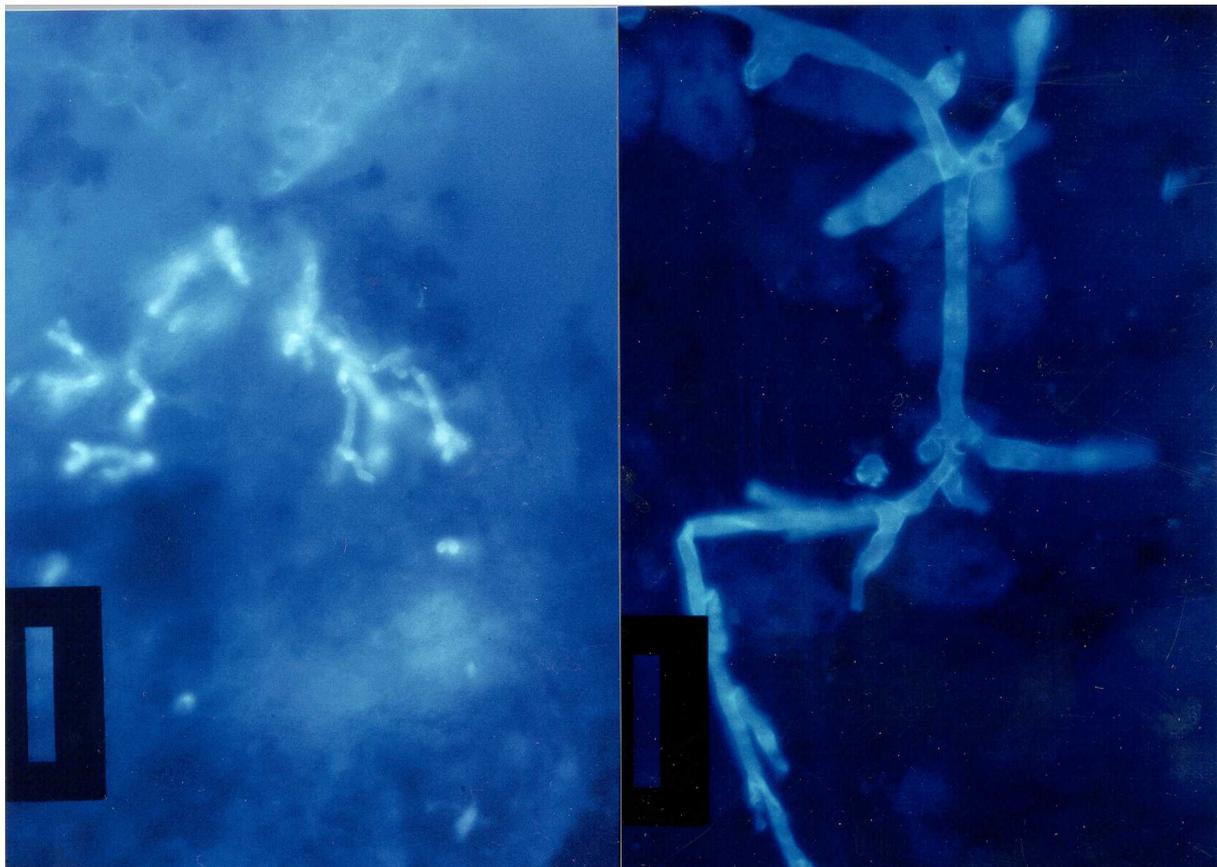


Abb. 1 Links: Mucor Mykose in der Leber einer Maus, gefärbt mit Blankophor i. V. Vergrößerung 40fach Rechts: Mit Blankophor vital gefärbte Lungenaspergillose einer Maus, Vergrößerung 300fach Zeiss Epifluoreszenzmikroskop; Film: Ektachrom 400 ASA; Filter Kit #2 Carl Zeiss Excitation: 365-395, Emmision über 420 nm (Barrierefilter)¹³⁸.

Ein Beispiel kann die Vorteile dieser Methode verdeutlichen. In einer Vergleichsstudie wurden insgesamt 533 mykoseverdächtige Proben untersucht^[139]. Der Befund wurde über die Bewertung des klinischen Bildes, mit radiologischen und kulturellen Verfahren sowie teilweise durch Biopsie oder Autopsie erhoben. In 17 Proben von 13 Patienten wurde eine invasive pulmonare Aspergillose (IPA) diagnostiziert.

Dieses Ergebnis wurde der Färbung mit Blankophor-P-flüssig gegenübergestellt. Sie zeigte eine Sensitivität von 88 % und eine Spezifität von 99 %. Bei gleicher Spezifität erreichten die kulturellen Methoden nur eine Sensitivität von 76 % und benötigen zusätzlich erheblich mehr Zeit. Die Färbung und anschließende fluoreszenzmikroskopische Auswertung benötigte im Mittel nur 9 ± 3 Minuten.

Die Methode nutzt einen wesentlichen Unterschied der Zellwände von Pilzen und menschlichen Zellen aus. Die Zellwände von Pilzen bestehen zum großen Teil aus β -glykosidisch verknüpften Polysacchariden wie β -Glukan und Chitin. Diese Substanzen sind in menschlichen Zellen nicht zu finden. Werden andere, sonst unspezifisch anfärbbare Bestandteile der Pilzzellen enzymatisch oder durch Maceration in stark alkalischen Lösungen chemisch gelöst, bleibt das leere Zellgerüst zurück. Ihre makroskopische Form behalten diese aus Chitin bestehenden Strukturen während des gesamten Vorganges bei. Das frei vorliegende Chitin kann nun selektiv und mit einer so hohen Empfindlichkeit angefärbt werden, daß die Fluoreszenz des an die Pilzelemente gebundenen Farbstoffes unter UV-Licht vor einem dunklen Hintergrund meist schon mit bloßem Auge sichtbar ist.

1.4 Optische Aufheller / Weißtöner

Liegen Fasern aus Cellulose oder Naturbaumwolle im Sonnenlicht, reflektieren sie den größten Teil der Strahlung. Der Stoff erscheint weiß. Dabei gibt es jedoch kein "absolutes Weiß", weil ein kleiner Teil des Lichtes absorbiert wird. Ein geringer Anteil des absorbierten Lichtes wird als Licht anderer Wellenlänge, gegebenenfalls als Wärmestrahlung, emittiert. Das gesamte abgestrahlte Spektrum wird als Remission bezeichnet. Die Zusammensetzung dieses Spektrums bestimmt den Farbeindruck, den ein Betrachter von einem beobachteten Gegenstand hat. So ist die Remission

eines ideal schwarzen Körpers 0 %. Von der Oberfläche geht kein sichtbares Licht aus. Eine vom Menschen als weiß wahrgenommene Fläche remittiert recht gleichmäßig über den Bereich von 380-800 nm etwa 80 % des eingestrahnten Spektrums.

Das menschliche Auge vermittelt aber keinen objektiven Farbeindruck. So ist der Weißindruck, den ein Europäer von einer weißen Oberfläche wahrnimmt, stärker ausgeprägt, wenn im remittierten Licht etwas mehr bläuliche Anteile enthalten sind. Ein Spektrometer analysiert eine vom europäischen Betrachter als "rein weiß" beschriebene Fläche eher als weißbläulich. Nordamerikaner sehen dagegen ein gelbliches Weiß als "rein weiß" an. Der Grund dafür ist ein interessanter Aspekt der Technik- und Kulturgeschichte der USA. Die dort verkauften Waschmaschinen verfügen üblicherweise nicht über eigene Heizelemente. Möchte man dennoch warm waschen, muß schon am Anfang warmes Wasser eingefüllt werden. Im Ergebnis wird kalt gewaschen. Da Enzyme bei diesen Temperaturen oftmals keine ausreichend hohe Aktivität entfalten, werden Bleichmittel verwendet. Trotzdem nehmen die Wäschestücke vergleichsweise schnell einen leicht gelblichen Farbton an, der aber mittlerweile als „rein weiß“ akzeptiert wird. Ein durchschnittlicher Mitteleuropäer sieht daher ein hygienisch genauso einwandfrei sauberes, aber gelblich-weißes Textil als noch unsauber an, während es ein Nordamerikaner als einwandfrei "rein weiß" betrachtet.

Natürliches Sonnenlicht enthält zu 3-5 % für den Menschen nicht sichtbares ultraviolettes Licht mit Wellenlängen von 290-400 nm. Diese energiereiche Strahlung kann von geeigneten Molekülen absorbiert werden. Fluoreszenz tritt dann auf, wenn dabei wie in Abb. 2 gezeigt^[140], Elektronen aus dessen π -Elektronensystem kurzfristig aus dem Grundzustand (S_0) in einen energiereicheren angeregten Zustand (S_1) übergeführt werden. Die Rückkehr in den Grundzustand erfolgt dann in zwei voneinander unabhängigen Schritten. Im ersten Schritt geht das Elektron strahlungslos aus S_1 unter Abgabe von Schwingungsenergie in einen energieärmeren angeregten Zustand über. Im zweiten Schritt kehrt das Elektron unter Abgabe elektromagnetischer Strahlung in den Grundzustand zurück. Dabei ist die Energie des emittierten Quants um den Betrag der zuvor abgegebenen Schwingungsenergie kleiner als die ur-

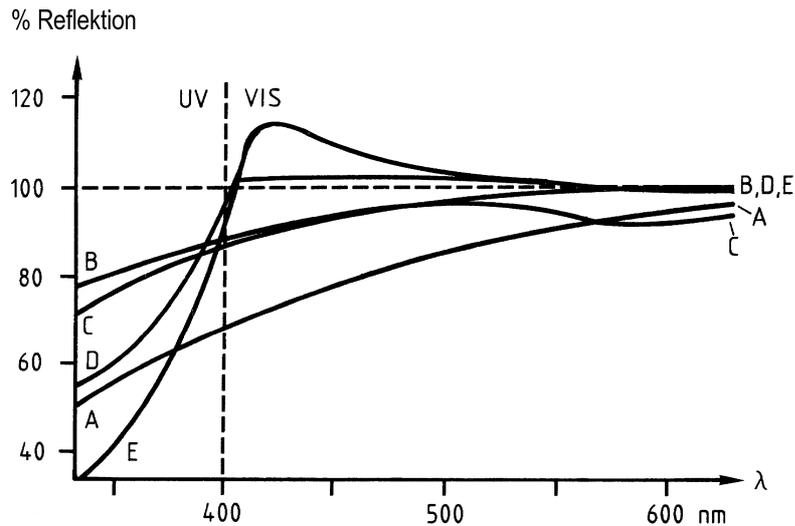
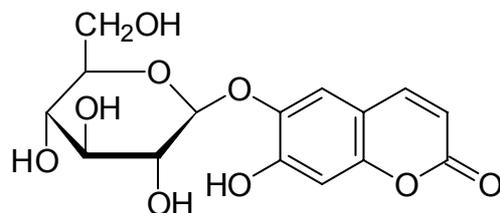


Abb. 3: Absorption und Reflektion von Baumwolle im Bereich von 350-600 nm. A: Unbehandelt; B: Chemisch gebleicht; C: Chemisch gebleicht und mit blauem Farbstoff behandelt; D: Chemisch gebleicht und mit geringen Mengen optischem Aufheller behandelt; E: wie D, aber mit höherer Konzentration an Aufheller.

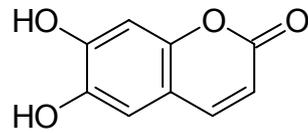
Da Aufheller selbst hellgelbe Farbstoffe sind, werden sie bei zu hoher Dosierung sichtbar und beeinträchtigen den Weißeindruck. Hinter Fensterglas, das UV-Strahlung absorbiert oder im künstlichen Licht von Glühlampen, die kaum UV-Strahlung emittieren, wird der gewünschte Effekt nicht erreicht.

Bereits 1929 wurde Aesculin (**4**) als optischer Aufheller verwendet. Dieses Cumarinderivat kann aus der Rinde und den Blättern der gemeinen Roßkastanie *Aesculus hippocastanum* gewonnen werden. Kraus hatte beobachtet, daß mit **4** behandelte Textilien weißer erschienen als sonst. Bei dauerhafter intensiver Sonneneinstrahlung läßt dieser Effekt jedoch rasch nach.



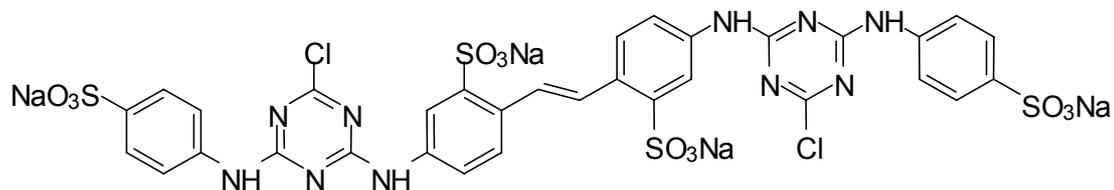
4

Aesculin ergibt bei Hydrolyse Glucose und 6,7-Dihydroxycumarin (**5**). Eine Textilausrüstung mit **4** ist daher weder lichtecht noch besonders waschecht.

**5**

Die Aufheller müssen sich möglichst dauerhaft mit der Faser verbinden. Da verschiedene Fasertypen wie Baumwolle, Wolle, Seide, Acetate, Polyamide oder Polyester unterschiedliche Aufheller benötigen, sind in Vollwaschmitteln meist mehrere verschiedene Aufheller enthalten^[142].

Seit über fünfunddreißig Jahren werden Stilbenderivate, die sich von **3a** oder den entsprechenden Tetrasulfonaten (**6**) ableiten, als optische Aufheller verwendet und sind zu etwa 0.1 - 0.3 % in Waschmitteln enthalten^[143].

**6**

Sie zeigen eine starke, sehr selektive Affinität zu β -glykosidisch verknüpften Polysacchariden. Die Verwendung in Waschmitteln beruht auf einer solchen Interaktion mit Cellulose, die in ähnlicher Weise auch bei Chitin auftritt.

2. Aufgabenstellung

Mit Cellulose und Chitin sind gleichzeitig die beiden wesentlichen strukturgebenden Substanzen von Pilzzellen benannt. Diese Biopolymeren sind am Aufbau menschlicher Zellen nicht beteiligt. Optische Aufheller aus der Reihe der Diaminostilbensulfonsäuren wurden gelegentlich in den Verdacht gestellt, beim Menschen allergen, toxisch, irritativ, kanzerogen, mutagen oder anderweitig gesundheitsschädlich wirken zu können^[144]. Umfangreiche Untersuchungen, die zum Teil mit einer 100fach über der üblichen liegenden Konzentration durchgeführt wurden, machen diese Verdachtsmomente heute gegenstandslos^[145]. So liegt bei Ratten der LD₅₀-Wert für das interperitoneal injizierte Bis-Ethoxyderivat von **3b** bei 1.09 g/kg^[146]. Gegenüber Pilzen selbst wirken diese Weißtöner jedoch nur in Einzelfällen wachstumsverzögernd. Mittlerweile sind einiger Vertreter dieser Substanzklasse in den USA für die Behandlung von Verpackungen zugelassen, die direkt mit Lebensmitteln in Kontakt geraten. Diese Aussage ist insoweit bemerkenswert, als daß die dortige Gesundheitsbehörde oftmals sehr viel restriktiver entsprechende Zulassungen vergibt als es in der EU der Fall sein kann. Durch die sehr guten humantoxikologischen Eigenschaften bieten sich verschiedene, von **3a** oder **6** abgeleitete Aufheller daher für eine Vitalfärbung von Pilzhyphen in oder auf menschlichen Geweben an. Zur Abklärung einer möglichen Mykose im Bereich von Fuß- und Fingernägeln wird von dieser Methode bereits Gebrauch gemacht.

Die Aufheller könnten auch als Transporter dienen, mit denen verschiedene Wirksubstanzen zu chitin- und cellulosehaltigen Substraten gebracht und dort fixiert werden. Daraus ergeben sich verschiedene Anwendungsmöglichkeiten:

- Konjugate aus optischen Aufhellern mit im Bereich der Pilzzellmembran wirksamen Antimykotika könnten die bekannten Nebenwirkungen dieser Substanzen, die trotz der Verwendung von Makrolid- Lipidformulierungen nicht gelöst sind, verringern oder überwinden. Da durch direkte Anlagerung am Erreger nicht mehr die Konzentration des Wirkstoffes im Blutplasma (Plasmaspiegel) wesentliches Kriterium für eine Wirksamkeit ist, könnten solche Konjugate zusätzlich über eine drastische Reduzierung der erforderlichen Dosis die oftmals erheblichen Nebenwirkungen vermeiden.

- Die Kopplung mit Substanzen, die in der Röntgenographie einschließlich Hochauflösende Computertomographie (HRCT) oder bei der Magnetresonanztomographie (MRT) erkennbar sind, könnten den Nutzen dieser Methoden bei der frühen Diagnose systemischer Mykosen deutlich erhöhen.
- Besonders Interessant ist das Idee, ein selektiv an β -Glykoside bindendes Substrat mit Radionukliden zu markieren. Falls derartige Konjugate weiterhin eine selektive Bindung an Pilzbestandteile zeigen, könnten sie den Ausgangspunkt der auch außerhalb des Körpers meßbare Strahlung auf die Pilzstrukturen konzentrieren und so einen Infektionsherd genau lokalisierbar machen. Die potentiellen Anwendungen eines solchen Konzeptes sind vielfältig. Als Diagnostikum eingesetzt könnten systemische Mykosen schon im Frühstadium erkannt werden. Zur Planung chirurgischer Herdsanierungen, besonders bei Aspergillosen, könnten sie eine wertvolles Hilfsmittel sein. Sind harte Strahler Bestandteil solcher Konjugate, könnte sogar eine unmittelbare Therapie ermöglicht werden.
- Diaminostilben-Wirkstoff-Konjugate könnten darüber hinaus als Insektizide im Pflanzenschutz oder gegen Parasiten bei Menschen und Tieren Verwendung finden, da auch das Exoskelett von Insekten aus Chitin besteht. Bekannt ist zum Beispiel, daß bestimmte Insektenlarven in ihrer Entwicklung behindert werden, wenn sie mit Aufhellern des besprochenen Typs behandelt werden. Ähnliche Effekte könnten bei parasitär in Menschen oder Tieren lebenden Insekten beobachtbar sein. Insektizide, z. B. Hemmstoffe der Chitin-Biosynthese, die an entsprechende Enterhaken-Moleküle gekoppelt sind, könnten in Ihrer Wirkung verstärkt werden und gleichzeitig gezielter einsetzbar sein.

Aus den in der Einleitung angeführten Berichte und Beobachtungen geht die Notwendigkeit hervor, schnelle und präzise Diagnose- und Therapiemöglichkeiten für systemische Mykosen zu entwickeln. Die angedeuteten Projekte erfordern umfangreiche interdisziplinäre Grundlagenforschungen. Untersuchungsfelder in der Chemie sind zum Beispiel die Möglichkeiten, Wirk- und Farbstoffkomponente kovalent durch Spacer zu Konjugaten zu verbinden, die Eigenschaften und Variationsmöglichkeiten chemisch reaktiver Zentren der Edukte sowie Syntheseverfahren modifizierter Teilsysteme. Viele andere interessante Fragestellungen sind darüberhinaus in den Fachbereichen Medizin und Biologie zu finden. Als Beispiele seien Untersuchungen

zur Bioverteilung, zur Wirksamkeit und zu möglichen unerwünschten Wechselwirkungen im Stoffwechsel von Menschen und Tieren genannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde damit begonnen, die gedanklichen Konzepte in Form von Strukturen und Substanzen faßbar zu machen und in Anwendungsbeispielen umzusetzen.

3. Planung und Durchführung

3.1 Einführung und Vorüberlegungen

Allgemeines Ziel ist die Herstellung und Untersuchung von Konjugaten, in denen optische Aufheller kovalent mit Wirkstoffmolekülen verbunden sind. Diese Verbindung kann entweder direkt oder über geeignete Bindeglieder, sogenannte Spacer oder Linker erfolgen. Anschaulich beschrieben rüstet man auf diese Weise die Wirkstoffe mit einem Enterhaken aus, durch den sie sich in die unmittelbare Nähe ihres Wirkortes begeben können. Im Rahmen dieses Konzeptes werden alle in der Aufgabenstellung angedeuteten Möglichkeiten ganz wesentlich von den Eigenschaften der verwendeten optischen Aufheller beeinflusst. Einige Aspekte dieser Substanzen sollen daher etwas genauer betrachtet werden.

Seit ungefähr vier Jahrzehnten werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe des Diaminostilbentyps für die Färbung von Pilzzellen empfohlen^[147-148]. Jedoch wurde mit Calcofluor white[®] erstmals 1984 ein derartiger Farbstoff innerhalb der *in vitro* Diagnose von Mykosen benutzt^[149-150]. Ein weiterer Aufheller, der für diagnostische Zwecke der Mykologie vorgeschlagen wurde, ist Blankophor[®], Phorwhite[®] BBU, das Tetranatriumsalz des Bis-Diethanolaminoderivat von **3b**^[151]. Diese und ähnliche Substanzen wurden daraufhin erfolgreich für verschiedene diagnostische Aufgabenstellungen verwendet^[152]. Wie auch andere Diaminostilbene zeigen sie eine starke Affinität ausschließlich für β -1,3- und β -1,4-glykosidisch verbundene Polysaccharide wie Chitin, Chitosan, β -Glukane und Cellulose^[153]. Die bei weitem stärkste Affinität zeigen die Farbstoffe dabei zu Chitin und Cellulose^[154-156].

Chitin ist polymeres, β -(1,4)-glykosidisch verknüpftes N-Acetylglukosamin. Es kommt in allen Entwicklungsstufen sämtlicher Pilze vor. Selbst in einigen Spezies, die lange als Ausnahme galten, wurde Chitin inzwischen in geringen Mengen gefunden^[157]. Es ist üblicherweise Hauptbestandteil der Sporenwände. Die äußere Form der Pilze wird durch Mikrofibrillen aus diesem Biopolymer bestimmt. Einige Zellbestandteile wie α -(1,3)-, β -(1,3)- und β -(1,6)-Glukane sind in Wasser oder wäßrigen Alkalien löslich und

werden nur durch Komplexierung mit Metallionen in einer unlöslichen Form gehalten^[158]. Für die Bildung von Chitin in den Pilzzellen sind unterschiedliche Chitinsynthasen zuständig^[159], die in die Plasmamembran eingelagert sind und dort die Verknüpfung von Uridin-diphospho-N-acetylglucosamin (UDP) katalysieren^[160].

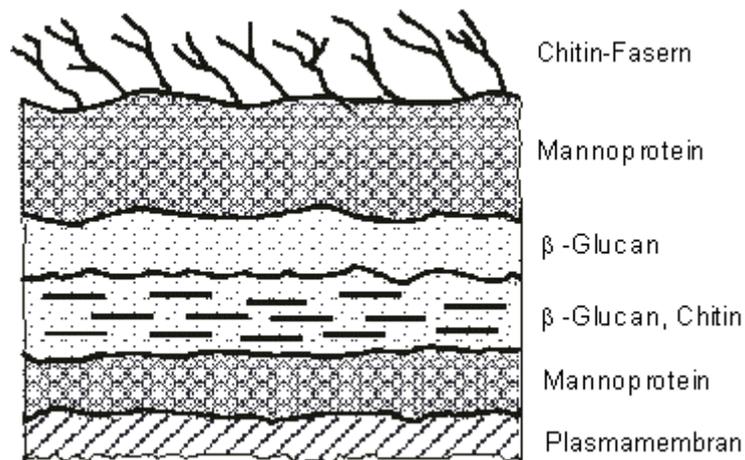
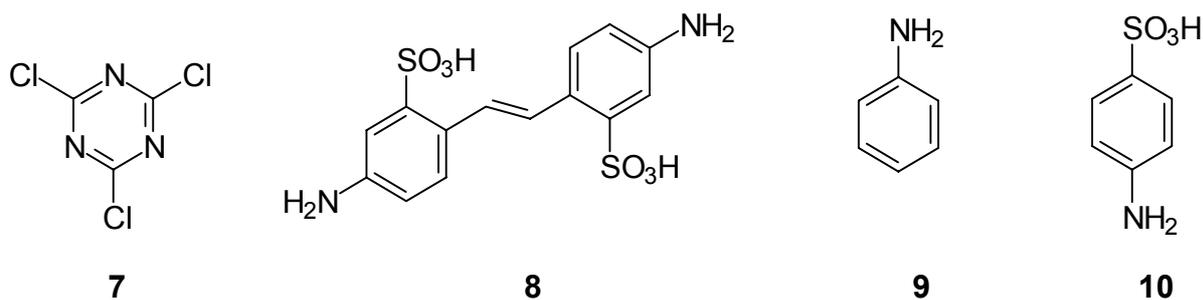


Abb. 4: Schema einer *Candida albicans*-Zellwand.

Die Diaminostilbenderivate binden vorzugsweise an Chitinmoleküle, die gerade verlängert werden. Dadurch wird die Ablösung von den Chitinsynthasen behindert. Bei *Acetobacter xylinum* kann deshalb keine Cokristallisation mit Glukanen zu strukturgebenden Mikrofibrillen mehr stattfinden^[161,162]. Das von **3b** abgeleitete Bis- β -Hydroxyethylderivat allein besitzt hier schon eine fungistatische Wirkung^[163]. Die guten humantoxikologischen Eigenschaften und die ausreichende Wasserlöslichkeit lassen sie für eine intravenöse Anwendung geeignet erscheinen. Die erwähnten optischen Aufheller sind also geeignete Carrier, um verschiedenste Wirkstoffe direkt an den Ort der höchsten Erregerdichte zu bringen.

Wesentliche Strukturelemente der in den vorausgegangenen Kapiteln beschriebenen und in der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Farbstoffe sind das 2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin (**7**), die 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (Flavonsäure, **8**) sowie Anilin (**9**) und 4-Aminobenzolsulfonsäure (Sulfanilsäure, **10**).



Vom Standpunkt der Synthese betrachtet, liegt diesen Farbstoffen das 2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin (**7**) zugrunde, das schon im letzten Jahrhundert wissenschaftlich bearbeitet wurde. Die Fluoreszenz sowie die nichtkovalente Bindung an Cellulose und Chitin werden wesentlich vom Flavonsäureteil derartiger Moleküle bestimmt. Wegen ihrer einzigartigen Eigenschaften sind diese Farbstoffe derzeit wieder verstärkt Gegenstand von Veröffentlichungen^[164-167].

Um diese speziellen Eigenschaften auch wirksam werden zu lassen, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein: Ähnlich wie Iod, das für seine bekannte Einlagerung in Stärke die α -(1,4)-D-Glukan-Helix benötigt, erfordern die Stilbene β -(1,4)- oder β -(1,3)-D-Glukan-Helices. Die Anlagerung wird durch van der Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt^[168].

Allgemein ist zu erkennen, daß die zur Färbung von Pilzmaterial oder anderen Chitinproben verwendeten stark alkalischen Farbstofflösungen selber kaum fluoreszieren. Nachdem eine Bindung stattgefunden hat, sind jedoch mit bloßem Auge, vorteilhaft auch durch geeignete Filter, intensive Fluoreszenzen zu sehen. Die Fluoreszenzintensitäten verschiedenartig substituierter Diaminostilbenderivate unterschieden sich dabei um Größenordnungen voneinander^[169].

Der Grund für die geringe Fluoreszenz der Lösung sind starke Solvens / Solvat-Interaktionen, die die Konformation der Farbstoffe beeinflussen. Wenn die aromatischen Teilsysteme nicht koplanar sind, wird keine Fluoreszenz beobachtet. Diese Koplanarität ist am ehesten bei der E-Konfiguration des Stilbens zu erreichen. Auch die Bindung an die Polysaccharide wird durch die stabförmige E-Konfiguration begünstigt, während sie bei der V-förmigen Z-Konfiguration nicht beobachtet wird. In dieser Situation nähern sich die beiden aromatischen Teilsysteme des Stilbens so

stark aneinander an, daß sie aufgrund sterischer Wechselwirkungen ihre Koplanarität aufgeben. Energiereiche UV-Strahlung vermag eine Konfigurationsumkehr der Stilben-Doppelbindung der Farbstoffe herbeizuführen. Ähnliche Prozesse kann man auch bei Azobenzolen und Azomethinen (Schiff'schen Basen) beobachten^[170, 171]. Dabei hängt der Verlauf der Reaktion davon ab, von welchem Punkt der Reaktionskoordinate des durch die Bestrahlung erreichten angeregten Zustandes der Übergang zurück in den Grundzustand erfolgt. Bei Stilbenen erfolgt dieser Übergang typischerweise an einem Punkt der Reaktionskoordinate, der zum Übergangszustand führt und somit zwischen Edukt und Produkt liegt^[172]. Derartige photochemische Reaktionen werden (zur Unterscheidung von den hier nicht näher erläuterten "hot ground state"- und adiabatischen Photoreaktionen) diabatisch genannt. Die Übergangspunkte diabatischer Photoreaktionen sind durch geringe Energiedifferenzen zwischen beiden Potentialkurven des Systems gekennzeichnet. Liegt das Minimum von S_1 dem Maximum von S_0 direkt gegenüber, führt der S_1 - S_0 -Übergang an dieser Stelle gleich wahrscheinlich zur Rückbildung des Eduktes oder zum Produkt (Abb. 5a).

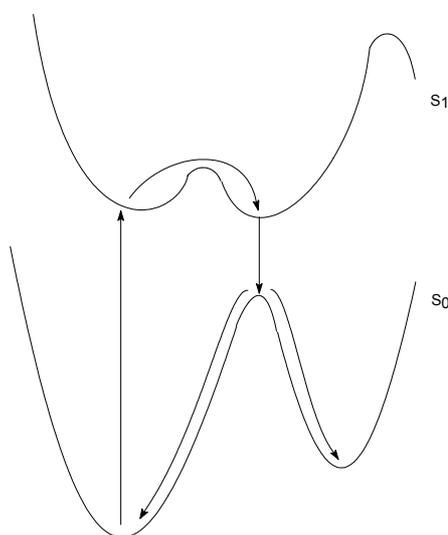


Abb. 5a

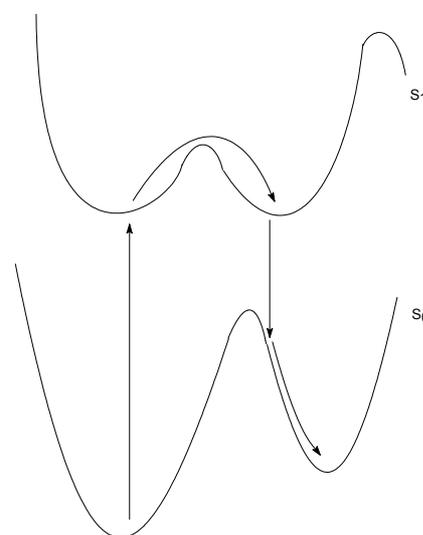
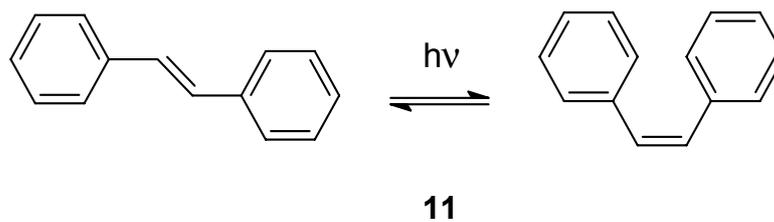


Abb. 5b

Abb. 5 : Potentialkurven unterschiedlich verlaufender diabatischer Photoreaktionen
Sind diese beiden (lokalen) Extrema auf der Reaktionskoordinate gegeneinander verschoben, z. B. weiter in den Bereich der Produktgeometrie, kann eine längere Be-

strahlung vollständig und dauerhaft zum Produkt, in diesem Falle zum Z-Silben, führen (Abb. 5b).

Dadurch verlieren die gelösten Aufheller ihre Bindungs- und Fluoreszenzeigenschaften. Eine solche *trans-cis*-Photoisomerisierung kann man beispielhaft auch beim Stilben (**11**) selbst beobachten.



Nicht nur beim Stilben, auch bei optischen Aufhellern mit einem Stilben-Grundkörper können sich dabei neben Lage und Intensität der Absorptionsmaxima auch andere physikalische Daten der Substanzen erheblich ändern.

Tab. 1: Einige Eigenschaften der beiden Stilben-Isomere

Isomer	Smp. / [°C]	Sdp. / [°C]	Dichte	Erscheinung
Trans	124 - 126	306-307	0.971	farblose, glänzende Kristalle
Cis	+1	135 ¹³	1.020	farbloses, blütenähnlich riechendes Öl

Der an die Polysaccharide der Zellwand oder der Textilien gebundene Anteil der optischen Aufheller ist dieser Isomerisierung jedoch kaum unterworfen und behält so seine Fluoreszenzeigenschaften bei. Diese Tatsachen sind nicht nur von theoretischem Interesse, sondern haben in zweifacher Hinsicht direkte Auswirkungen auf die weitere Vorgehensweise. Zum einen ist es unerlässlich, die Substanzen in abgedunkelten Apparaturen herzustellen, zu reinigen und zu lagern. Zum anderen kann die-

ses Verhalten auch erste Anhaltspunkte darüber geben, ob die hergestellten Verbindungen die gewünschte Affinität zu Chitin oder Cellulose haben.

Wird eine Chitinprobe unter UV-Licht betrachtet und mit einer alkalischen Lösung der Farbstoffe behandelt, nimmt die Fluoreszenz der Lösung ab, während an der Oberfläche des Chitins zunehmend Fluoreszenz zu beobachten ist. Anders als die Reaktivfarbstoffe der Bis-Chlortriazinyl-diaminostilbenreihe oder Bis-Dichlortriazinyl-diaminostilbenreihe, die kovalent gebunden werden, lagern sich die im Triazinteil vollständig substituierten, also kein reaktives Chlor tragenden optischen Aufheller, nicht-kovalent durch Dipolwechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen an den Hydroxygruppen der Polysaccharide an^[173,174].

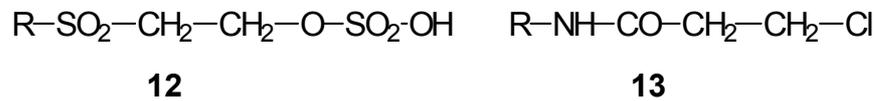
Daher kann sich der Farbstoff jedoch auch wieder vom Chitin trennen und in Lösung gehen. Wird die Farbstoff-Lösung mit der darin befindlichen Chitin- oder pilzbelasteten Gewebe-Probe längere Zeit mit UV-Licht bestrahlt, kann man eine Abnahme der Fluoreszenzintensität an der Probenoberfläche beobachten. Gleichzeitig unterliegt der gelöste Farbstoff der Photoisomerisierung und verliert so seine Bindungs- und Fluoreszenzeigenschaften. Je länger also eine Fluoreszenz von der behandelten Chitinprobe ausgeht, desto wahrscheinlicher ist es, daß die Bindung der Farbstoffe in der gewünschten Weise erfolgt.

Farben und optische Aufheller sollen einen möglichst langanhaltenden Farbeindruck hinterlassen. Dazu müssen sie spätestens dann, wenn sie auf oder in dem zu färbenden Material verarbeitet wurden, auch gegenüber intensiver Sonneneinstrahlung weitgehend unempfindlich, also lichtecht sein. Textilfarben dürfen sich zudem beim Waschen auch bei höherer Temperatur nur geringfügig von der Faser ablösen lassen. Besonders waschecht sind Reaktiv-Farbstoffe, die über einen sogenannten Reaktivanker kovalent mit der Faser verbunden sind. Ein solcher Farbstoff besteht üblicherweise aus mehreren funktionellen Einheiten, die teilweise direkt oder über Bindeglieder miteinander verknüpft sind. Diese Einheiten sind daher nicht immer klar voneinander abzugrenzen. Reaktivfarbstoffe bestehen aus^[175] :

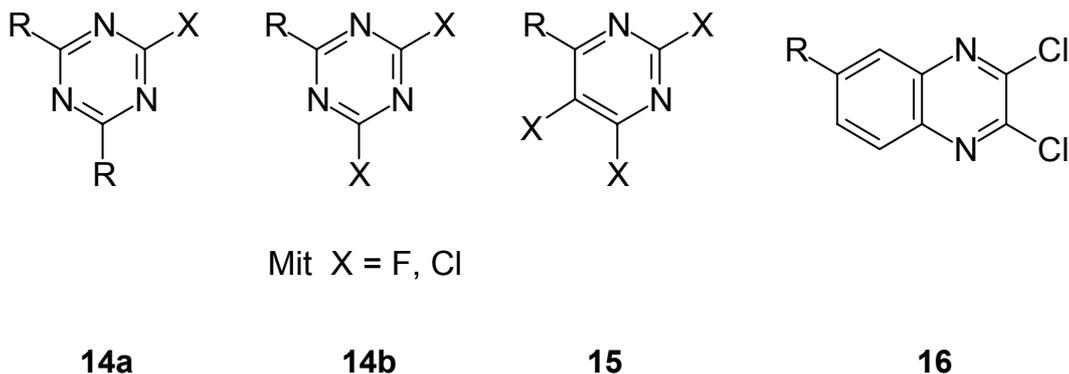
- dem Reaktivanker
- löslich machenden Gruppen
- dem Chromophorsystem

- den Bindegliedern

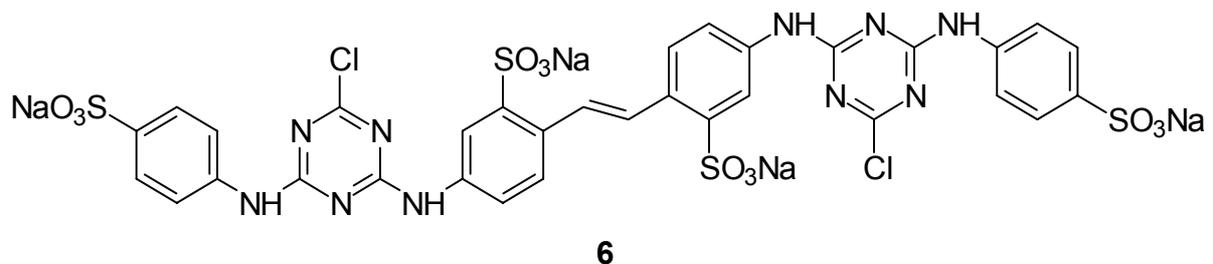
Häufig verwendete Reaktivanker sind die β -Sulfooxyethylsulfone (**12**) und ω -Chlorpropionamide (**13**).



Sie bilden nach Reaktion in alkalischen Lösungen mit der so entstehenden Vinylgruppe Etherbindungen zu Cellulose-Hydroxygruppen der Textilfasern aus. Andere Reaktivanker sind in verschiedener Weise Fluor- und Chlor-substituierte Triazine (**14a**, **14b**) und Pyrimidine (**15**) sowie Dichlorchinoxaline (**16**).



Bei dem unten gezeigten optischen Aufheller (**6**) bildet der Monochlortriazinrest den Reaktivanker. Die Natriumsulfonatgruppen sind für eine gute Wasserlöslichkeit verantwortlich. Die Farbigkeit wird wesentlich durch das konjugierte System der Diaminostilbendisulfonsäure-Gruppe beeinflusst.



Durch die freien Elektronenpaare der jeweils verbindenden Aminogruppen kann sich

die Konjugation jedoch weiter über die aromatischen Teilbereiche des Moleküls erstrecken. Damit geht die Funktion „Chromophor“ in diesem Molekül auch auf die Einheiten „Anker“ und „Bindeglied“ über.

Der besondere chemische Charakter der Monochlortriazinfarbstoffe lässt sich am besten durch die Betrachtung einer Synthese erklären. Ausgehend vom 2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin (**7**) lassen sich die drei Chloratome mit stark abgestufter Reaktivität einzeln nacheinander substituieren. In der ersten Stufe können beispielsweise zwei Äquivalente des Trichlortriazins bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einem Äquivalent 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure **8** umgesetzt werden. Obwohl gerade bei dieser ersten Reaktionsstufe auch andere Nucleophile mit dem Trichlortriazin (**7**) reagieren können, werden die großtechnischen Synthesen dieser Farbstoffe üblicherweise mit Wasser als Lösungsmittel durchgeführt. Das entstehende Produkt kann in alkalischer Lösung bei $20 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ schnell z. B. mit zwei Äquivalenten eines Amins reagieren. Das letzte Chloratom ist dagegen erst bei Temperaturen oberhalb von $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ substituierbar. Die Reaktion folgt dem klassischen Mechanismus der nucleophilen *ipso*-Substitution am Aromaten ArS_{N} , der in Abb. 6 wiedergegeben ist. Ganz analog dazu verläuft auch die Zweit- und Drittsubstitution.

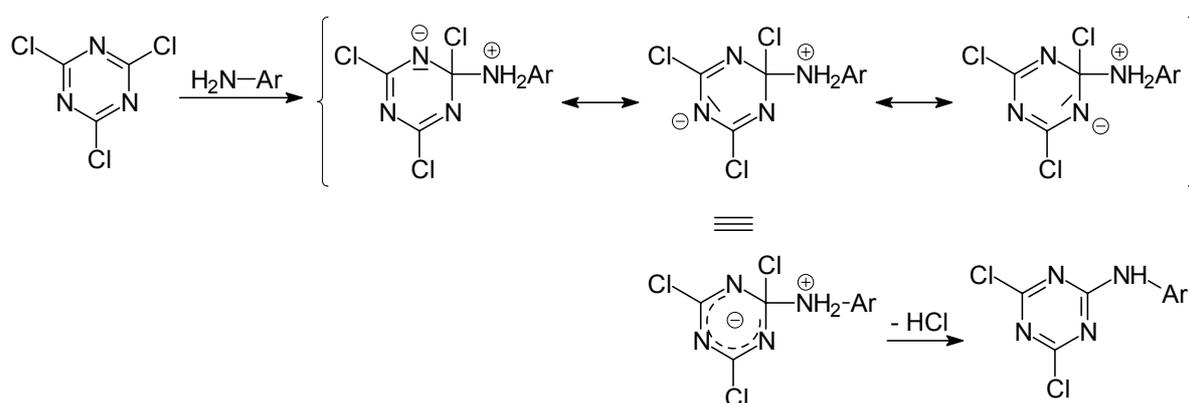


Abb. 6: ArS_{N} -Mechanismus am Beispiel Trichlortriazin / aromatisches Amin.

Das durch den nucleophilen Angriff als Zwischenstufe gebildete Anion wird sowohl durch die Stickstoffatome des heteroaromatischen Ringes als auch durch den -I-Effekt der Chlorsubstituenten stabilisiert.

Die durch die Substitution eingeführte NH-Ar-Gruppe hat im Vergleich mit dem Chlor-Atom einen geringeren -I-Effekt. Durch den +M-Effekt wird das Triazinderivat noch zusätzlich stabilisiert und für einen zweiten nucleophilen Angriff unattraktiver. Die gleichen Effekte wirken sich nach der zweiten auch auf die dritte Substitution aus.

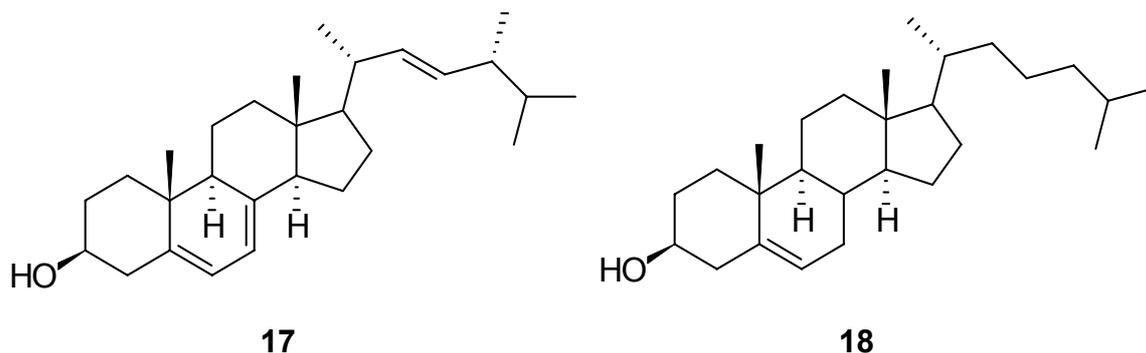
3.2 Überlegungen zu antimykotisch aktiven Diaminostilbenderivaten

Antimykotika können entweder im Inneren der Pilzzelle spezifische Stoffwechselvorgänge behindern oder als zellwandaktive Substanzen den Aufbau, die Erweiterung und die Stabilität der Zellwand stören. Wird eine Pilzinfektion bei einer solchen Behandlung beseitigt, ist die entsprechende Wirksubstanz fungizid. Wird der Pilz lediglich am Wachstum und in seiner Vermehrung gehindert, spricht man von fungistatischer Wirkung. Da die für einen Einsatz als Transporter vorgesehenen Farbstoffe an die äußeren Schichten der Pilzzellwände binden, kann man nicht voraussetzen, daß im Inneren der Pilzzellen angreifende Wirkstoffe ihre antimykotische Aktivität entfalten können, wenn sie als Konjugat mit optischen Aufhellern im Exoskelett der Pilze eingelagert sind. Daher ist es sinnvoll, zellwandaktive Antimykotika zur Kopplung mit den vorher angesprochenen optischen Aufhellern zu verknüpfen. Einige diese Substanzen werden in Tab. 2 vorgestellt.

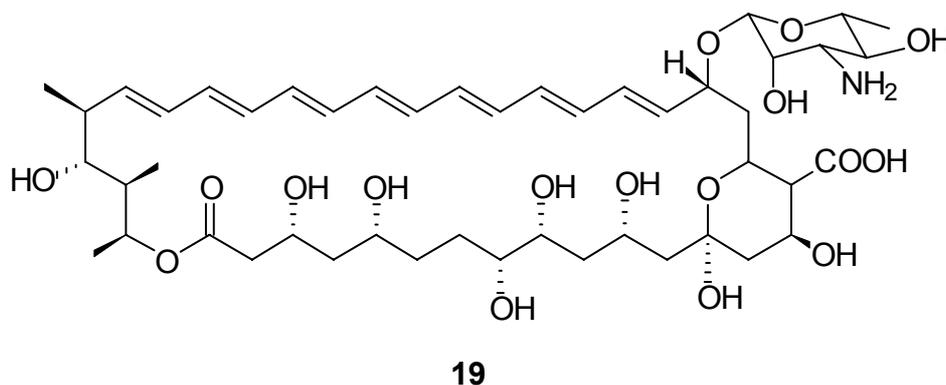
Tab. 2: Einige zellwandaktive Substanzen und deren Wirkungsweise.

Antimykotikum	hemmt / blockiert / bindet an
Polyoxine und Nikkomycine	Chitin-Synthase
Echinocandine	β -(1,3)-Glukansynthaseinhibitoren
Pneumocandine	β -(1,3)-Glukansynthaseinhibitoren
Pradimycine / Benanomycinen	Mannoproteine
Azole / Allylamine / Thiocarbamate	Synthese des Ergosterin

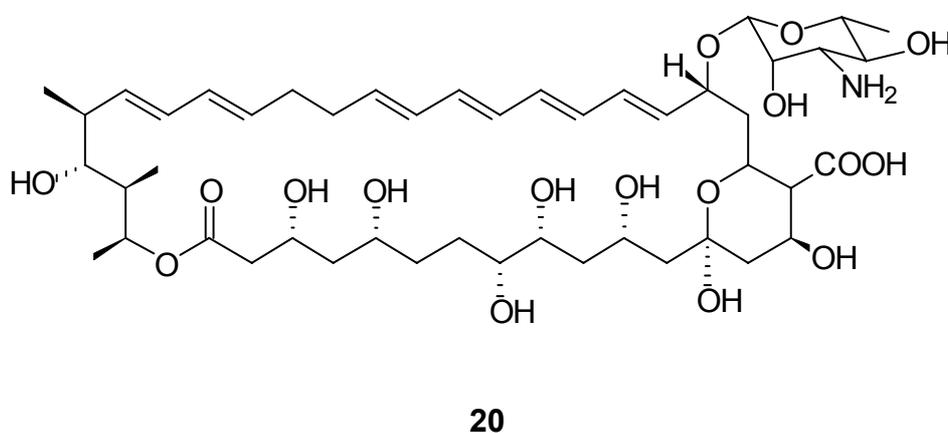
Für eine erfolgreiche Bindung an Enzyme oder Proteine im Sinne inhibitorischer Wirksamkeit werden im allgemeinen hohe Anforderungen an die Struktur der angreifenden Substanzen gestellt. Es ist daher zu befürchten, daß eine Verknüpfung dieser Substanzen mit optischen Aufhellern, auch wenn sie über langkettige Bindeglieder erfolgt, die Wirksamkeit dieser Antimykotika wesentlich einschränken kann. Lohnerder erscheint daher die Untersuchung eines Stilben-Antimykotikum-Hybrides, dessen Wirkstoffteil direkt mit Teilen der Zellwand interagiert. Einige solcher Stoffe sind in der Gruppe der Polyenantibiotika zu finden. Ihr Angriffspunkt ist die innerste Schicht der Zellwand, die Plasmamembran. Diese besteht hauptsächlich aus Phospholipiden und Proteinen. Die Beweglichkeit oder Fluidität der Pilzzellen wird durch Ergosterin (**17**) reguliert, das in die Plasmamembran eingelagert ist. In menschlichen Zellen übernimmt dagegen Cholesterin (**18**) diese Aufgabe.



Zwei medizinisch wichtige Polyene sind Amphotericin B (AmB, **19**), das 1953 aus *Streptomyces nodosus* isoliert wurde und seit 1955 im medizinischen Gebrauch ist, sowie Nystatin A₁ (NY, **20**).



Bei Nystatin A₁ (**20**) und einem weiteren Polyen, dem hier nicht abgebildeten Amphoterin A, wird das Doppelbindungssystem an C-28 durch zwei Methylengruppen unterbrochen, so daß je zwei Systeme aus vier und zwei konjugierten Doppelbindungen vorliegen.



Erst 1970 konnten diese drei äußerst ähnlichen Verbindungen zweifelsfrei unterschieden werden^[176]. Auch Natamycin, ein Polyenmakrolidantimykotikum welches häufig zur Behandlung von Käserinden eingesetzt wird, findet medizinische Verwendung. Nystatin A₁ (**20**) und Natamycin können nur lokal angewendet werden, da sie oral verabreicht kaum resorbiert und daher nahezu vollständig wieder ausgeschieden werden und nach parenteraler Gabe toxisch wirken. Amphotericin B (**19**) wird dagegen vorwiegend systemisch eingesetzt.

Die Amphotericine und Nystatin (**20**) besitzen einen durch Hydroxygruppen und einen glykosidisch gebundenen Aminozucker stark hydrophilen Molekülteil. Die andere Seite des makrozyklischen Laktorrings ist mit sieben (im AmB) bzw. sechs (im NY) konjugierten Doppelbindungen stark hydrophob.

Die in Tab. 2 genannten Verbindungen oder Verbindungsklassen wirken teilweise unterschiedlich stark gegenüber verschiedenen Erregern. In der Klinik werden sie deshalb häufig in Kombinationen verwendet. Sollten sie als hypothetische Wirkstoff-Farbstoff-Addukte im Bereich der Zellwand überhaupt eine Wirkung entfalten können, müssten sie mit den Aufheller-Konjugaten der jeweils anderen Antimykotika um die Chitin-Bindungsstellen konkurrieren. Bei Affinitäten nicht gleicher Größenordnung wäre daher eine sichere Behandlung einer durch mehrere Erreger hervorgerufenen Mykose nicht gewährleistet. Amphotericin B hat dagegen (von Ausnahmen abgesehen) eine hohe Wirkstärke gegenüber verschiedensten Mykoseerregern. Durch diese Überlegungen und aus der Wirkungsweise von z. B. Amphotericin B (**19**) oder Nystatin (**20**) wird deutlich, warum diese Polyenmakrolidantibiotika besonders vorteilhaft als Wirkstoffkomponente ausgewählt werden können.

Sowohl AmB (**19**) als auch das Ergosterin (**17**) der Zellmembranen der Pilze sowie das Cholesterin (**18**) der menschlichen Zellmembranen besitzen ein nahezu gleich langes, starres hydrophobes Molekülgerüst. In die Zellmembran eingelagerte, aus unverzweigten gesättigten Fettsäuren gebildete Phospholipide liegen normalerweise eng und parallel ausgerichtet aneinander. Ungesättigte Fettsäuren enthaltende Phospholipide werden in Pilzzellen durch Ergosterin (**17**) und in menschlichen Zellen durch Cholesterin (**18**) in eine ähnliche Anordnung gezwungen (Abb. 7).

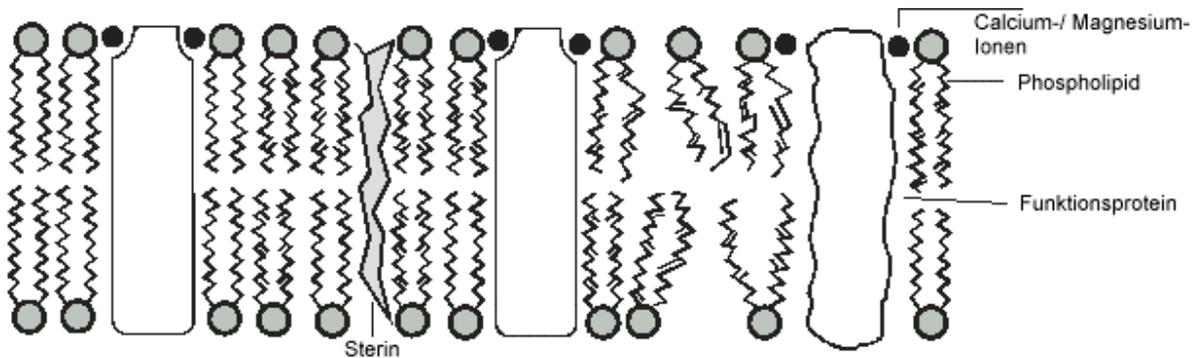


Abb. 7 : Schema einer Lipid-Doppelmembran nach Forth.

Amphotericin B (**19**) kann bei Pilzen durch verschiedene Mechanismen zellschädigend wirken, die auf einer Wechselwirkung mit den Membranlipiden beruhen. Zum einen liegen die Phospholipide nicht mehr dicht aneinander, wenn AmB (**19**) an die Sterine angelagert wurde^[177]. Dadurch kann die Aktivität der vorher beengten Funktionsproteine wie Na⁺-/K⁺-ATPase zunehmen (Abb. 7).

Zum anderen kann es durch den Zusammenschluß mehrerer Amphotericin B Moleküle zur Bildung röhrenförmiger, unnatürlicher und nichtregulierter Membranporen kommen (Abb.8)^[178- 182].

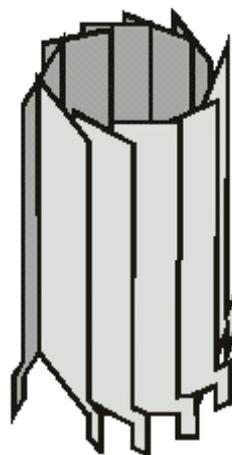


Abb. 8 : Schema einer aus AmB-Molekülen gebildeten Röhre nach Yamashita et.al.

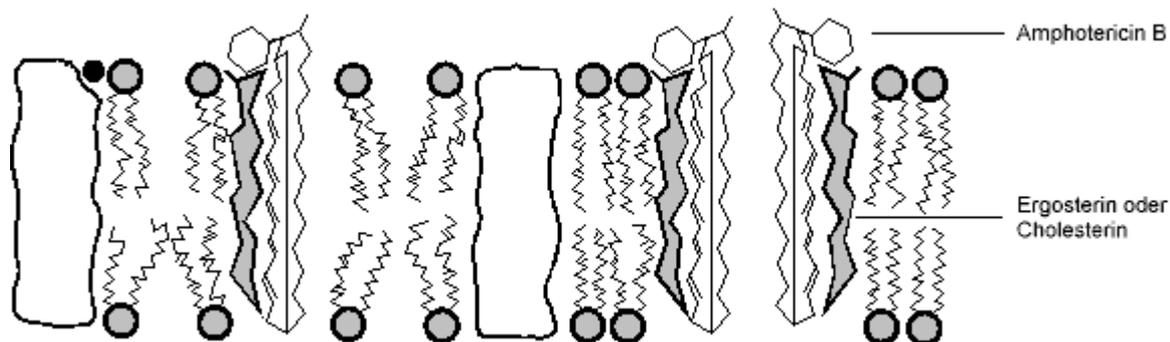
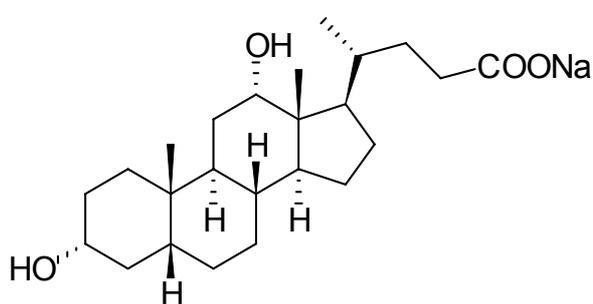


Abb. 9 : Interaktion von Amphotericin B mit Sterinen der Lipidmembran nach Forth.

Im Ergebnis verliert die Zelle Elektrolyte und andere Stoffe des Cytoplasmas^[183, 184]. Ein weiterer Aspekt der Wirkung sind durch AmB (**19**) vermittelte oxidative Prozesse^[185]. Insgesamt kann AmB (**19**), hoch genug dosiert, fungizid sein. Seiner hochdosierten Anwendung sind jedoch Grenzen gesetzt, da es kaum wasserlöslich ist und, besonders bei höheren Dosierungen, schwerste Nebenwirkungen wie z. B. irreversible Niereninsuffizienz hervorrufen kann. Deshalb wird es schleichend, innerhalb mehrerer Tage sehr langsam und hoch verdünnt, injiziert. Für diese Vorgehensweise ist AmB (**19**) geeignet, weil es durch über 90proz. Proteinbindung bei geringer renaler Ausscheidung Halbwertszeiten von 24 bis 48 Stunden, in tiefen Kompartimenten sogar von 100 Stunden, hat. Dennoch wirkt es dann gegebenenfalls nicht mehr fungizid^[186]. Diesen Problemen versucht man durch die gleichzeitige Gabe von Lösungsvermittlern (Natriumdeoxycholat, **21**)



21

oder durch die Verwendung micellarer AmB-Phospholipid-Formulierungen zu begegnen. Die Lipidformulierungen sollen dabei das Amphotericin B (**19**) nicht im Bereich

des Cholesterins menschlicher Zellen, sondern erst in der Nähe des stärker bindenden Ergosterins der Pilze freisetzen^[187-190]. Die so erhaltenen Ergebnisse werden jedoch sehr unterschiedlich bewertet^[191-194].

Ein anderer Ansatz, der sich nicht auf die Galenik, sondern auf AmB (**19**) selbst bezieht, wurde mit zahlreichen chemischen Derivatisierungen beschritten^[195-209]. Keines der Derivate hat Eingang in die klinische Praxis gefunden. Wegen seiner starken und rasch eintretenden Wirksamkeit gilt Amphotericin B (**19**) jedoch trotz aller Schwierigkeiten nach wie vor als Gold-Standard für die Therapie systemischer Mykosen.

Ein kovalent über Spacer verbundenes Assoziat aus Stilbenen mit hoher- β -Glukan-Affinität und Polyenmakrolidantimykotika ist aus mehreren Gründen ein reizvolles Ziel.

Anders als das zelltoxische Natriumdeoxycholat sind durch optische Aufheller der Diaminostilbenreihe kaum toxische Wirkungen zu erwarten. Die Natriumdeoxycholat-AmB-Komplexe lösen sich im Blut auf. Eine zu hohe Konzentration an AmB (**19**) kann dann zu Präzipitaten und der gefährlichen Trombenbildung führen. Auch aus diesem Grund wird die schleichende Infusion vorgenommen, bei der üblicherweise nur einzelne AmB-Moleküle in der Plasmamembran vorliegen. In Pilzzellmembranen sind an der Bildung der künstlichen Poren sowohl AmB (**19**) als auch Ergosterin beteiligt, während sie in menschlichen Zellen allein von AmB gebildet wird. Die Fähigkeit zur Röhrenbildung wird bei der oben beschriebenen Art der Therapie wegen der daraus resultierenden geringen Makrolid-Konzentrationen am Wirkort aber nicht genutzt^[210].

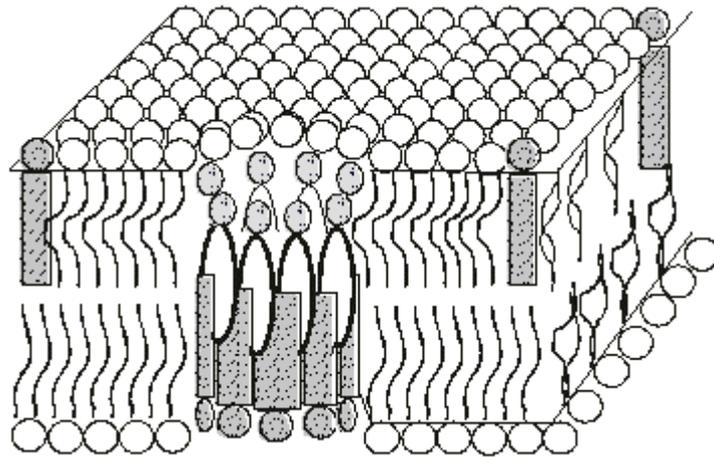


Abb. 10 : Bildung einer künstlichen Membranpore aus Amphotericin B und Ergosterin nach Bonner et al. In der Abbildung entsprechen: Kreise mit gewellten Linien = Phospholipide, Kreise mit hellem Oval = Amphotericin B, Kreise mit dunklen Stäbchen = Ergosterin.

Durch eine erwartete Anreicherung am gewünschten Zielort könnte trotz schleicher Infusion und dementsprechend niedrigem Plasmaspiegel eine hohe Wirkstoffkonzentration im Bereich der Pilzzellwand erreichbar sein. Dadurch könnte die insgesamt zu injizierende Dosis verringert und so die üblicherweise von diesem Antimykotikum ausgehende erhebliche Nephrotoxizität vermieden werden.

3.3 Untersuchungen zu antimykotisch aktiven Diaminostilben-disulfonsäurederivaten

Ziel war der Zugang zu Diaminostilbendisulfonsäurederivaten, die zur Synthese der Antibiotika-Addukte geeignet sind. In derartigen Addukten soll ein Verbindungsglied, ein sogenannter Linker oder Spacer, den beiden anderen Molekülen eine ausreichende Beweglichkeit ermöglichen. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus der Einlagerung des Anker-moleküls in Chitinstrukturen an den äußeren Schichten der Pilzzellwand und dem Wirkort des Amphotericins die Plasmamembran.

Es ist bekannt, daß Detergentien, desinfizierend wirkende Invertseifen und langkettige quartäre Ammoniumsalze, die teilweise auch zur Behandlung von Mykosen der Haut Verwendung finden, ihre größte Grenzflächenaktivität und Anlagerungsfähigkeit

an Membrane bei Alkylkettenlängen von 10 bis 14 Kohlenstoffatomen zeigen^[211]. Vordringlich sollten die Spacer also Alkyl- oder Heteroalkylketten ähnlicher Länge haben. Weiterhin muß der Spacer beidseitig reaktive Endgruppen tragen, um die anderen Komponenten kovalent miteinander verbinden zu können.

Das als „Enterhakenmolekül“ ausgewählte Molekül **3a** verfügt über Sulfonatgruppen, die mit Hydroxy-, Thiol-, oder Aminoendgruppen entsprechende Ester, Thioester und Amide bilden können. Diese Sulfonsäurederivate sind teilweise extrem schlecht löslich, wofür die Herstellung von Sulfonamiden zur Identifizierung von Aminen ein bekanntes Beispiel liefert. Da die Sulfonatgruppen für eine ausreichende Wasserlöslichkeit benötigt werden, sollten nur solche Endgruppen ausgewählt werden, die als Nucleophile mit dem Chlortriazinteil des Farbstoffes reagieren können und nicht einer Anknüpfung über die Sulfonsäuregruppe bedürfen. Die Hydroxy-, Thiol- und Aminogruppen sind ebenfalls gute reaktive Gruppen im Sinne einer nucleophilen Substitution, und werden daher als Spacerendgruppe in Betracht gezogen.

Das Amphotericin B besitzt eine Aminogruppe, eine Carboxygruppe und 10 Hydroxygruppen sowie das System konjugierter Doppelbindungen. Auf der Makrolidseite des Spacers können demnach die schon genannten nucleophilen Gruppen mit der Carboxygruppe oder Michael-Akzeptoren und aktivierten Carbonsäuregruppen mit der Amino- oder den Hydroxygruppen reagieren.

Da der Teil des Amphotericins mit dem ausgedehnten Doppelbindungssystem und den gegenüberliegenden Hydroxygruppen in die Membran eindringen soll, ist die Bindungsbildung an dieser Stelle nicht sinnvoll. Die Aminogruppe der Zuckereinheit hat wesentlichen Einfluß auf die Anordnung und Fixierung des Makrolids in der Lipidmembran. Mit ihr gebildete Acetamide zeigen teilweise eine gesteigerte Wirksamkeit^[212].

Carbonsäureazide können mit Aminen zu entsprechenden Carbonsäureamiden umgesetzt werden. Um aus Carbonsäuren Carbonsäureazide zu erhalten, kann Phosphorsäurediphenylesterazid eingesetzt werden. In Gegenwart von Aminen läßt sich so vermeiden, daß die Carbonsäureazide in Isocyanate übergehen und mit primären Aminen Harnstoffderivate bilden.

Aus Vorstudien zu dieser Arbeit ist die Möglichkeit bekannt, das Bis-11-aminoundecansäurederivat von **3c** mit Phosphorsäurediphenylesterazid (DPPA) zu aktivieren und so an die Aminogruppe des Amphotericins zu koppeln (Abb. 11) ^[213].

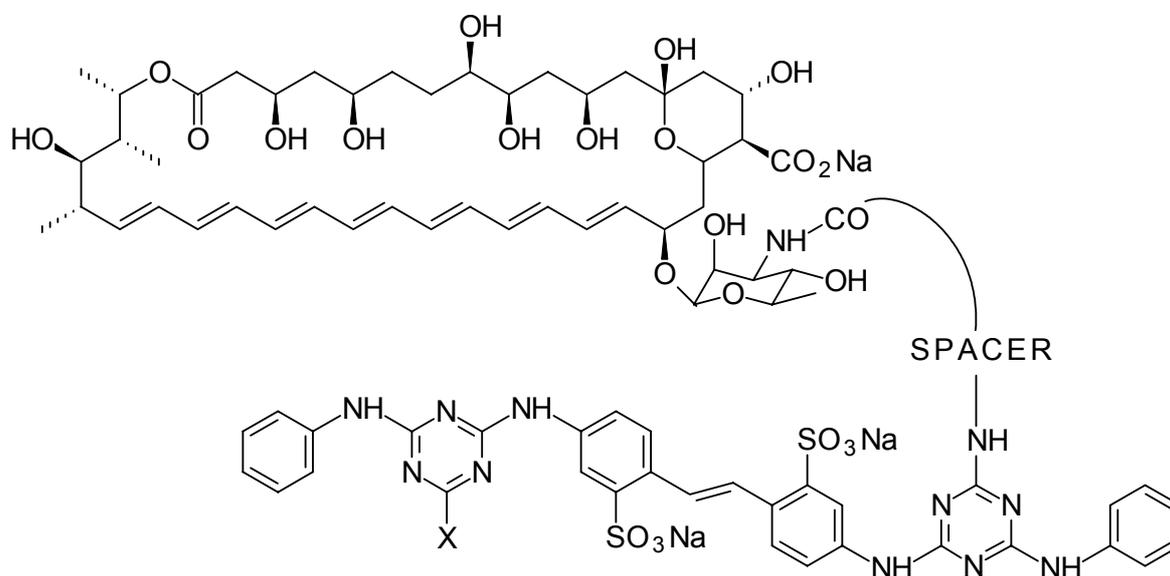


Abb. 11 : AmB-Triazinyladdukt. Zur Beschreibung des Spacers siehe Text. Bei X kann es sich um Chlor, ein weiteres Spacermolekül oder um eine Hydroxygruppe handeln.

Eine vollständige Reinigung und Charakterisierung der Produkte konnte jedoch mit HPLC an Normalphasen und C18-Phasen nicht erreicht werden. Eine Untersuchung der Bindungsfähigkeit dieses Produktes als Reinsubstanz war daher nicht eindeutig, obwohl es im Aggar-Diffusionstest starke Aktivität gegen *Mucor miehei* zeigte. Beim Nacharbeiten der an dieser Stelle angegebenen Vorschrift konnte auf schon vormals hergestellte linkersubstituierte Aufheller zurückgegriffen werden. Durch Reaktion bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Gegenwart von Triethylamin konnte das schon vorhandene Substitutionsprodukt aus **3** und 11-Aminoundecansäure durch DPPA mit Amphotericin B in ein tief dunkelrotes Produkt überführt werden, welches zusätzlich mit anderen als den dort verwendeten HPLC-Phasen analysiert werden sollte.

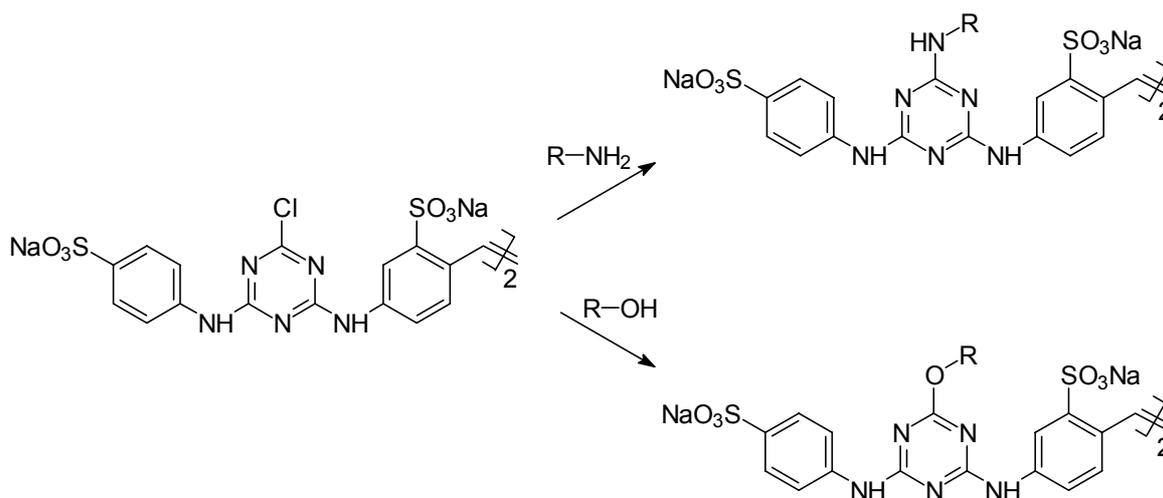
Zur Verfügung standen zusätzlich zu den schon vorher verwendeten Normalphasen- und C18-Säulenmaterialien analytische Säulen, deren Trenngele mit Nitril-, Diol- und Benzyl-Gruppen modifiziert waren. Als Laufmittel wurden nach Maßgabe von Herstellern dieser Materialien wässrige Systeme verwendet, deren zweite Komponente Methanol, Acetonitril, Isopropanol oder Essigsäureethylester war. Anstelle von Was-

ser wurde ebenfalls 0.1proz. Trifluoressigsäure, 50 mmolarer Phosphatpuffer pH 7.1 und 50 mmolarer Boratpuffer pH 8.2 verwendet. Es gelang jedoch nicht, das Zielmolekül in der für eine Charakterisierung ausreichenden Reinheit zu erhalten. Aus vorherigen Arbeiten waren zahlreiche Hindernisse auf dem Weg zu AmB-Stilben-Hybriden bekannt. Daher bot sich die Entwicklung von radioaktiv markierten Diaminostilbenderivaten als weiterer Weg an, das Grundkonzept der Kopplung optische Aufheller mit Wirkstoffen zu überprüfen. Im weiteren Verlauf werden also nicht mehr nur Edukte für die Verknüpfung von Diaminostilbendisulfonaten mit antimykotisch aktiven Substanzen, sondern auch mögliche Träger radioaktiver Nuklide gesucht.

3.4 Untersuchungen an Diaminostilbentetrasulfonsäurederivaten

3.4.1 Herkömmliche Syntheseverfahren von Diaminostilbentetrasulfonsäurederivaten

Da sich die Effektstärke der pH-Modulation bei chromatographischen Trennmetho- den durch die Anzahl saurer oder basischer Gruppen in den zu trennenden Molekü- len unterscheidet, sollten nun Verbindungen hergestellt werden, auf deren Retenti- onsverhalten bei der Chromatographie eine Änderung des pH-Wertes einen größe- ren Einfluß hat. Aus dem Bereich der optischen Aufheller können das Diaminostilbentetrasulfonsäuren vom Typ **6** sein. Sie sind zudem besser wasserlöslich als die verwandten Disulfonsäuren. Das ist von Vorteil, wenn als Spacer langkettige, in Wasser schwer lösliche Aminocarbonsäuren, α,ω -Diole oder α,ω -Diamine eingesetzt werden sollen. Ziel war die Einführung der α,ω - bifunktionellen Moleküle wie (Poly)-Ethylenglycol, Aminocarbonsäuren, endständig aminsubstituierte (Poly)-Ethylenglycole und α,ω -Diaminoalkane zur Substitution des Chloratoms in **6** zu Verbindungen der allgemeinen Form **22**.

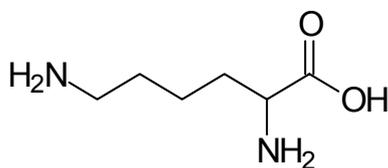


6

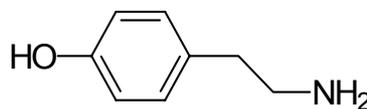
22 a : oben

22 b : unten

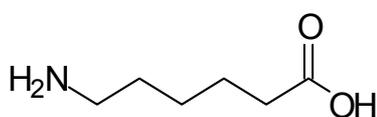
Dabei entsprechen R-NH₂, R-OH sowie die daraus in **22** hervorgehenden Substituenten den unten angegebenen Verbindungen.



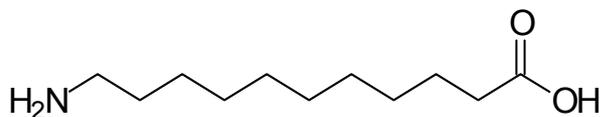
Lysin **23**



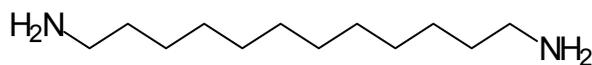
Tyramin **24**



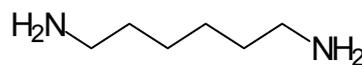
6-Aminohexansäure **25**



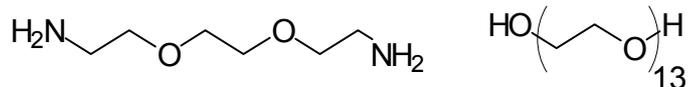
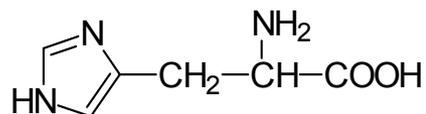
11-Aminoundecansäure **26**



Diaminododecan **27**



1,6-Diaminohexan **28**

1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan **29**PEG 600 **30**Histidin **31**

Zur Klärung des Reaktionsverhaltens von **6** wurde es in 20proz. wäßriger Natriumchlorid-Lösung mit den oben gezeigten Verbindungen zur Reaktion gebracht und dabei die zur Neutralisation theoretisch benötigte Menge Natriumcarbonat als 1 molare Lösung so zugesetzt, daß der pH-Wert der Reaktionsmischung immer neutral blieb. Es bildeten sich hellgelbe Lösungen, aus denen die Produkte aus phosphatgepufferter Lösung mit Kaliumchlorid ausgesalzen wurden. Sie wurden aus einer Mischung aus DMF und Ethanol (1:9) umkristallisiert. Die abfiltrierten Niederschläge der Reaktionen mit Tyramin, 6-Aminohexansäure, 11-Aminoundecansäure und PEG600 waren orange-gelb, nach Umkristallisation hellgelb, mit Histidin braungelb, nach Umkristallisation hell grünbraun. Die Filtrationsrückstände, die aus den übrigen Reaktionen erhalten wurden, änderten ihre Farbe durch die Umkristallisation nicht. Sie waren bei 1,6-Diaminohexan und 1,12-Diaminododecan blaßgelb, bei Lysin rotbraun, und bei 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan graugrün. Aus den präparativen Dickschichtchromatogrammen (Kieselgel, Laufmittel: 26proz. wäßrige Ammoniak-Lösung, Essigsäureethylester, Isopropanol und Wasser im Verhältnis 3:8:10:4) wurden die farbigen bzw. fluoreszierenden Zonen extrahiert und wie in 3.3 beschrieben untersucht. Dabei konnte ausschließlich durch die Nitril-Säule (Acetonitril/Wasser acetrop : 0.1 %TFA / 80:20), jedoch nur bei dem mit der 11-Aminoundecansäure (**26**) hergestellten Produkt, eine Trennung beobachtet werden. In dem von dieser Produktprobe angefertigten Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, Laufmittel: 26proz.

wäßrige Ammoniak-Lösung, Essigsäureethylester, Isopropanol und Wasser im Verhältnis (3:8:10:4) waren jedoch neun verschiedene fluoreszierende Zonen zu erkennen, von denen drei im Chromatogramm der Ursprungsprobe nicht erschienen. Weitere Trennversuche blieben erfolglos. Durch die Verwendung von Natriumhydroxid und Natriumhydrogencarbonat als Säurefänger bei der Kondensation ergaben sich keine Vorteile in Bezug auf die Anzahl der Produkte.

In den zuvor beschriebenen Versuchen war die Einführung der Spacermoleküle die dritte Substitutionsstufe am Triazinring. Im allgemeinen wird für die schrittweise Substitution der Chloratome des Tichlortriazins (**7**) zum Aufbau der Aufheller in der ersten Stufe die Diaminostilbendisulfonsäure (**8**), nachfolgend Anilin oder ein substituiertes Anilin zugesetzt. Erst in der dritten Stufe findet dann die Kondensation mit einem Stickstoff- oder Sauerstoffnucleophil (Nu-H) statt, welches dann die endgültigen Eigenschaften des angestrebten Produktes bestimmt. Diese Reaktionsführung ist mit der oben beschriebenen Umsetzung des Monochlortriazins **6** mit den Spacern **23** bis **31** bereits nachvollzogen worden.

Davon abweichend sollte es grundsätzlich auch möglich sein, die eingangs als Spacer ausgewählten Moleküle im ersten oder zweiten Kondensationsschritt einer zu den Spacer-substituierten Flavonsäurederivaten (**22**) führenden Synthese einzuführen. Diese Überlegung ist auch deshalb zwingend, weil für die angestrebten Untersuchungen primär Derivate der allgemeinen Struktur **22** benötigt werden. Es wurden deshalb Synthesepläne vorbereitet, die dieser Priorität Rechnung tragen.

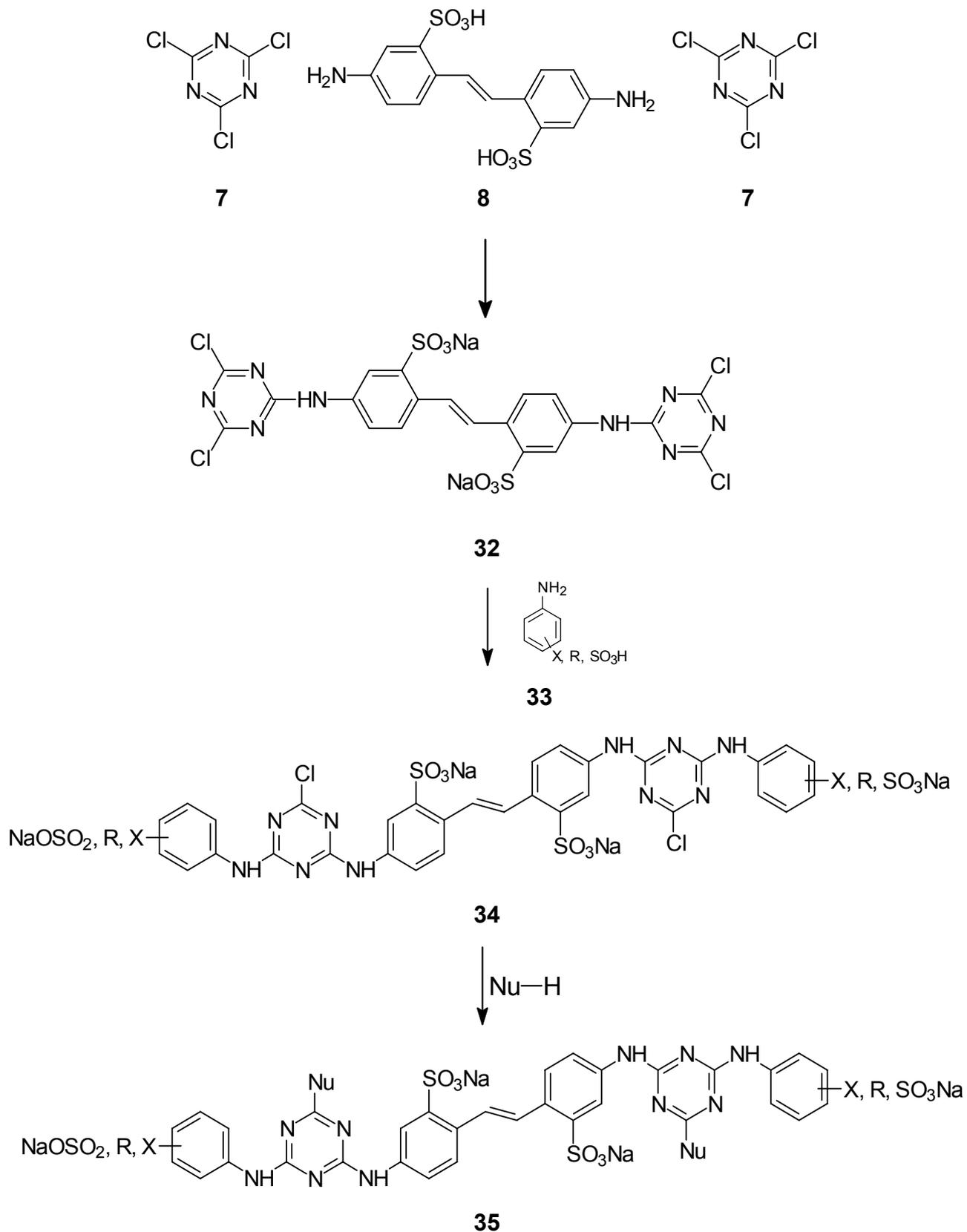


Abb. 12 : Ein möglicher Syntheseweg zur Darstellung von amino- und hydroxyalkylsubstituierten Triazinylaminostilbensulfonsäuren (**35**).

Die Spacer direkt in der ersten Stufe mit Trichlortriazin (**7**) reagieren zu lassen, bietet dabei sowohl Vorteile als auch Nachteile. Sollte es bei der herkömmlichen Syntheseführung schwierig sein, den Spacer einzuführen, wird er wegen der hohen Reaktivität seines Reaktionspartners nun schnell abreagieren können. Nachteilig könnte sich aber auswirken, daß es mit *homo*-bifunktionellen Spacern in solchen Situationen auch zur Verbrückung kommen kann (Abb. 13). Zwar kann man hier auf den Einsatz einer Base als Säurefänger verzichten um die Spacer-Aminogruppen zu protonieren, doch ist nicht sichergestellt, daß die zweite Aminogruppe eines schon gebundenen Linkers protoniert wird.

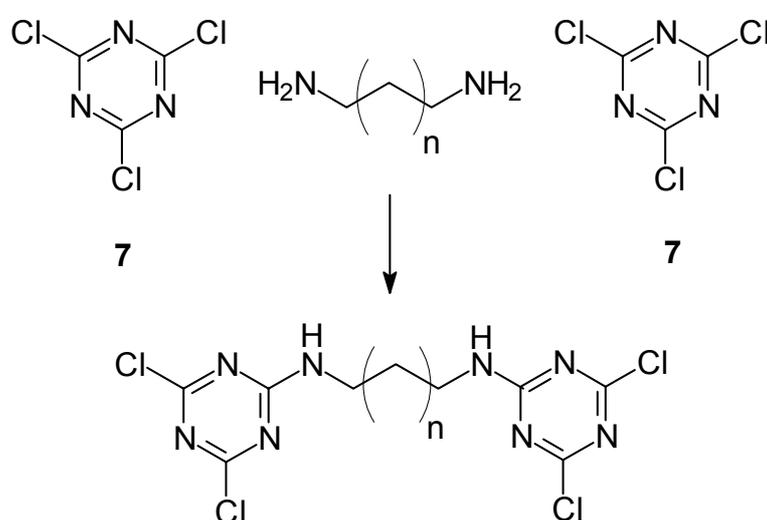


Abb. 13 : Verknüpfung von Triazinmolekülen mit ω,ω' -Diaminoalkylen als mögliche Nebenreaktion.

Amino- und Hydroxycarbonsäuren können als *hetero*-bifunktionelle Linker bei einer solchen Reaktionsführung einerseits als Nukleophil reagieren, aber auch zum Carbonsäurechlorid umgesetzt werden (Abb. 14).

Diese wiederum könnten ihrerseits mit der Aminokomponente unter Carbonsäureamidbildung abreagieren. Dem kann man begegnen, indem man in basischem Milieu arbeitet. Dann liegt die Carbonsäure als Carboxylation ohne Carbonylaktivität im Hinblick auf eine mögliche Säurechloridbildung vor. Zusätzlich ist die dann nicht protonierte Aminogruppe ein gutes Nucleophil. Um eine Hydrolyse des Trichlortriazins (**7**) zu vermeiden, wird man vorzugsweise in nur leicht basischem bis neutralem Me-

dium arbeiten. Soll der Spacer in der zweiten Stufe eingeführt werden, ist aus den in der Erklärung zu Abb. 6 genannten Gründen die Reaktivität des verbleibenden Dichlortriazins schon erheblich abgesunken, so daß diese unerwünschten Reaktionen kaum mehr zu erwarten sind. Bei der zweiten und dritten Substitutions-Stufe kann daher, insbesondere in natriumchloridhaltiger Lösung, auch bei leicht erhöhten pH-Werten gearbeitet werden. So kann eine Protonierung der als Nucleophil eingesetzten Aminokomponenten vermieden werden.

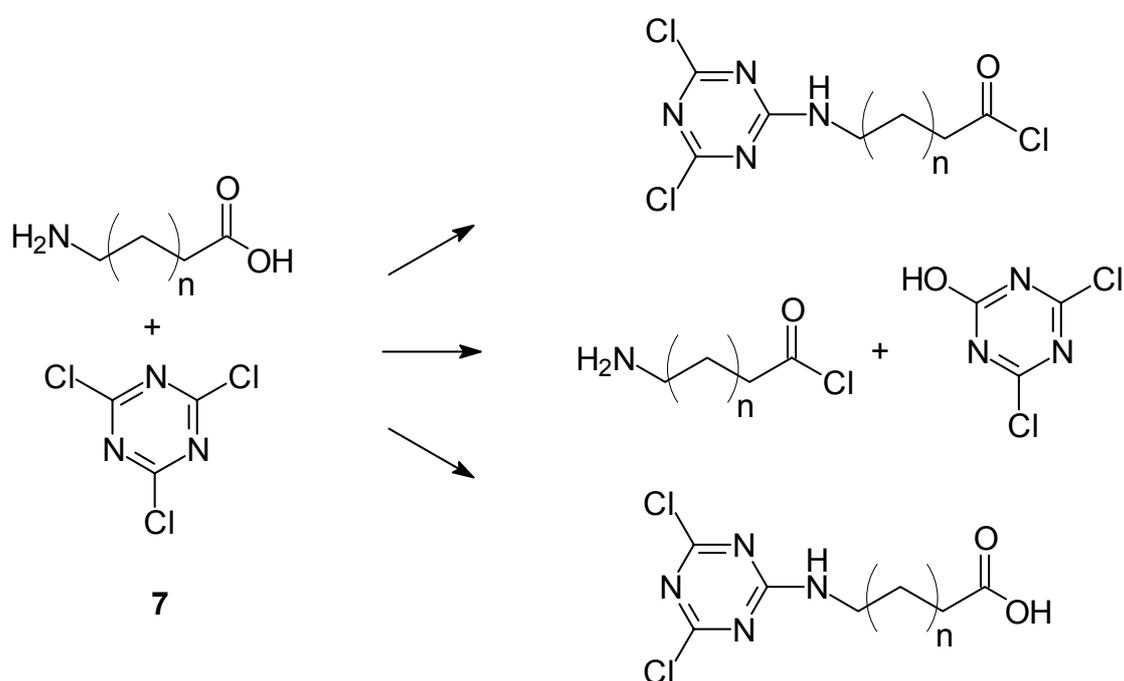


Abb. 14: Unerwünschte (oben, mitte) und erwünschte (unten) Reaktionen von Trichlortriazin mit Aminoalkylcarbonsäuren.

Bei *hetero*-bifunktionellen Linkern, die sowohl Amino- als auch Hydroxygruppen tragen, ist die Nucleophilie abgestuft. Daher sollte auch bei der direkten Reaktion mit Trichlortriazin eine Selektivität zugunsten der Substitution mit der Aminogruppe beobachtet werden können.

Um klären zu können, ob auf diese Weise die erwünschten Produkte herstellbar sind, wurden drei verschiedene Reaktionen durchgeführt, bei denen die Substitutionsreak-

tion am Cyanurchlorid (**7**) in der Reihenfolge Tyramin (**24**), Sulfanilsäure (**10**), Diaminostilbensulfonsäure (**8**) durchgeführt wurde.

Variante 1: Das Trichlortriazin wurde in möglichst wenig Aceton gelöst, die dreifache Masse eines Eis / Wasser / Natriumchlorid-Gemisches 5 : 5 : 3 zugegeben und zu dieser Mischung wurde ein Äquivalent Tyramin als 0.25 molare neutralisierte Tyramin-Hydrochlorid-Lösung gegossen. Unter Eiskühlung wurde die Reaktionsmischung durch Zugabe von Natriumcarbonat-Lösung neutral bis leicht sauer gehalten. Nachdem die zur Neutralisation der theoretisch freiwerdenden Menge Chlorwasserstoff gerade ausreichende Menge Natriumcarbonat-Lösung verbraucht war, ließ man noch 15 Minuten rühren. Analog dazu wurde eine neutrale wäßrige Natriumsulfanilat-Lösung 5 Stunden bei 35 °C und eine wäßrige di-Natriumdiaminostilbendisulfonat-Lösung bei 95 °C eingesetzt, wobei man das Aceton abdestillierte. Das orangefarbene Reaktionsprodukt wurde aus der abgekühlten, phosphatgepufferten Lösung mit Kaliumchlorid ausgesalzen, zur Entfernung von Alkalisalzen zweimal in der dreifachen Menge Wasser suspendiert, abfiltriert und abschließend aus einer Mischung aus Ethanol / DMF 9:1 umkristallisiert. Das intensiv gelbe Produkt zeigte im Dünnschichtchromatogramm zehn ineinander übergehende Banden. Nach Vergleich mit der als Edukt eingesetzten Diaminostilbendisulfonsäure waren nur Spuren dieser Substanz in der Probe enthalten. Die einzigen intensiv fluoreszierenden Banden wurden nach präparativer Dickschichtchromatographie zur weiteren Reinigung mittels HPLC untersucht. Nur eine Zone mit $R_f = 0.51$ konnte aufgetrennt werden. Dazu wurde eine Nitrilphase mit Acetonitril / Wasser-Acetrop und 50 mmolarem Phosphatpuffer pH 7.1 verwendet. Die isolierte Fraktion zeigte im Dünnschichtchromatogramm jedoch neben der ursprünglichen Zone noch zehn weiteren Komponenten, von denen sieben Zonen vorher nicht aufgetreten waren. Durch einen Vergleich mit den bis dahin verwendeten Lösungsmitteln und Reagenzien konnte eine Verunreinigung der Probe aus diesen Quellen ausgeschlossen werden.

Eine Modifikation dieser Variante, bei der die Substituenten nicht als neutrale Lösung sondern als Hydrochlorid und als Sulfonsäuren eingesetzt wurden und anstelle einer Natriumcarbonat-Lösung eine den variierten Edukten entsprechende Menge Natriumhydroxid-Lösung verwendet wurde, wies keine Vorteile auf.

Variante 2: Analog zu Variante 1 wurde bei 25 °C und einem pH-Wert von 8 sowie in der dritten Reaktionsstufe bei Siedetemperatur und einem pH-Wert von 10 gearbeitet. Das intensiv gelbe Produkt zeigte im Dünnschichtchromatogramm fünfzehn teilweise stark ineinander übergehende Banden. Eine intensiv fluoreszierende Bande mit $R_f = 0.55$, die in der Variante 1 aufgetreten war, wurde nicht beobachtet. Die einzige intensiv fluoreszierende Zone lag bei $R_f = 0.51$. Sie wurden nach präparativer Dickschichtchromatographie zur weiteren Reinigung mittels HPLC untersucht. Die so erhaltene, im UV-Licht intensiv gelb fluoreszierende Lösung bestand nach dem Dünnschichtchromatogramm jedoch neben der ursprünglichen Zone aus dreizehn weiteren Komponenten von denen fünf Zonen vorher nicht aufgetreten waren. Durch einen Vergleich mit den bis dahin verwendeten Lösungsmitteln und Reagenzien konnte eine Verunreinigung der Probe aus diesen Quellen ausgeschlossen werden.

Variante 3: Trichlortriazin wurde bei 0 °C in Aceton vorgelegt, ohne wie vorher mit Eis / Wasser / Natriumchlorid zu versetzen. Dadurch sollte eine höhere Konzentration der Reaktanden erreicht werden. Im weiteren Verlauf wurden analog den Varianten 1 und 2 die anderen Edukte unter pH-Kontrolle zugesetzt. Reaktionstemperatur war hier 55 °C und 100 °C. Ab und zu mußte etwas Wasser zugefügt werden, um eine rührbare Mischung beizubehalten. Das nach der schon zuvor beschriebenen Aufarbeitung erhaltene, intensiv gelbe Produkt zeigte im Dünnschichtchromatogramm mindestens dreizehn ineinander übergehende Banden, die teilweise kaum von den benachbarten Banden abzugrenzen waren. Nach präparativer DC und HPLC wurden zwei Fraktionen erhalten, die nach dem Dünnschichtchromatogramm jedoch aus fünf unterschiedlichen und neun unterschiedlichen Komponenten mit R_f -Werten von 0.44 bis 0.64 bestanden.

Im Ergebnis läßt sich festhalten, daß eine Nebenproduktärmere Reaktionsführung durch den Einsatz höher konzentrierter Reaktionsmischungen erreicht werden konnte. Der Einsatz nur wenig Wasser enthaltender Lösungsmittel kann sich ebenfalls positiv auswirken.

3.4.2 Untersuchungen zu modifizierten Synthesen von Diaminostilbentetrasulfonsäurederivaten

Wird, ausgehend von Trichlortriazin (7), ein Aufheller der Art 3 oder 22 hergestellt, muß am Ende der Synthese bei jeweils nicht quantitativ verlaufenden Reaktionsstufen mit einer Vielzahl von Nebenprodukten gerechnet werden. Auch in kommerziell angebotenen Produkten liegt der Farbstoffgehalt in der Regel bei etwa 85 Prozent, da eine pharmakologischen Ansprüchen genügende Reinheit für den Einsatz in der Papier-, Textil- und Waschmittelindustrie nicht erforderlich ist. Um die Löslichkeit der Flavonsäure (8) zu erhöhen, wird der Reaktionsmischung auch in großtechnischen Verfahren häufig Natriumchlorid, Harnstoff oder Natriumkaliumtartrat zugesetzt. Zusätzlich werden Benetzungsmittel und Entschäumer verwendet^[214-216]. Nach der meist unvollständigen Abtrennung der Salze und anderer leicht löslicher Komponenten aus der Farbstoffsuspension wird eine Gehaltsanalyse auf fotometrischem Wege durchgeführt. Eine weitere Reinigung wird dabei nicht ausgeführt. Die erhaltenen Produkte entsprechen dann "im wesentlichen" der jeweils angegebenen Strukturformel^[217]. Anschließend wird die Rohlösung auf Aktivsubstanzgehalte von 20 bis 30 % eingestellt, damit die ausgelieferten Produkte in standardisierter Weise eingesetzt werden können. Damit eine stabile Lösung oder Suspension mit gewünschter Farbstärke erreicht wird, werden nicht exakt bezeichnete Stellmittel zugesetzt.

Wird in wäßrigen Lösungsmitteln gearbeitet, tritt zusätzlich statt der gewünschten Substitution mit nucleophilen Gruppen der anderen als Substituenten am Triazin vorgesehenen Edukte auch Hydrolyse ein. Im Ergebnis liegt ein Gemisch von Substanzen vor, deren Polaritäten durch die in den Molekülen enthaltenen Sulfonsäuregruppen sehr hoch ist. Dabei liegen die Molmassen vieler dieser Stoffe eng beieinander. Chromatographische Verfahren nutzen aber gerade Unterschiede in Polarität, Molmasse oder Größe aus. So führten Trennversuche der Produktgemische an Sephadex nicht zum gewünschten Ergebnis. Weiterhin zeigte sich, daß einige optische Aufheller an das Sephadex gebunden wurden, so daß es für weitere Analysen nicht mehr verwendet werden konnte.

Die bei der Herstellung und Reinigung der Diaminostilbendisulfonate und Diaminostilbentetrasulfonate gemachten Erfahrungen decken sich mit Aussagen aus Pa-

tenten zu Herstellungsverfahren von Diaminostilbendisulfonaten, in denen folgendes Zitat zu finden ist: *“Sie enthalten jedoch, bedingt durch die Art ihrer Herstellung, noch Verunreinigungen und Nebenreaktionsprodukte, die störend wirken und deren Entfernung – wenn dies überhaupt gelingt – nur mittels zeitraubender Arbeit und unter Verlust an aktiver Verbindung möglich ist.”*^[218].

Das angesprochene Patent beschreibt daraufhin die Herstellungsverfahren von entsprechenden Disulfonaten, deren erfindungsgemäßer Vorteil gegenüber anderen Substanzen ist, daß sie sehr wenig wasserlöslich sind und daher leicht in reiner kristalliner Form erhalten werden können. Bei den dort beschriebenen Verbindungen handelt es sich im ω -Methoxy- sowie ω -Ethoxy-ethyl und -propyl-derivate von **3**, die wegen der herausgehobenen geringen Wasserlöslichkeit und wegen der nur kurzen Alkylkettenlänge für die Fragestellungen dieser Arbeit nicht relevant sind.

Es sollte daher weiterhin nach Möglichkeiten gesucht werden, die Bildung von Nebenprodukten einzuschränken, um aufwendige und wenig Erfolg versprechende Reinigungsversuche zu vermeiden. Dabei kommt der Hydrolyse eine Schlüsselrolle zu. Die erste Überlegung war, die Synthesen nicht wie üblich als „Eintopfsynthese“ durchzuführen, sondern die Produkte der einzelnen Reaktionsschritte vor der nächsten Substitution abzutrennen. Einem nicht vollständigen Umsatz des Trichlortriazin (**7**) im ersten Reaktionsschritt sollte man bei einer solchen Reaktionsführung durch im Überschuß eingesetzte Reaktionspartner entgegenwirken können. Bei der üblichen Syntheseführung ist das nicht möglich, da überschüssige, im ersten Reaktionsschritt nicht umgesetzte Nucleophile im zweiten Reaktionsschritt mit dem dann zugesetzten anderen Edukt konkurrieren. Wird Trichlortriazin (**7**) im Überschuß angewendet, treten weitere Schwierigkeiten auf. Es greift beide Seiten von α,ω -homobifunktionellen Spacern an, bildet mit Carbonsäuren Säurechloride, die in der nächsten Reaktion mit den dann zugesetzten Nucleophilen reagieren, oder bildet in Ermangelung anderer Nucleophile mit der Aminogruppe der Flavonsäure tertiäre Amine. Deshalb wurde Trichlortriazin (**7**) bei 0 °C mit Bezug auf die in den anderen Edukten vorhandenen Aminogruppen mit einem zweifachen Überschuß an a) Flavonsäure (**8**), b) 1,12-Diaminododecan (**27**) und c) ω -Aminoundecansäure (**26**) umgesetzt (Abb. 15). Im weiteren Verlauf der geplanten Synthesen sollte **36 a** nochmals

mit Trichlortriazin (**7**) zur Bis-dichlortriazinylaminostilbendisulfonsäure umgesetzt werden. Die angestrebten Produkte **36 b** und **c** sollten als Edukte für anschließende Kondensationen mit Sulfanilsäure (**10**) und Diaminostilbendisulfonsäure (**8**) dienen.

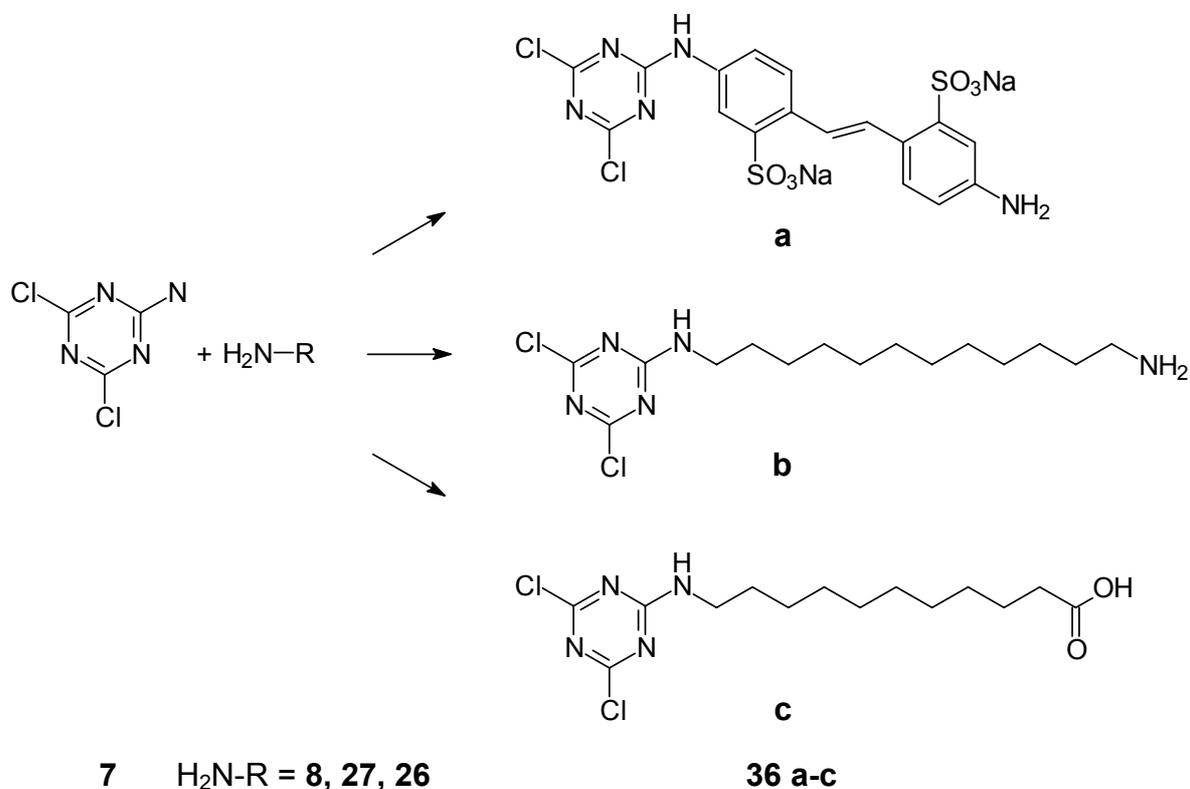


Abb. 15 : 2-Aminoalkyl-4,6-dichlortriazine und 2-Aminoaryl-4,6-dichlortriazine als mögliche Vorstufen für die gezielte Synthese Spacer-substituierter Diaminostilbene.

Dabei bildeten sich hellgelbe (a) und weiße (b, c) Suspensionen. Die Sulfonsäure-/Carbonsäurederivate **36a** und **36c** konnten durch Zugabe von Salzsäure und mit Kaliumchlorid aus phosphatgepufferter Lösung gefällt werden. Beide Fällungsmethoden wurden angewandt, um möglicherweise auftretende Unterschiede im Hinblick auf die Reinigung beobachten zu können. Die Fällungsmethode hatte jedoch keinen Einfluß auf die Reinheit der abschließenden Produkte. Die im Versuch b) erhaltene Suspension wurde direkt durch Filtration vom Lösungsmittel befreit. Die noch feuchten, pastösen Produkte wurden in Aceton (a, b) oder nacheinander in Aceton und Ether (c) suspendiert, um nicht umgesetztes Triazin (**7**), dessen Hydrolyseprodukte und die Aminoalkylverbindungen zu entfernen. Der aus dem Ansatz b) erhaltene Feststoff konnte nur in Dichlormethan und Chloroform gelöst werden und erwies sich nach

res orangerotes Produktgemisch aus dreizehn Komponenten, die im Dünnschichtchromatogramm mit dem oben angegebenen ternären Laufmittel R_f -Werte zwischen 0.00 und 0.50 hatten.

Wasser ist wegen der zu erwartenden Hydrolyse der Chlortriazine und wegen der maximalen Temperatur des Reaktionsgemisches von 100 °C kein ideales Lösungsmittel für die hier beschriebenen Synthesen. Weiterhin lösen sich die hier verwendeten funktionalisierten Derivate langkettiger Kohlenwasserstoffe oft nur unzureichend oder gar nicht in Wasser. Nach den oben beschriebenen Erfahrungen sollten deshalb Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische untersucht werden, in denen sich die gewünschten Reaktionen unter Vermeidung der Hydrolyse durchführen lassen. Angestrebt wurden nicht-wässrige oder nur geringe Mengen Wasser enthaltende Lösungsmittelgemische, deren Einzelkomponenten zwar jeweils mindestens eins der Edukte zu lösen vermögen, in denen die gebildeten Produkte aber unlöslich sind. Als Lösungsmittel wurden DMSO, Dioxan, Toluol, Aceton sowie Mischungen daraus verwendet. Toluol fungiert hierbei als Lösungsvermittler, da Dioxan / DMSO-Systeme ein ausgedehntes Zweiphasengebiet haben. Als Basen wurden sowohl Tributylamin als auch Tripropylamin verwendet, um einerseits möglichst hohe Temperaturen verwirklichen zu können und andererseits auch die von C_{11} / C_{12} -Kohlenwasserstoffen abgeleiteten Edukte besser in Lösung bringen zu können, als dies mit den C_1 - oder C_2 -Aminen möglich ist. Pyridin kam sowohl als Base als auch als Lösungsmittel in Betracht. Es bildete in den Reaktionsmischungen aber nahezu augenblicklich tief orangefarbene, flockige, unlösliche, sich zu festen Klumpen verbindende Niederschläge, die einen Fortgang der Reaktion unterbanden.

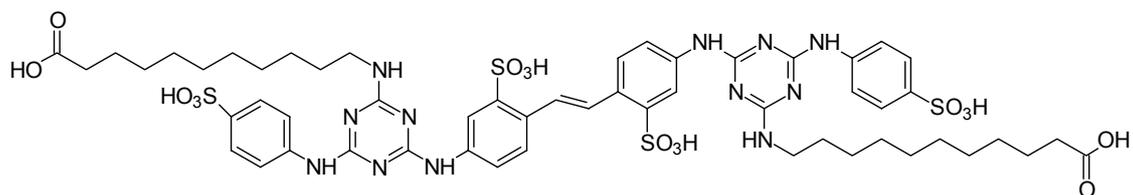
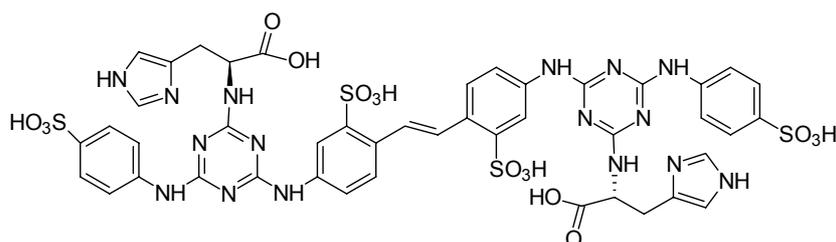
Weiterhin verwendete man Mischungen aus DMSO und DMF, die sowohl die benötigten Temperaturen erlaubten, als auch ein gutes Lösungsvermögen gegenüber den Edukten zeigten. In weiteren Variationen wurde das Trichlortriazin auch hier in Aceton vorgelegt und während der weiteren Reaktion abdestilliert.

Um die Konzentration der Reaktionsmischung möglichst hoch zu halten, wurde dabei, ähnlich wie bei einer Umkristallisation, zum Beginn jeweils nur wenig Lösungsmittel verwendet. Erst nachdem die erwünschte Temperatur der Reaktionsmischung erreicht war, wurde so lange Lösungsmittel zugegeben, bis sich eine gut rührbare

Suspension ergab. Diese Lösungsmittelzugabe erniedrigte zwar wieder die Konzentration, war aber besonders vor der Zugabe der Hydroxid- oder (Hydrogen-) Carbonat-Lösungen notwendig, um eine schnelle Vermischung der Lösungen in der vorher breiartigen Mischung zu gewährleisten. Wurden die Basen als verdünnte Lösungen zugegeben, lösten sich die Niederschläge bei höherer Temperatur häufig auf. Um das Reaktionsvolumen möglichst klein zu halten, wurden nach diesen Beobachtungen konzentriertere Lösungen und die ungelösten Hydroxide und (Hydrogen-) Carbonate eingesetzt. Die Mischungen wurden zum Abschluß der Reaktion langsam in die 30fache Menge trockenen, stark gerührten Diethylether eingetropfelt. Die Produkte fielen dabei teilweise als lockere körnige Pulver aus, die sich am Boden sammelten, in anderen Fällen schieden sie sich zähflüssig an der Wand der Gefäße ab. Um vor der Reinigung sagen zu können, ob die gesuchte Substanz Bestandteil des Reaktionsproduktes war, wurden die Produkte der Diaminostilben-tetrasulfonsäurederivate von Tyramin, Histidin, 1,6-Diaminohexan und 1,12-Diaminododecan massenspektrometrisch untersucht. Aus den Schmelzpunkten der Verbindungen (die nicht vollständig gereinigten Produkte haben Schmelzpunkte von 270 bis 380 °C) wird einerseits ihr geringer Dampfdruck und andererseits ihre hohe Stabilität deutlich. Zusammen mit den immer auch vorhandenen Alkalisalzen liegen hier Proben vor, die in einzelnen Verfahren (FAB) besonders schwierig zu ionisieren sind. Dabei erhielt man im ESI (pos. und neg. Modus) im Bereich bis etwa 280 u/z linienreiche Spektren mit Peaks geringer Intensität, die den Zielstrukturen, ihren unterschiedlichen möglichen Salzen oder Fragmenten nicht zuzuordnen waren. Weder durch ESI noch durch FAB konnten letztlich Massenspektren erhalten werden, die Peaks der Molekülonen oder plausibler Fragmente zeigte. Insgesamt konnten durch Reaktion in DMSO und DMF sowie Mischungen dieser Lösungsmittel die Zielmoleküle nicht erhalten werden.

Die Synthese der gewünschten Verbindungen gelang nach Bewertung der Dünnschichtchromatogramme recht nebenproduktarm, als nacheinander das Diaminostilben, die entsprechenden bifunktionellen Substituenten bzw. Aminosäuren und abschließend 4-Aminobenzolsulfonsäure **10** mit dem Triazin **7** zur Reaktion gebracht wurde.

Syntheseeziele bei dieser Variante waren außer dem Tyraminderivat **41** folgende Substanzen:

**38****39****40**

Ein beispielhaftes Syntheschema ist auf der nächsten Seite als Abb.15 skizziert. Die Kürzel a), b) und c) an den Reaktionspfeilen des Schemas entsprechen:

a) Aceton, 0 °C; Zugabe der entsprechenden Menge 0.1 mol Natriumhydroxid-Lösung innerhalb einer halben Stunde

b) Ohne Austausch des Lösungsmittels wurde der zweite Kopplungspartner zugefügt und drei Stunden bei 35-40 °C gerührt. Innerhalb dieser Zeit wurde die entsprechende Menge 0.1 molarer Natriumhydroxid-Lösung zugesetzt.

c) Das Aceton wurde im Vakuum abdestilliert, das während der ersten beiden Reaktionsschritte zugesetzte Wasser verblieb in der Reaktionsmischung. Der jeweils dritte

Kopplungspartner wurde in einer Suspension in Dioxan zugesetzt. Bei den Reaktionen, in denen die Spacerkomponenten in der ersten Stufe eingesetzt wurden, war die den Sulfonsäuregruppen entsprechende Menge festes Natriumhydroxid sofort zugegeben worden. Die innerhalb des letzten Kopplungsschrittes entstehende Menge Salzsäure wurde in der Siedehitze der Reaktionsmischung innerhalb von fünf Stunden durch Zugabe der entsprechenden Menge Natriumhydroxid neutralisiert.

Da Sulfanilsäure (**10**) in wässriger Salzsäure löslich ist, kann sie nach der letzten Stufe abgetrennt werden, indem die Produkte in eiskalter Salzsäure gefällt und von der überstehenden Lösung abgetrennt werden. Das erlaubt auch die vorteilhafte Verwendung von überschüssiger Sulfanilsäure **10** im letzten Substitutionsschritt.

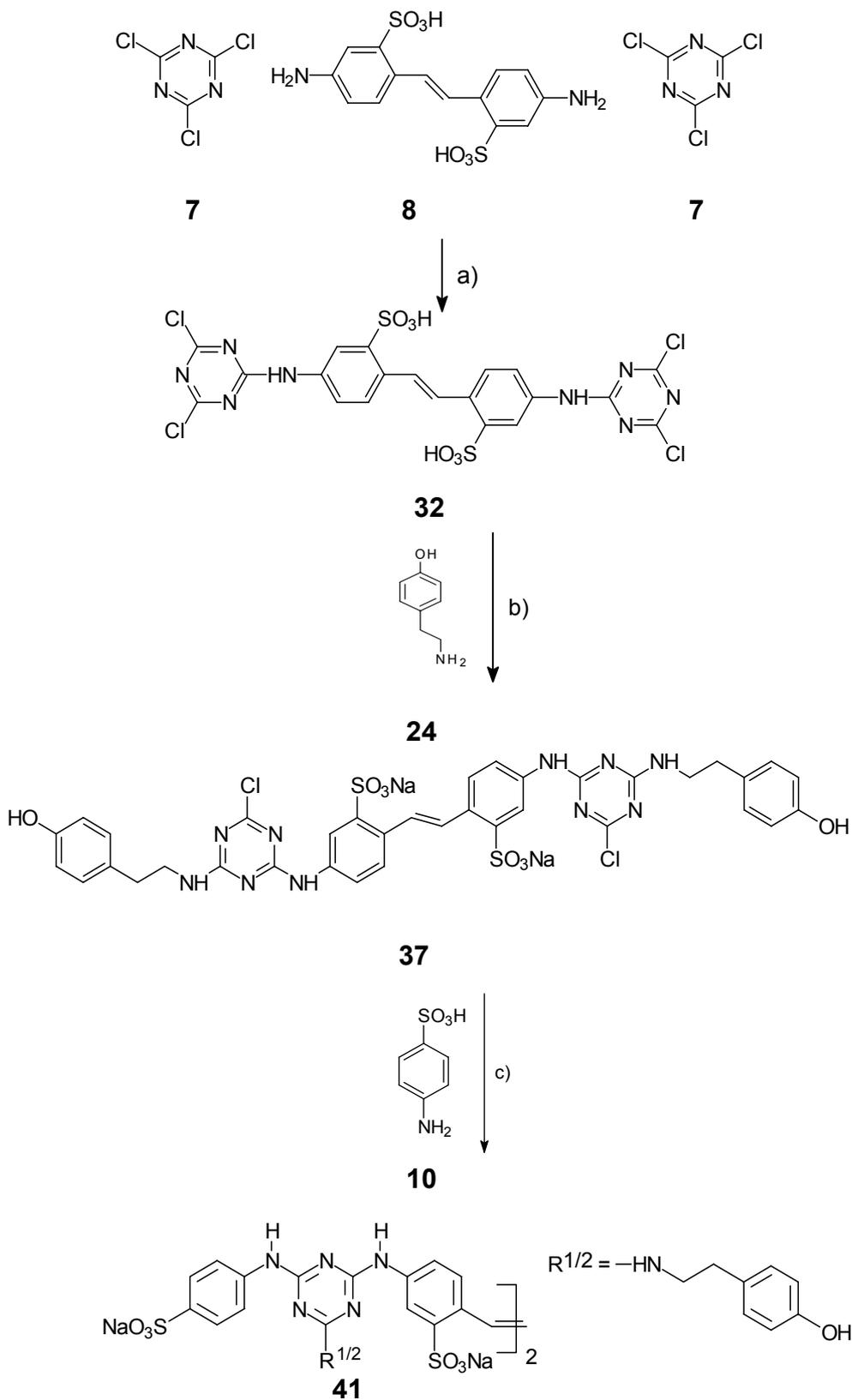
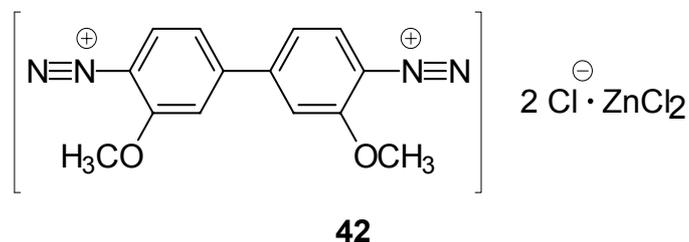


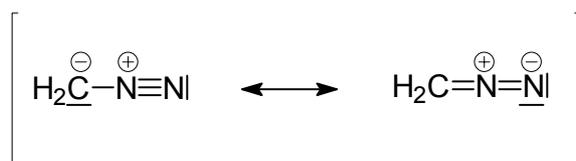
Abb. 15: Beispiel für ein Syntheschema zum Aufbau von Spacer-substituierten Diaminostilbentetrasulfonsäurederivaten. Details siehe Text.

Um schon während der Reaktion die Substitution des Dichlortriazins mit Tyramin **24** verfolgen zu können, wurden die entwickelten DC-Karten mit einer wäßrigen Echtblausalz **42** / Natriumhydroxid-Lösung besprüht.



Dabei konnte festgestellt werden, daß die vormals fluoreszierende Zone eine dunkelblaue Farbe annahm. Das Bis-dichlortriazinylstilben ist selbst kein Reaktionspartner im Sinne einer Azokupplung mit **42**. Erst mit der Einführung der Phenolgruppierung findet **42** im neu gebildeten und bereits deutlich fluoreszierenden Stilbenderivat einen geeigneten Kupplungspartner. Die Blaufärbung nach der Behandlung mit **42** ließ demnach auf eine tatsächlich vollzogene Substitutionsreaktion des Bis-dichlortriazinylstilbens mit Tyramin schließen. Weiterhin konnte diese Reaktion dazu benutzt werden, die der Reaktionsmischung zugesetzte Base nicht nach den theoretischen Berechnungen zu bemessen oder abzuwarten, bis keine zusätzliche Base mehr verbraucht wird, sondern sie gezielt nach der freigesetzten Menge Chlorwasserstoff zuzusetzen. Beide Vorgehensweisen bergen die Gefahr der Überdosierung und damit der Hydrolyse. Vielmehr kann so die Reaktion an der Abnahme des Eduktes verfolgt werden.

Um die gelungene Substitution der Dichlortriazin-Komponente mit der Aminoundecansäure schon vor der Reinigung und Charakterisierung zu bestätigen, wurde ein entwickeltes Dünnschichtchromatogramm einer Probe des Rohproduktes mit einer Lösung von Diazomethan (**43**) in Diethylether behandelt, um 90° gedreht und nochmals entwickelt.

**43**

Nur zwei Spots waren nach der zweiten Entwicklung nicht auf der Diagonalen wiederzufinden. Weiterhin zeigten diese eine stark ins gelbliche verschobene Fluoreszenz. Diese Beobachtung kann folgendermaßen interpretiert werden: Diazomethan kann eine Vielzahl von Reaktionen eingehen, die häufig zur Methylierung verschiedener funktioneller Gruppen genutzt werden, und auch zur Bildung unterschiedlicher zyklischer Systeme führen kann. Setzt man Diazomethan-Lösungen in verdünnter Lösung ein und läßt nur kurz reagieren, können Carbonsäuren selektiv methyliert werden. Auf dieser Reaktion beruht die oben beschriebene Anwendung. Für die Fluoreszenz der Produkte ist der Diaminostilben-Chromophor maßgeblich. Wären neben der Methylierung der Carbonsäuregruppen zusätzlich die Doppelbindung des Stilbens angegriffen worden, wäre damit auch die Fluoreszenz des Produktes unterbunden worden. Da nach der Behandlung mit Diazomethan keine zusätzlichen, nicht fluoreszierenden Produkte beobachtet werden konnten, ist davon auszugehen, daß diese Reaktion nicht eingetreten ist. Wären in anderen Molekülteilen z. B. Ringschlußreaktionen eingetreten, hätte mit großer Wahrscheinlichkeit bei mehr als zwei Zonen eine Veränderung beobachtet werden können. In Kenntnis der Reaktionsmöglichkeiten des Diazomethans können die oben geschilderten Beobachtungen also dazu dienen, die Substitution der Dichlortriazin-Komponente mit der Aminoundecansäure zu beobachten und zu bewerten.

Aus beiden Kontrollfärbungen kann für die jeweiligen Reaktionen noch eine weitere Information erhalten werden. Da von den angestrebten Substanzen keine Referenzmaterialien vorhanden waren, mußte aus der Vielzahl der im Dünnschichtchromatogramm erscheinenden Zonen diejenigen identifiziert werden, die den gewünschten einfach oder zweifach mit dem Linker substituierten Triazinylaminostilbenen entsprachen. Schon die nur mit Trichlortriazin substituierten Diaminostilbene zeigen eine auffällige Fluoreszenz. Weiterhin ist die Farbe und Farbintensität der verschiedenen Produkte und Nebenprodukte recht vielfältig. Das geübte menschliche Auge kann zwar den Farbwert einer Substanz auf einige Nanometer genau differenzieren, eine Zone im Dünnschichtchromatogramm kann dahingegen schon dann als intensiv farbig erscheinen, wenn nur Spuren des Farbstoffes vorliegen. In unterschiedlicher Weise fehlsubstituierte Produkte und andere Nebenprodukte lassen sich also nicht eindeutig nur durch die R_F -Werte, Farbe und die Fluoreszenz identifizieren. Die ange-

gebenen Färbemethoden waren deshalb sehr hilfreich und zeitsparend, weil man die nach den ersten Aufarbeitungsschritten erhaltenen Rohprodukte nach einer Vortrennung durch z. B. präparative Dickschichtchromatographie gezielt auswählen und weiterverarbeiten konnte.

Reaktionen ohne Lösungsmittel

Durch den Einsatz flüssiger oder unterhalb 150 °C schmelzender Reaktionspartner konnte bei einigen Syntheseversuchen ganz auf Lösungsmittel verzichtet werden. So wurde das vorhandene Blankophor-Vorprodukt mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan **29**, 1,6-Diamonohexan, Polyethylenglycol der mittleren Molmasse 600 (entsprechend 13 bis 14 CH₂-CH₂-O-Einheiten) und 1,12-Dihydroxydodecan direkt zur Reaktion gebracht. Die Reaktion mit der zuletzt genannten Verbindung wurde in verschiedenen Ansätzen mit wäßriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, wäßriger Natriumhydroxid-Lösung bzw. mit Tributylamin als Base durchgeführt. Bei den α,ω -Diaminokomponenten konnte dabei auf den Zusatz einer Base verzichtet werden.

Ein ähnlicher Weg wurde auch für die Synthese des Tyramin-Derivates beschrieben. Hier wurden allerdings etwas drastischere Bedingungen benötigt. Tyramin **24** schmilzt bei ca. 160 °C, wobei nicht von einer sofortigen Zersetzung der Substanz ausgegangen werden muß. Aus diesem Grunde erschien es möglich, die Blankophor-Vorstufe **6** direkt mit Tyramin in Gegenwart eines Säurefängers zusammenzuschmelzen. Dabei wären dann einerseits die zur Reaktion benötigten Temperaturen erreichbar, und weiterhin sind in einer Schmelze durch die notwendigerweise fehlende Verdünnung die Konzentrationsverhältnisse für Reaktionen besonders günstig. Durch einen Überschuß an Tyramin sollte es obendrein möglich sein, die Reaktionsgeschwindigkeit hoch zu halten und Verluste durch Pyrolyse dieses Eduktes auszugleichen. Um zur freien Base des Tyramins zu gelangen, wurden äquimolare Mengen Tyramin-Hydrochlorid und Natriumhydroxid sehr fein miteinander verrieben und bis zur beginnenden Erweichung des Gemisches in einem Porzellantiegel erhitzt, wobei schon eine deutliche Orangefärbung auftrat. Man ließ dieses Gemisch erkalten, pulverisierte es und mischte es innig mit einem Zehntel der moläquivalenten Menge des Farbstoffes. Nach dem vorsichtigen Schmelzen dieses Gemisches im Porzellantiegel mit einem Heißluftgebläse konnten jedoch neben überwiegend dun-

kelbraunen bis schwarzen Zersetzungsprodukten nur geringe Mengen an Produkten festgestellt werden, unter denen sich auch die gewünschten Produkte befunden haben könnten. Eine Reinigung des Reaktionsgemisches war aufgrund der Vielzahl der Produkte und deren sehr breitem R_f -Werte-Bereich nicht möglich.

Um die bei den Syntheseversuchen in der Schmelze beobachtete Zersetzung der Edukte zu vermeiden, wurde eine Mischung aus dem Monochlortriazin **6** und 10 Äquivalenten Tyramin-Hydrochlorid in einem Gemisch aus DMSO und Tributylamin in ein dickwandiges Reagensglas eingeschmolzen und 17 Stunden lang auf 110 °C erhitzt. Hier konnte keines der erwünschten Produkte erhalten werden.

Als weitere Variation der Syntheseführung wählte man Tripropyl- und Tributylamin als Base aus, die gleichzeitig auch als Lösungsvermittler für die eingesetzten Spacermoleküle dienten. Dabei wurde auch weiterhin DMSO / DMF als Lösungsmittel benutzt. Da sich hier die Basen nahezu nicht mit dem Lösungsmittel mischen, wurde mit Toluol eine dritte Komponente hinzugefügt, in der sich sowohl DMSO als auch die Amine lösen. Pro Gramm Blankophor-Vorstufe wurden dem Reaktionsgemisch 20 mg Tetrahexylamonium-Iodid zugefügt, dessen Iodid-Ion in der bekannten Weise durch nucleophile Katalyse die Substitution am Triazinring beschleunigen sollte. Die Reaktionen wurden in der Siedehitze der Reaktionsmischung durchgeführt, brachten aber im Bezug auf die Menge und die Anzahl der entstandenen Produkte keine Verbesserung zu den vorher durchgeführten Experimenten.

3.4.3 Syntheseveruche an Harzen

Die Trennung der innerhalb dieser Arbeit erhaltenen Produkte soll dadurch erleichtert werden, daß eines der Edukte an einem Träger gebunden vorliegt. Hierzu benötigte man ein Harz, dessen Oberfläche möglichst vollständig zugänglich ist und welches Gruppen trägt, die einen Anknüpfungspunkt für die zu verwendenden Linker bereitstellen. Aus dem Bereich der Peptid- und RNA- / DNA-Synthese ist eine Reihe von speziellen Harzen und Linkersystemen bekannt, die zum Teil auch kommerziell erhältlich sind. Sie sind teuer, wenn auch theoretisch wiederverwendbar. Eine Alternative dazu wurde mit dem folgenden Syntheseveruch überprüft, bei dem der stark saure Ionenaustauscher Amberlyst 15 Verwendung fand.

Amberlyst 15 ist ein makroporöses Harz, welches seine Austauschereigenschaften über an das Harz gebundene Sulfonsäuregruppen erhält. Es ist in wässrigen und besonders auch in nicht wässrigen Lösungsmittelsystemen einsetzbar. Dieses Harz wurde nach der üblichen Methode mit Thionylchlorid / DMF in die Sulfonsäurechloridform übergeführt und anschließend jeweils zweimal mit Toluol, einmal mit Benzol überschichtet und zum Sieden erhitzt, um das restliche Thiolychlorid zu entfernen.

Bei der anschließenden Umsetzung mit 1,6-Diaminohexan zu den entsprechenden Sulfonsäureamiden waren grundsätzlich zwei Wege denkbar:

- 1) Beide Aminogruppen des Linkermoleküls reagieren mit dem Sulfonsäurechlorid
- 2) Nur eine Aminogruppe des Linkermoleküls reagiert mit dem Sulfonsäurechlorid

Im stark basischen Milieu wird sicherlich Variante 1) begünstigt. Im nur schwach basischen bis neutralen Bereich wird die zweite Variante begünstigt sein, da hier die eine Aminogruppe des Linkers als Nucleophil und die andere als Base an der Reaktion beteiligt sein wird.

Hohe Konzentrationen des Diaminohexans begünstigen aus statistischen Gründen zwar einerseits die Reaktion nur einer Aminogruppe, erhöhen aber andererseits den pH-Wert. Für geringe Konzentrationen können entsprechende Überlegungen angestellt werden. Man entschied sich für eine geringe Konzentration an Diaminohexan, da im Harz sicherlich keine Reaktionsbedingungen wie in normalen Lösungen vorzusetzen sind und daher die Konzentration der Lösung nicht mit der Konzentration in den Poren des Harzes gleichgesetzt werden kann.

Entsprechend den 1.6 val/ml und einer Dichte des trockenen, noch nicht in das Sulfonsäurechlorid überführten Harzes von 0.6 g/ml wurden 2.7 mmol Diaminohexan pro Gramm Harz eingesetzt, die in Wasser als Lösungsmittel langsam so zugesetzt wurden, daß die Reaktionslösung immer schwach basisch blieb. Nach beendeter Zugabe wurde noch eine halbe Stunde weiter zum Sieden erhitzt und anschließend dreimal mit Wasser ausgekocht.

Da Sulfonsäureamide gegen basische Hydrolyse stabil sind, konnte der Kopplungsschritt an das Blankophor-Vorprodukt (**6**) wie üblich im Basischen durchgeführt werden.

Die Reaktion wurde in drei verschiedenen Lösungsmittel / Base-Systemen jeweils bei Siedehitze durchgeführt. In Wasser / 0.1 mol Natriumhydroxid-Lösung bzw. DMSO / Triethylamin wurde nach der Zugabe des Chlortriazin-Derivates die entsprechende Base langsam so zugegeben, daß die Lösung bzw. bei DMSO eine mit Wasser verdünnte Probe der Reaktionslösung basisch reagierte. In diesem Lösungsmittel kam die Reaktion jedoch sehr schnell zum Erliegen. Bei dem Lösungsmittel-Base-System DMSO / Pyridin 1:1 wurde das Chlortriazin-Derivat innerhalb einer halben Stunde zugegeben. Jedoch bildete sich hier fast augenblicklich nach der Zugabe des Farbstoffes ein tief orangefarbener Schleim um das Harz, der sich nicht mehr lösen ließ.

Die Harze der ersten beiden Ansätze wurden anschließend von den Lösungen abfiltriert und fünfmal mit Wasser ausgekocht.

Für die Trennung der Sulfonamide vom Harz wurde in konzentrierter Salzsäure zum Sieden erhitzt. Da die Produkte bei diesen Bedingungen aber unlöslich sind, mußte abwechselnd mit Säure und zum Herauslösen der Produkte mit Natronlauge gearbeitet werden. Bis die erhaltenen Lösungen nicht mehr fluoreszierten, vergingen bei dieser Prozedur drei Tage. Man erhielt eine im UV (366 nm) mäßig fluoreszierende Lösung, die nur Spuren einer nicht identifizierbaren Verbindung enthielt. Die Interpretation dieser Beobachtung kann zwei Aspekte aufgreifen. Zum einen kann die Anfangsentscheidung, nur zur aktivierbaren Sulfonsäure äquivalente Mengen Diamin eingesetzt zu haben, falsch gewesen sein. Zum anderen kann ein Produkt, so es entstanden sein sollte, durch den lange dauernden Kontakt mit alkalischer Lösung hydrolytisch zersetzt worden sein. In einer Abwandlung dieses Experimentes wurde bei halber Harzmasse aber gleicher Masse Diamin ebenfalls keine dem Zielmolekül entsprechende Substanz isoliert.

3.5 HSCCC

3.5.1 Einführung

Das Trennprinzip der HSCCC (High Speed Counter Current Chromatographie) beruht auf der unterschiedlichen Verteilung verschiedener Substanzen in den beiden Phasen eines zweiphasigen Lösungsmittelsystemes. Solche Verteilungsgleichgewichte werden apparativ in Craig-Apparaturen und im Labor standardmäßig beim sogenannten Ausschütteln im Scheidetrichter ausgenutzt. In einer Counter Current Chromatographie-Apparatur ist ein beidseitig offener Schlauch in der Form einer archimedischen Schraube gewickelt und zusammen mit einem variablen Gegengewicht drehbar auf einem exzentrisch gelagerten Rotorteller befestigt. Die Länge des als Coil bezeichneten, eng gewickelten Teflonschlauches beträgt üblicherweise einige 10 bis zu 150 Meter. Bei dem hier benutzten Gerät sind mehrere unterschiedlich lange Schläuche gleichzeitig auf eine Spule gewickelt worden. Sie können einzeln benutzt, aber auch zusammengeschlossen werden. Dadurch kann das nutzbare Volumen und damit die maximal bei einer Trennung zu bearbeitende Substanzmenge auf einfache Weise variiert werden.

Tab. 3: HSCCC-Coil-Volumen und empfohlene maximale Probenmengen

Coil-Volumen [ml]	15	80	230	325	400
Maximale Probenmenge [mg]	20	100	500	1000	2000

Von einem Motor angetrieben, wird der Schlauch, im übertragenen Sinne die Trennsäule, um die zentrale Achse des Tellers gedreht und rotiert synchron planetenartig um die eigene Achse. Wird die Säule mit **einer** Flüssigkeit gefüllt, wandert sie nun entsprechend dem Prinzip der archimedischen Schraube zum „Kopfende“. Wird die Säule mit **zwei** Flüssigkeiten gefüllt, die ein stabiles Zweiphasensystem ausbilden und ist die Säule am Schwanzende verschlossen, so reichert sich die leichtere Pha-

se am „Kopfende“ an. Die schwerere Phase konzentriert sich am „Schwanzende“. Dieser Effekt wird durch die Unterschiede der Dichten beider Phasen hervorgerufen. Die Geschwindigkeit seines Auftretens wird maßgeblich durch Parameter wie Viskosität und Grenzflächenspannung beeinflusst. Dieser Effekt kann auch beim „Ausschüteln“ im Scheidetrichter beobachtet werden: Während sich manche Lösungsmittelsysteme fast augenblicklich entmischen, müssen andere über Stunden ruhen. Als Trennmedium wird ein Zweiphasengemisch ausgewählt, in dem die zu trennenden Substanzen möglichst unterschiedliche Verteilungskoeffizienten aufweisen.

Bei HSCCC-Apparaten ist die Spule nicht verschlossen. Das Auslaufen der Flüssigkeit wird dadurch verhindert, dass ständig vom Schwanzende Flüssigkeit nachgepumpt wird. Bei entmischten Phasen, auch in einer normalen archimedischen Schraube, würde diese gegenläufige Bewegung beider Phasen wegen der geringen Grenzfläche nur einen ebenfalls geringen Trenneffekt bewirken. Durch die oben angedeutete exzentrische Lagerung der Säulenwicklung rotiert die Spule jedoch nicht nur um die zentrale Achse des Tellers, sondern bei jeder Umdrehung um die Zentriachse ebenfalls auch einmal um die eigene Achse. Bei jeder Rotation ist jedes Schlauchsegment daher einmal nahezu im Zentrum und einmal am äußeren Rand dieses planetoiden Systems. Durch die somit ständig wechselnde Lage im zentrifugalen Kraftfeld wirken daher auf ein bestimmtes Schlauchsegment ebenfalls ständig wechselnde Gravitationskräfte. Bei kleinen g-Kräften fließen die beiden Phasen langsam aneinander vorbei, während sich bei hohen g-Kräften hohe lokale Strömungsgeschwindigkeiten mit starken Turbulenzen ergeben. Auf diese Weise wird das gesamte Lösungsmittelvolumen in Abhängigkeit der Rotordrehzahl 850-1200 mal in der Minute gemischt und wieder entmischt.

Tab. 4 : HSCCC-Coil-Volumen und empfohlene Umdrehungszahlen.

Coil-Volumen in ml	15	80	230	325	400
Drehzahl maximal in U /min	1200	1000	950	900	850

Im apparativen Verfahren läßt sich die Trennleistung dadurch steigern, daß man ständig vom "Schwanzende" her diejenige Phase (A) nachliefert, die normalerweise das "Kopfende" verlassen würde. Wird diese Pumprate der Dichte und damit der Austrittsbestrebung der anderen Komponente (B) angepaßt, verbleiben über 80 % der Phase B als stationäre Phase in der Spule. Phase A wird fortwährend durch frisches Medium ersetzt. Im Idealfall verteilen sich die Komponenten der zu trennenden Probe perlenschnurartig entlang der Schlauchlänge. Um sie von der Säule zu eluieren, gibt es zwei Varianten: Läßt man den Rotor und den Zufluß weiter laufen, werden die Substanzen abhängig von ihrer Löslichkeit in der mobilen Phase A nach und nach das Kopfende erreichen. Schaltet man den Rotor ab, läßt sich die gesamte Säulenfüllung inklusive stationärer Phase verdrängen und fraktionieren. Bei ausreichend vorangeschrittener Trennung ist die zweite Variante wesentlich schneller und kosteneffektiver.

3.5.2 Lösungsmittelauswahl und Trennversuche

Die zur Trennung verwendeten Lösungsmittelsysteme werden zunächst so ausgewählt, daß entweder für die rein zu erhaltene Substanz oder aber mindestens eine der abzutrennenden Substanzen das beste Lösungsmittel gesucht wird. Danach wird ein weniger polares und stärker polares Lösungsmittel ausgewählt. Stehen für ein Lösungsmittelsystem genauere Angaben über dessen Temperaturstabilität zur Verfügung, kann dem oben angesprochenen System systematischer begegnet werden. Man kann nun eine temperaturstabile Zusammensetzung wählen und gleichzeitig einen weiteren Parameter beeinflussen. Je nachdem, ob eine Nebenkomponeute abgetrennt oder aber die Hauptkomponente gereinigt in der Trennschleife zurückbleiben soll, kann innerhalb des genauer bekannten, stabilen Zwei-Phasen-Bereiches eine Lösungsmittelzusammensetzung gewählt werden, die einen besonders hohen Anteil von einem der drei (oder vier) Lösungsmittelkomponenten enthält.

Um sich für ein Lösungsmittelgemisch bzw. für ein zwei Phasen bildendes Lösungsmittelsystem zu entscheiden, mußten mehrere Überlegungen nachvollzogen werden. Außer in basischen wäßrigen Lösungsmitteln sind die zu untersuchenden Substanzen kaum löslich. Ausnahmen stellen DMSO und in der Hitze DMF dar. Man ging

also von diesem „besten Lösungsmittel“ Wasser aus und suchte nach weiteren Lösungsmitteln, die in der Lage sind, ein ausreichendes, aber nicht zu extremes Verteilungsverhältnis der Probensubstanz zu gewährleisten. Hilfreich war eine Arbeit von Foucault und Chevolot, in der ein systematischer Zugang zu solchen Lösungsmittelsystemen beschrieben wird^[219]. Für ansonsten schwer lösliche Verbindungen wird in diesem Artikel ein sogenanntes Typ 0 System aus Wasser, DMSO und THF vorgeschlagen (WDT-System). Obwohl Mischungen von jeweils nur zwei dieser Komponenten keine zwei Phasen ausbilden, liegt mit der oben angegebenen Mischung ein in weiten Temperaturbereichen stabiles Zwei-Phasen-System vor.

Aus einem Phasendiagramm konnten diejenigen Lösungsmittelgemisch-Verhältnisse abgelesen werden, die sich in einem Zwei-Phasen-Gebiet befinden. Da sich zu Beginn des Trennvorganges die Verhältnisse im Lösungsmittelsystem durch das sogenannte Bluten etwas verändern, wählte man ein Verhältnis, das auch unter Berücksichtigung des Verlustes eines Teils einer der Systemkomponenten noch im Zwei-Phasen-Bereich liegt. Das hier verwendete System bestand aus Wasser, DMSO und THF im Verhältnis 24.6 : 16.2 : 59.2.

Während des Trennvorganges kann es besonders bei Flüssigkeiten niedriger Viskosität zu einer Erwärmung kommen. Dadurch bleibt ein nur sehr kleines Zwei-Phasen-Gebiet möglicherweise bei den Bedingungen des Trennvorganges nicht stabil. Die entsprechenden Phasendiagramme sind in der Regel für eine Temperatur von 20 °C oder 25 °C angegeben. Bei höheren Temperaturen kann das für die Trennung notwendige Zwei-Phasen-Gebiet schnell sehr klein werden oder ganz zusammenbrechen.

Um eine Lösungsmittelphase als mobile oder auch stationäre Phase festzulegen, bediente man sich der sogenannten Pfeiffer'schen Gleichung, die aus der Konstruktion der HSCCC-Apparatur, insbesondere aus der Wicklungsrichtung der Coil und der Drehrichtung des Rotors abgeleitet werden kann:

Leichtere Phase = mobile Phase und Pumprichtung: TAIL nach HEAD

erfordert die Drehrichtung FOREWARD

Die Pumprichtung TAIL nach HEAD ist natürlich festgelegt. Dabei ist an dem hier verwendeten Gerät der Einlaß der Coil, also die Seite der Probenschleife und der Pumpe schwarz markiert und mit TAIL benannt. Entsprechend ist der Auslaß der Coil, also die Seite die zum Fraktionssammler führt, rot markiert und mit HEAD benannt.

Soll nun die schwerere Phase als mobile Phase genutzt werden, ist entsprechend der Pfeiffer'schen Gleichung die Drehrichtung des Rotors von FORWARD auf BACKWARD umzustellen.

Ist ein bestimmtes Fließmittelsystem ausgewählt worden, werden die Lösungsmittel im ausgewählten Verhältnis in einen Scheidetrichter überführt und durch intensives Schütteln ineinander gesättigt. Man läßt das Lösungsmittelgemisch im geschlossenen Scheidetrichter stehen, bis sich die beiden Phasen vollständig entmischt haben. Falls man noch nicht untersuchte Lösungsmittelsysteme testet, liefert die Geschwindigkeit der Phasentrennung an dieser Stelle schon erste Hinweise zur Stabilität des Zwei-Phasen-Gebietes.

Nachdem sich die beiden Phasen im Scheidetrichter getrennt haben, werden sie in zwei unterschiedliche Gefäße überführt und gegebenenfalls entgast. Bei niedrig siedenden und leicht flüchtigen Lösungsmitteln ist darauf zu achten, daß sich hierbei die Phasenzusammensetzung durch eine Erwärmung im Ultraschallbad oder durch angelegtes leichtes Vakuum nicht stark verändert.

Die untere, schwerere Phase enthält Wasser, DMSO und THF im Verhältnis 42.9:28.6:28.5. Die Verteilung in der oberen, leichteren Phase wird mit 6.2:3.8:90.0 angegeben. Diese Werte sind für die weitere Vorgehensweise von erheblicher Bedeutung. Die Proben sollen bei der HSCCC möglichst in der mobilen Phase gelöst werden. Wegen der besseren Löslichkeit der Proben in Wasser und DMSO wurden die Substanzen in der unteren, schwereren Phase gelöst. Entsprechend der sogenannten Pfeiffer'schen Gleichung wurde deshalb die Drehrichtung der Apparatur auf „backward“ eingestellt. Rohprodukte des Tyramin- und des PEG600-Derivates des Tetrasulfonates wurde bei einer Flußrate von 1.5 ml/min HSCCC-Trennungen unterzogen. Die Polyethylenglykolprobe war nach 4.5 Stunden auf das gesamte Coilvolu-

men verteilt worden, ist aber nicht getrennt worden. Man konnte eine Separation der Rohprodukte aus der Synthese des Tyraminderivates **41** in drei Fraktionen erzielen. Die tyraminderivathaltigen Fraktionen enthielten jedoch noch mehrere Substanzen, die auch durch HPLC nicht weiter getrennt werden konnten.

Um die Löslichkeitsunterschiede des Tyraminderivates **41** in den beiden Phasen zu verstärken, wurde diese Substanz nunmehr nicht als deren Natriumsalz, sondern als Tetrabutylammoniumsalz eingesetzt. Dazu wurde Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung mit dem als Sulfonsäure gefällten Rohprodukt des Tyraminderivates **41** zu dessen Tetrabutylammoniumsalz umgesetzt. Das sirupartige, nicht kristallisierbare Produkt fluoreszierte schon im Tageslicht blauviolett und war nach wie vor gut wasserlöslich. Die erwartete bessere Trennung der Produkte im Vergleich zu den als Kaliumsalz vorliegenden Produkten ließ sich jedoch nicht bestätigen.

Um eine verstärkt unterschiedliche Verteilung in den verschiedenen Phasen zu erreichen, kann noch ein weiterer Weg beschrrieben werden. Bei der Trennung mit der HSCCC kann die Löslichkeit der Substanzen in den beiden Lösungsmittelphasen variiert werden, indem unterschiedliche pH-Werte der Lösungsmittel eingestellt oder verschiedene Gegenionen angeboten werden. Die Modulation des pH-Wertes wird als pH-refining bezeichnet. Da bei den hier bearbeiteten Substanzen sowohl basische (NH- und NH₂-Gruppen) als auch saure (Sulfonsäure- und Carbonsäuregruppen) vorhanden sind, wurde das Rohprodukt vom Tyraminderivat **41** in Lösungsmittelgemischen mit unterschiedlichen pH-Werten einer HSCCC-Trennung unterworfen. Dazu wurde das WDT-System statt mit Wasser mit 0.1proz. TFA, mit Phosphatpuffer pH 7.1 und mit Boratpuffer pH 8.2 hergestellt. Die Verwendung von phosphatpufferhaltigem WDT-System brachte keine Veränderung, führte also nach wie vor lediglich zu einer sehr eingeschränkten Trennung der Rohproduktkomponenten. Bei der Verwendung von TFA- und boratpufferhaltigen Systemen konnte nahezu keine Trennung mehr beobachtet werden. Die Variation des pH-Wertes zeigte also tatsächlich Auswirkungen auf die Trennleistung der HSCCC, allerdings brachte sie eine Verschlechterung und keine Verbesserung mit sich. Der Grund für diese Beobachtungen ist in dem Löslichkeitsverhalten der Testsubstanz zu suchen. Bei gesteigerter Löslichkeit (pH 8.2) und bei deutlich reduzierter Löslichkeit durch Zusatz von 0.1proz.

TFA gleichen sich die Verteilungskoeffizienten in beiden Phasen offenbar sehr stark an. Nur in neutralem oder nahezu neutralem Milieu können geringe Unterschiede der Verteilungskoeffizienten der Produkte und Nebenprodukte registriert werden. Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf die Reinigung negativ, macht andererseits aber die positiven Eigenschaften der Tyraminderivate deutlich. Eine wesentliche Forderung an dieses Derivat war die gute Löslichkeit im Hinblick auf seine Anwendung als Radio-diagnostikum. Diese Forderung wird offenbar sehr gut erfüllt, da auch drastische Änderungen der Lösungsmittelzusammensetzung bei nahezu neutralen, zumindest teilweise wäßrigen Systemen nur geringe Auswirkungen auf die Löslichkeit des Produktes haben.

3.6 Elektrophorese

Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele) als Matrix für elektrophoretische Trennungen zu nutzen, geht auf Arbeiten von Raymond et. al. aus den Jahren 1959/1960 zurück^[220,221]. Während Agarose-Gele oder Mischgele aus PAA/Agarose für Trennungen von Molekülen mit Molmassen von 10^6 bis $5 \cdot 10^7$ D empfehlenswert sind, ist für die Elektrophorese von Molekülen im Molekulargewichtsbereich von 10^3 bis 10^6 D die Trennung in PAA-Gelen anzustreben.

Neben der Auswahl des Trenngeles bietet die Elektrophorese eine große Bandbreite weiterer Variationsmöglichkeiten. Die Trennung kann in Kapillaren, Röhrchen oder Rohren unterschiedlicher Längen und Durchmesser durchgeführt werden. Bei diesem Aufbau kann pro Lauf nur eine Reaktionsmischung untersucht werden. Zudem wird bei größeren Querschnitten durch die erschwerte Kühlung sowohl eine gleichmäßige Polymerisation der Gele als auch die eigentliche Trennung bei den dann nötigen höheren Stromstärken aufwendiger. Geht man von röhrenförmigen auf platten- bzw. trogförmige Gele über, sind diese Probleme leichter zu lösen. Zudem können dann mehrere Proben gleichzeitig nebeneinander bearbeitet werden. Die plattenförmigen Gele können darüberhinaus leicht in mehreren Schichten als Gradientengele hergestellt werden. So kann eine erste sehr gering konzentrierte Schicht das Eindringen der Substanzgemische in das Gel erleichtern. In dieser Schicht befinden sich auch die Taschen, in welche die Proben eingetragen werden. Eine zweite, sehr dün-

ne aber hoch konzentrierte Schicht fungiert danach als Konzentrierungszone, die bei stark verdünnten Probelösungen einen einheitlichen Startpunkt der eigentlichen Trennung und somit eine Bandenschärfung ermöglicht. Die Eigenschaften des darauf folgenden größten Teils des Trenngels wird entsprechend den individuellen Anforderungen angepaßt.

Neben diesen Variationen im Detail kann auch nach dem Ziel der Elektrophorese zwischen analytischer und präparativer Trennung unterschieden werden. Nachdem die ersten Probensubstanzen dem Ende des Gels nahe gekommen sind, wird der Elektrophoreselauf üblicherweise abgebrochen. In der Proteinanalytik folgt dann oftmals eine Färbeprozedur. Stattdessen kann aber auch eine eluierende Elektrophorese angeschlossen werden. Dazu werden diejenigen Gelabschnitte, in denen sich die zu isolierenden Substanzen befinden, aus dem Gelbett herausgeschnitten. Man überführt diese Abschnitte in einen Puffertrog, der durch unterschiedlich dimensionierte Membranfilter kaskadenartig in Fallen für Moleküle unterschiedlicher Moleküldimensionen unterteilt ist. Nach der Theorie wandern die Substanzen im elektrischen Feld aus dem Gel heraus und können entsprechend den cut-off's der Membranfiltermatrices aus den jeweiligen Kaskaden abpipettiert werden. Unterscheiden sich die zu eluierenden Substanzen erheblich in ihrer Molekülmasse, Größe oder Ladung, können gegebenenfalls auch zeitlich differenziert, verschiedene Substanzen aus den Fallen gewonnen werden.

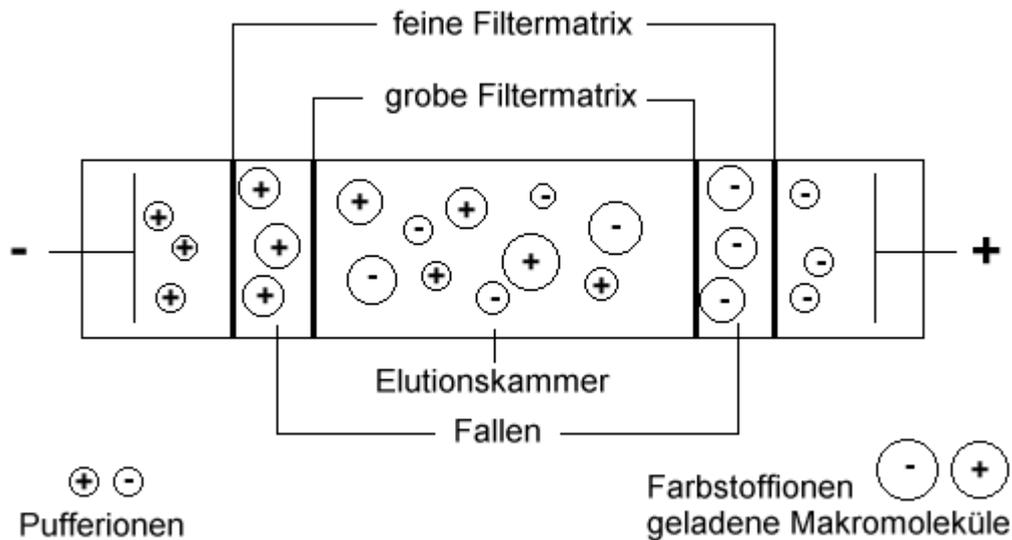


Abb. 16 : Schema einer Kammer zur eluierenden Elektrophorese.

Ist ein derartiges, zweistufiges Trennverfahren geplant, wird man üblicherweise groß dimensionierte Gele mit Dicken von 10 mm aufwärts benutzen, um entsprechend große Substanzmengen auftragen zu können. Um Diffusionseffekte zu vermeiden und gleichzeitig den Zeitaufwand zu minimieren, wird man bei diesen Gelen mit großem Querschnitt versucht sein, recht hohe Spannungen anzulegen. Dem steht aber die notwendige Kühlung entgegen. Resultat sind oft sehr lange Laufzeiten der Trennungen. Aus diesem Grund muß anders als bei 3 mm dünnen Gelen mit entsprechend kurzen Laufzeiten bei Gelen ab 10 mm für eine stete Umwälzung und Erneuerung des Puffers gesorgt werden.

Um die grundsätzliche Anwendbarkeit der Elektrophoretischen Trennung der in dieser Arbeit erhaltenen Substanzgemische an Acrylamid-Gelen zu testen, wurden zuerst mit einem Standardgel Testelektrophoresen mit Rohprodukten aus der Synthese des Tyraminderivates **41** durchgeführt. Bei einer Länge des Gels von nur 4 cm waren am Ende der Elektrophorese zwei nur leicht überlappende fluoreszierende Zonen im Gel sichtbar. Ein Schema der samt Miniaturstativ nur handtellergroßen Apparatur ist unten abgebildet.

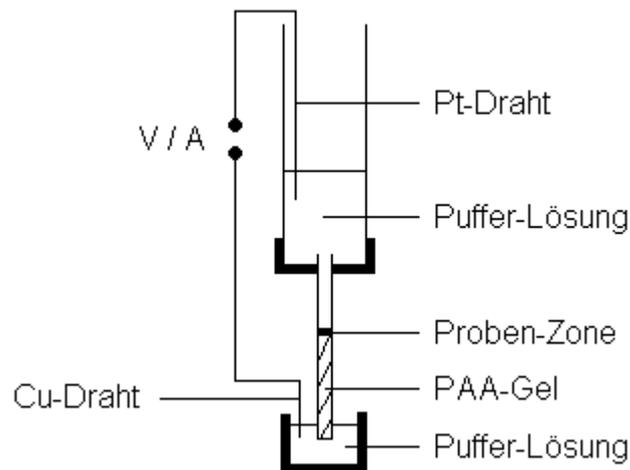


Abb. 16 : Schema der Miniatur-Elektrophorese

Daraufhin wurden Standardgele mit Phosphatpuffer pH 7.1 hergestellt. Die in die Probenkammern des Geles eingebrachten Proben setzten sich jedoch zum größten Teil auf der Geloberfläche ab und drangen nur sehr langsam in das Gel ein. Daher wurden keine mit der Kapillarmethode vergleichbaren Ergebnisse erzielt. So wurden im weiteren Verlauf Gele gegossen, die im Bereich der Probenaschen eine geringere Gelbildnerkonzentration aufwiesen als im übrigen Gel. Durch diese Konzentrierungszone sollte zum einen ein Eindringen der Proben in das Gel erleichtert und zum anderen eine schärfere Trennung der Banden erzielt werden. Da die Ergebnisse unbefriedigend waren, wurden die Proben in geringerer Konzentration eingesetzt. Dennoch waren die fluoreszierenden Banden sehr verschwommen. Der Grund war nach wie vor, daß die Proben an der Grenzfläche Puffer/Gel ausfielen und daher über einen längeren Zeitraum in das Gel abgegeben wurden.

Um die Löslichkeit der Proben zu erhöhen und so ein rascheres Eindringen in das Trennmateriale zu ermöglichen, wurden nun Standardgele mit Boratpuffer pH 8.2 gegossen. Die Proben blieben unter diesen Bedingungen in Lösung und drangen leicht in die Gele ein, doch war auch hier die Trennleistungen unbefriedigend.

Um die Trennleistung weiter zu verbessern wurden nun Gele gegossen, die einen sehr viel höheren Gehalt an Gelbildner aufwiesen. Ansatzpunkt dafür war, daß sehr dichte Gele, hergestellt aus hoch konzentrierten Monomerlösungen, zwar eine überproportional hohe Laufzeit erfordern könnten, aber möglicherweise wesentliche Verbesserungen bei der Trennleistung erbringen. Insbesondere das Verhältnis von AA und BIS wurden aber beibehalten, da sich so ein optimaler Vernetzungsgrad und dadurch allgemein die beste Trennleistung bei minimalem Einsatz der Monomere ergibt. Veränderungen wurden bei den Konzentrationen der Monomerlösungen und des Puffers vorgenommen.

Sowohl zum Gießen der Gele als auch zur Füllung des Puffer-Reservoirs wurde nun mit Puffer gearbeitet, deren Konzentration auf die Hälfte der vorherigen reduziert war. Dafür sprachen mehrere Gründe. Eine geringer konzentrierte Elektrolyt-Lösung weist eine ebenfalls geringere Ionenstärke auf. So wird die zu trennende Substanz stärker zum Träger des Ladungsflusses, was die Wanderungsgeschwindigkeit der Substanzen erhöht. Weiterhin kann bei gleicher Spannung eine im Vergleich zur Verwendung hoch konzentrierter Pufferlösungen eine entsprechend niedrigere Stromstärke gemessen werden. Dadurch kann einer zu starken Erwärmung der Gele wesentlich sicherer entgegengewirkt und eine Reißbildung innerhalb des Gels verhindert werden. Im weiteren Verlauf wurde die Pufferkonzentration auf bis 1/10 der Standard-Konzentration abgesenkt. Nach erfolgversprechenden Resultaten an Testgelen von 3 mm Dicke wurden Gele für den präparativen Einsatz mit 10 mm Dicke gegossen, die jeweils mit Pufferumlauf und einer Stromstärke von 100 mA an bis zu 300 V (3 mm) und bis zu 120 V (10 mm) verwendet wurden. Die Formulierung „bis zu“ ergibt sich daraus, daß unabhängig von der angelegten Spannung die angestrebte Stromstärke das limitierende Parameter ist. Die ersten fluoreszierenden Zonen kamen bei diesen Bedingungen nach 14 bis 17 Stunden in die Nähe des der Startzone gegenüberliegenden Randes des Trenngeles. Anders als z. B. in der Proteinanalytik üblich, wurde kein zusätzlicher Marker-Farbstoff eingesetzt, da unter UV-Licht die Wanderung der Proben gut kontrolliert werden konnte.

In der Elutionsapparatur konnten die fluoreszierenden Bestandteile zwar vollständig aus den ausgewählten Gelstreifen herausgelöst werden, das Ergebnis der E-

lektrophorese war insgesamt jedoch ungenügend. Ein Vergleich der Dünnschichtchromatogramme des Rohproduktes mit den nach der Elektrophorese erhaltenen Substanzen zeigte, daß lediglich diejenigen Substanzen fehlten, die einen R_f -Wert unter 0.22 hatten. Die übrigen Banden konnten unverändert wiedergefunden werden.

3.7 Vortests zur Bindungsfähigkeit

Alle Produkte, deren Aufbau in dieser Arbeit untersucht wurden, sind nach der Aufarbeitung auf ihre grundsätzliche Eignung für die angestrebten diagnostischen und therapeutischen Zwecke überprüft worden, indem deren Bindungsfähigkeit an Chitin aus Krabbenpanzern und vorher nicht mit optischen Aufhellern behandelte Cellulose (Filterpapier) beobachtet wurde. Dazu gab man Lösungen der Substanzen zu einige Minuten in Wasser eingelegtem Chitin. Im UV-Licht betrachtet zeigte sich in allen Lösungen eine starke Fluoreszenz im blauweißen bis grünblauen Bereich. Die Farbstoff-Lösungen wurden eine halbe Stunde ohne Bestrahlung stehen gelassen und erneut im UV-Licht betrachtet. Dabei konnte eine besonders starke Leuchtkraft im blauweißen bis blauvioletten Bereich an den Körnern des Chitins festgestellt werden, während sich gleichzeitig innerhalb der Einwirkdauer die Fluoreszenz der Lösung stark verringert hatte. Von gleichartig hergestellten Lösungen wurde jeweils ein Tropfen ringförmig auf ein Filterpapier gegeben. In die Mitte des Papieres gab man eine äquivalente Lösung der als Edukt eingesetzten Diaminostilbendisulfonsäure **8** und betrachtete das getrocknete Papier im UV-Licht (360 nm), wobei an den präparierten Stellen intensives Leuchten erkennbar war. Auch als das Papier einige Minuten mit Wasser gespült wurde, war die Fluoreszenzintensität kaum verändert.

Während sich die Flavonsäure nach einer halben Stunde unter UV-Bestrahlung schon deutlich braun verfärbt hat, also einer *trans/cis*-Isomerisierung unterlag, trat dieser Effekt bei den anderen Substanzen gar nicht auf. Diese Beobachtungen sind ein Indiz dafür, daß die beschriebenen Substanzen die erforderliche Bindungsfähigkeit an Chitin und Cellulose besitzen und, wie es von anderen Verbindungen gleichen Typs bekannt ist, durch diese Bindung vor der Photoisomerisierung geschützt sind.

4. Spezifische Detektion systemischer Mykosen

4.1 Einführung

Bei Patienten mit uncharakteristischer Symptomatik ist häufig auch der Verdacht auf eine systemische Mykose zu klären. Nur so kann eine erfolgreiche Behandlung eingeleitet werden. Grundlage der Untersuchungen können bislang sowohl Gewebeproben als auch Sekrete des Respirationstraktes sein.

Eine positive Färbereaktion mit **3b** gibt für diese wichtige Aufgabe wertvolle Entscheidungshilfen. Allerdings ermöglicht ein solcher Test nur die einfache Ja/Nein-Aussage, ob eine Mykose vorliegt oder nicht. Art und Umfang der Besiedelung und insbesondere eine genaue Eingrenzung des oder der Infektionsherde sind bisher nur *post mortem* möglich gewesen. Die Computertomographie (CT) findet in diesem Feld zweifellos ein sinnvolles Einsatzgebiet. Leider sind besonders aussagekräftige Abbildungen auch durch die CT erst bei fortgeschrittener Krankheit erhältlich.

Um eine erfolgreiche Therapie systemischer Mykosen einleiten zu können, müssen die anzuwendenden diagnostischen Verfahren viele Anforderungen erfüllen. Sie müssen in der Lage sein, die Erreger mit hoher Sensitivität und gleichzeitig hoher Spezifität zu erkennen. Ist ein Patient immunsupprimiert, geht die Sensitivität verschiedener Methoden aber zurück. Da sich Mykosen der inneren Organe gerade bei dieser Patientengruppe besonders rasch ausbreiten können, muß die Detektion von Pilzelementen schon sehr früh möglich sein. Die zur Zeit benutzten bildgebenden Verfahren sind hierzu kaum in der Lage. Meist werden systemische Mykosen unabhängig von dem oder den befallenen Organen therapiert. Soll jedoch, ähnlich wie bei der Krebstherapie, eine chirurgische Herdsanierung erfolgen, muß schon vor diesem Eingriff der Ausgangspunkt der Erkrankung festgestellt werden können. Die Untersuchung von Blut und unterschiedlicher Sekrete läßt eine solche Entscheidung nicht zu.

Viele der angesprochenen diagnostischen Verfahren stützen sich auf aus dem Körper entnommenes Material. Andere nutzen elektromagnetische Strahlungen, deren Quelle sich ebenfalls außerhalb des Körpers befindet. Dabei werden die verschiede-

nen Wechselwirkungen der Strahlung mit infiziertem und unbelastetem Gewebe genutzt. Mit der Einschränkung der sehr frühen Erkennung muß zur Lösung dieser Probleme eine der Röntgendiagnostik entsprechende Vorgehensweise in Betracht gezogen werden, die sich auf die Verwendung von radioopaken positiven Röntgenkontrastmitteln stützt. Sie füllen z. B. Hohlgane aus und ermöglichen so deren Untersuchung. Daraus wird aber sofort deutlich, daß sich diese Kontrastmittel für die hier angestrebte Nutzung nicht eignen. Sie sind häufig außerordentlich schwer löslich und lassen sich daher weder *i.v.* noch *i.m.* verabreichen. In Umkehrung der Anforderung an eine Substanz zur Untersuchung von Magen und Darm im Röntgenkontrastmittelverfahren soll sich das Diagnostikum zur Detektion tiefer Mykosen möglichst schnell und vollständig über die Blutgefäße in Lunge, Nieren, Leber, Milz und evtl. auch im Hirn verteilen können um dort die Pilzzellen zu erreichen. Diese Fähigkeit haben unter anderem einige iodhaltige aromatische Carbonsäuren und Pyridinderivate. Um ausreichend hohe Kontraste zu erzielen sind aber Kontrastmittelkonzentrationen erforderlich, die allein durch Bindung an die feinen Pilzstrukturen nicht realisierbar sind.

Im Unterschied zur röntgenologischen Untersuchung ist es auch möglich, die von einer Strahlenquelle im Körperinneren abgegebene Strahlung qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Dieses Verfahren ist als Autoradiographie bekannt. Bei dieser Methode werden zwei zunächst verschiedene Vorgehensweisen angewendet. Eine Variante nutzt die Anregung der Untersuchungsmaterialien durch Neutronenaktivierung oder seltener, durch Protonenaktivierung. Sie scheidet als diagnostisches Mittel aus. Bei der zweiten Variante werden Radionuklide in das zu untersuchende System eingebracht. Die von ihr ausgehende Strahlung wird detektiert.

Nach diesen Überlegungen lag es nahe, mit radioaktiven Nukliden markierte optische Aufheller aus der Reihe der Stilbene als spezifische Radiopharmazeutika gleichzeitig für die Diagnose und zusätzlich zur genauen örtlichen Eingrenzung von Pilzinfektionen nutzbar zu machen.

Ein für diesen Zweck einsetzbares Nuklid soll sich rasch mit guten Ausbeuten in das Molekül einführen lassen, eine Halbwertszeit besitzen, die dem Zeitaufwand der präparativen Arbeiten angemessen ist, eine ausreichende Strahlungsleistung haben und

außerhalb des Untersuchungsobjektes detektierbar sein. Da α -Strahlung schon durch sehr dünne Gewebeschichten vollständig abgeschirmt wird, werden reine α -Strahler in die folgenden Überlegungen nicht mit einbezogen.

Bis auf Fluor lassen sich die Halogene (Astat wird hier aus verständlichen Gründen nicht berücksichtigt) komfortabel in organische Moleküle einführen. Die Radionuklide von Chlor und Brom haben zwar teilweise eine erhebliche Strahlungsleistung, weisen jedoch bis auf eine Ausnahme Halbwertszeiten im Bereich von Milisekunden bis zu mehreren Stunden auf. Zusammen mit der präparativen Radiohalogenierung können sich derartige Experimente und Untersuchungen über Tage erstrecken. Die sehr kurzlebigen Radionuklide des Chlor und Brom sind daher ungeeignet. Mit einer Halbwertszeit von 300000 Jahren liefert das oben als Ausnahme angedeutete ^{36}Cl eine zu geringe Strahlungsleistung, um sinnvoll bei der Untersuchung biologischer Systeme eingesetzt werden zu können.

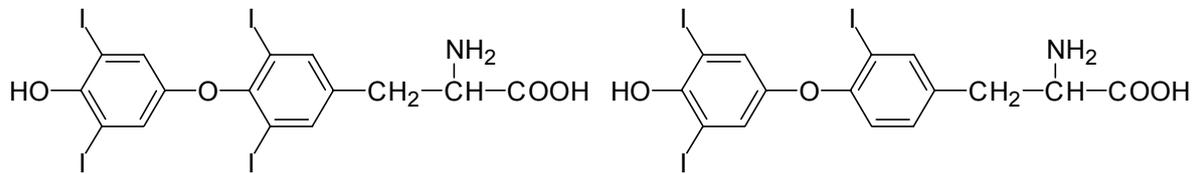
Wesentlich günstiger sind die Verhältnisse bei Iod. Sowohl in der Chemie als auch in der Medizin werden von den über dreißig radioaktiven Iod-Isotopen mit Halbwertszeiten von 0.65 Sekunden bis $1.57 \cdot 10^7$ Jahren insbesondere ^{123}I , ^{125}I , ^{129}I und ^{131}I verwendet.

Tab. 5: Eigenschaften einiger Iod-Nuklide

Nuklid	$t_{1/2}$	Zerfallsart	Zerfalls-Energie	max. γ -Energie	Partikel-Energie
^{123}I	13.1 h	E.C.	1.23 MeV	0.5385 MeV	×
^{125}I	59.9 d	E.C.	0.178 MeV	0.0355 MeV	×
^{127}I	Stabil	×	×	×	×
^{129}I	$1.57 \cdot 10^7$ a	β^-	0.193 MeV	0.0396 MeV	0.15 MeV
^{131}I	8.05 d	β^-	0.971 MeV	0.7229 MeV	0.606 MeV

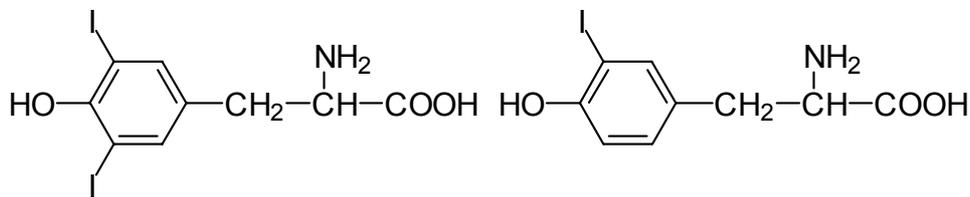
Iod ist für den menschlichen Stoffwechsel unentbehrlich. Der tägliche Bedarf des Menschen an diesem Spurenelement beträgt 0.15 mg. Aus der Physiologie sind mit

den Schilddrüsenhormonen L-Thyroxin (**44**), Triiodthyronin (**45**) und deren Vorstufen Monoiodtyrosin (**46**) und Diiodtyrosin (**47**) verschiedene iodhaltige Substanzen bekannt.



44

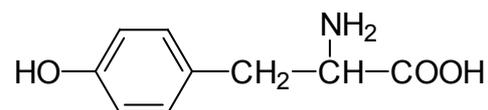
45



47

46

Allen diesen Verbindungen ist die Substruktur der 4-Hydroxyphenylethylaminocarbonsäure Tyrosin (**48**) gemein.



48

Tyrosin ist in Wasser kaum löslich, besser in verdünnten Säuren und Laugen. Durch Decarboxylierung des Tyrosins (**48**) gelangt man zum Tyramin (**24**). Es ist schon bei leicht saurem pH-Wert, also unter physiologischen Bedingungen, gut wasserlöslich und leicht unter oxidativen Bedingungen iodierbar und liefert schon bei milden Reaktionsbedingungen ausreichend stabile iodiertere Derivate. Als Edukt ist es als freie Base oder in Form seines Hydrochlorids kommerziell erhältlich.

Inkorporiert werden die Radionuklide des Iods genau wie ^{127}I während der Bildung der Schilddrüsenhormone in die Follikelzellen aufgenommen (Iodination) und zu e-

lementarem Iod oxidiert. Nachfolgend wird es zur Iodierung der Aminosäure Tyrosin des Thyreoglobulins verwendet (Iodisation). Thyreoglobulin ist ein Glycoprotein mit einer Molmasse von etwa 660000 g/mol, das als Trägermolekül der Thyroid-Hormone fungiert und etwa 90 % des im Körper gebundenen Iods enthält. Nach wenigen Stunden sind ca 90 % des verfügbaren Iods bzw. Iodids in der Schilddrüse konzentriert. Weil Iodid nicht nur ein reaktives Nucleophil sondern ebenfalls eine gute Abgangsgruppe ist, können iodhaltige Verbindungen auch unter physiologischen Bedingungen Iod freisetzen. Wird statt ^{127}I ein Radionuklid aufgenommen, kann es im speichernden Gewebe schnell zu Zellschädigungen und zur Ausbildung von Tumoren kommen. Derartigen Gefahren kann man durch vorherige Gabe von Natriumiodid aus ^{127}I begegnen. Eine entsprechende Vorgehensweise wurde auch während des „Kalten Krieges“ und nach dem Reaktorunfall in Tschernobyl empfohlen, um sich gegen die Speicherung von ^{131}I zu schützen.

Kriterien für die Auswahl der jeweils zu verwendenden Nuklide sind zum Beispiel Art und Energie der emittierten Strahlung oder die Halbwertszeiten. In der Regel werden die Radionuklide nicht direkt als Element oder z. B. als Iodid eingesetzt, sondern dienen zur Iodierung anderer Substanzen. In diesen Fällen müssen die Halbwertszeit des verwendeten Isotopes sowie die Dauer der Synthese und die Aufarbeitung der entstehenden Produkte aufeinander abgestimmt werden. Für die Strahlungsdetektion außerhalb eines nicht nur mikroskopisch kleinen Testorganismus ist nachliegender Weise ein γ -Strahler einem β - oder α -Strahler vorzuziehen.

In der Natur findet sich außer dem stabilen ^{127}I noch in geringen Mengen das radioaktive ^{129}I . Es entsteht durch Zerfall von ^{235}U und durch Wechselwirkung kosmischer Strahlung mit Xenon in der Atmosphäre. Weitaus größere Mengen fallen aber in Kernkraftwerken an. Es hat eine Halbwertszeit von $1.57 \cdot 10^7$ Jahren.

Mit einer Halbwertszeit von 13.1 Stunden und einer hohen Strahlungsleistung ist ^{123}I für medizinische Zwecke sehr gut verwendbar, da es intensive, wirkungsvolle und zugleich sehr kurze Behandlungen ermöglicht. Für präparative Arbeiten und Beobachtungen in biologischen Systemen bietet sich ^{125}I an, das mit einer Halbwertszeit von knapp sechzig Tagen auch längere Untersuchungen ermöglicht.

Das Iod-Isotop ^{131}I wird ebenfalls in Kernkraftwerken erzeugt. Es hat eine Halbwertszeit von 8.05 Tagen. Bei speziellen Schilddrüsenerkrankungen kann es mit sehr gutem Erfolg auch therapeutisch eingesetzt werden. Da es β - und γ -Strahlen relativ hoher Energie emittiert, gilt es als besonders gefährlich.

Insgesamt fiel die Wahl danach auf ^{125}I und ^{131}I als zu verwendende Träger der Aktivität.

4.2 Synthese radioaktiv markierter Stilbenderivate

In Bezug auf die schon vorher angesprochene besonders geringe Toxizität der in Frage kommenden Stilbenderivate sollte sich auch ein radioaktiv markiertes Blankophor-Derivat besonders für die *parenterale* Anwendung zur *in vivo*-Erkennung und Lokalisation tiefer Systemmykosen eignen. Durch die Verteilung der Diagnostika über das Gefäßsystem sollten sich die Herde der Infektionen mit einer solch hohen Genauigkeit lokalisieren lassen, daß sie einer chirurgischen Behandlung zugänglich werden. Das ist gerade deshalb sehr wichtig, da eine isolierte antimykotische Therapie, auch wenn sie gleichzeitig mit Amphotericin B (vorzugsweise als liposomale Zubereitung) und Azolen wie Itraconazol oder Voriconazol durchgeführt wird, den letalen Ausgang tiefer Systemmykosen oft nicht verhindern kann.

Das hierfür geeignete Stilbenderivat sollte verschiedene Eigenschaften aufweisen:

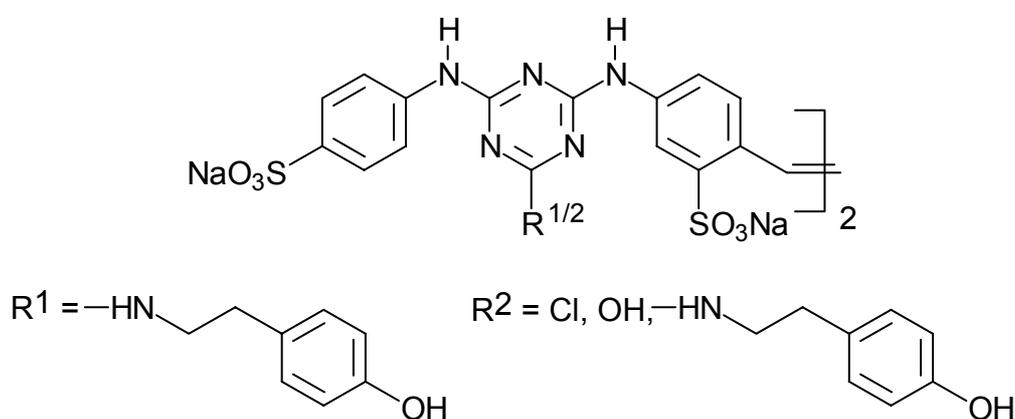
- 1) hohe und selektive Affinität zu β -1.3 and β -1.4-Polysacchariden
- 2) gute Löslichkeit in Wasser
- 3) rasche Iodierbarkeit

Die Diaminostilbendi- bzw. tetrasulfonsäuren **3a** und **6** erfüllen erwiesenermaßen die Forderung hoher und selektiver Affinität zu pilzspezifischen Polysacchariden. Die Löslichkeit der einzelnen Derivate kann bei sonst gleichen Substituenten erheblich durch die Anzahl der Sulfonsäuregruppen modifiziert werden.

Aufgrund der großen Anzahl elektronenziehender Gruppen im Blankophor-Molekül reagiert dieses unter den Bedingungen der Iodierungsreaktionen selbst nicht und ist daher nicht zur direkten Radiomarkierung geeignet. Für Amine und auch elektronen-

reiche Phenole, die ihrerseits leicht einer oxidativen Iodierung zugänglich sind, bieten die Monochlortriazine **3a** und **6** allerdings gute Angriffsmöglichkeiten für eine nucleophile Substitution.

Als Ergebnis dieser Überlegungen wurde Tyramin als Ligand für die Synthese eines Prototypen (**49**) ausgewählt, welches mit verschiedenen Iod-Nukliden, insbesondere ^{131}I and ^{125}I markierbar sein sollte. Dieser Strukturvorschlag war noch variabel, weil anstelle des gezeichneten Tetrasulfonates auch das sich von **3** ableitende Disulfonat und andere, ebenfalls lösliche Salze oder aber die Sulfonsäuren selbst iodierbar sind.



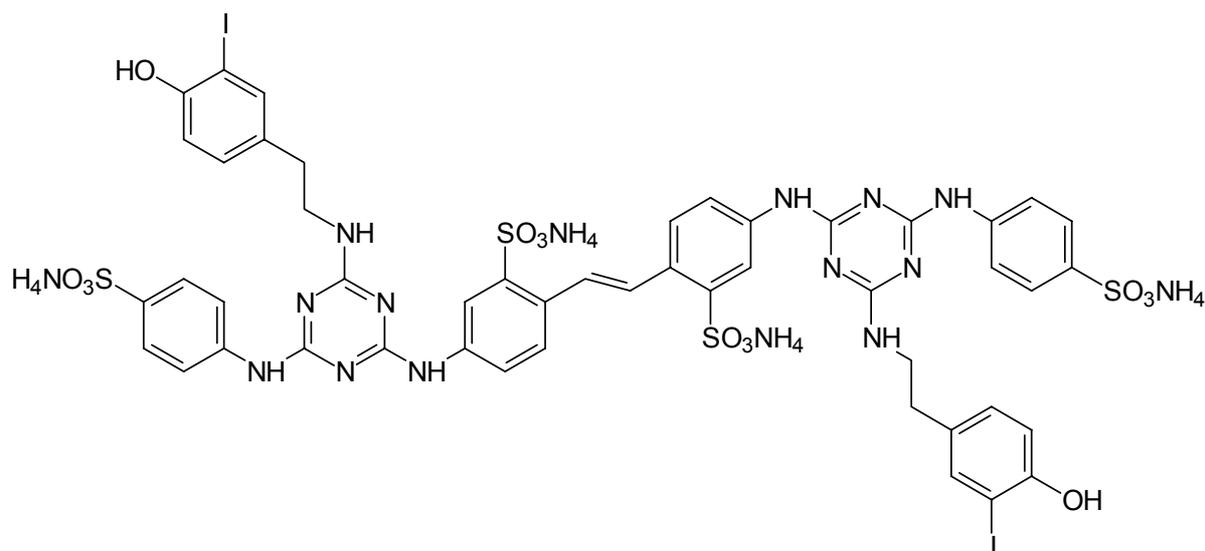
49

Um ein markierbares Substrat herzustellen, wurde seine Vorstufe **6** unter pH-Kontrolle mit dem Hydrochlorid von Tyramin **24** umgesetzt. Mit der erhaltenen Substanz konnten Chitinproben und *Candida albicans* CBS2730 Zellen gefärbt und wie üblich durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch die Derivatisierung nimmt die Intensität der Fluoreszenz zwar ab, ist aber nach wie vor einfach zu erkennen. Die Farbe des abgestrahlten Lichtes verlagert sich vom weißlich Blauen des Eduktes zu einem grünlichen Blau des Produktes. Die Farbverschiebung der Fluoreszenz des derivatisierten Produktes im Vergleich zum nicht derivatisierten Blankophor, das sonst zur Färbung klinischen Probenmaterials genutzt wird, ist dabei auf den Effekt des bzw. der nun zusätzlich vorhandenen Substituenten auf das π -Elektronensystem des Stilbens zurückzuführen. Das nur mit Tyramin verknüpfte, aber nicht iodierter Stilben wurde außerdem mit gutem Erfolg auf seine Eignung zur

Erkennung von Pilzinfektionen in respiratorischen Sekreten untersucht. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß das zur Radiomarkierung vorgesehene Produkt die von ihm geforderte Bindungsfähigkeit besitzt. Wäre dies nicht der Fall gewesen, wäre ebenfalls die Wahrscheinlichkeit stark gesunken, daß die Substanz nach der Iodierung noch bindungsfähig ist.

4.3 Radiomarkierung

In der Literatur sind Methoden zur Iodierung unterschiedlichster aromatischer und heterocyclischer Edukte beschrieben^[222-224]. Als Iodierungsmethode wurde die Chloramin T-Methode ausgewählt, die oft benutzt wird, um Peptide, Proteine oder andere bioaktive Substanzen radioaktiv zu markieren. Dabei dient Chloramin T als Quelle positiv geladener Chlor-Spezies, die z. B. aus Natriumiodid elementares Iod freisetzen und die entsprechenden Interhalogenverbindungen bilden. Bei oxidationsempfindlichen Edukten kann die Methode versagen. Im allgemeinen sind aber hohe Halogenierungsraten zu erzielen. Präparativ vorteilhaft ist, daß viele Lösungsmittel, Lösungsmittelgemische und Puffersysteme verwendbar sind. Weiterhin kann die Prozedur auf einfache Weise unterbrochen bzw. abgebrochen werden, indem die Reaktionslösung auf eine vorher in geeigneter Weise aktivierte SepPack-Säule aufgetragen wird. Durch diese Filtration wird gleichzeitig das freie Iod / Iodid abgetrennt. Da die in dieser Arbeit an anderer Stelle beschriebenen Bemühungen zu Reinigung der Tyraminderivate nicht vollständig erfolgreich waren, wurde für diese Experimente das aus den entsprechenden Reaktionen erhaltene Gemisch eingesetzt. Wesentlich ist die Bindungsfähigkeit der einfach und zweifach Tyramin-substituierten Diaminostilbenderivate an die *Candida*-Zellwände. Gegebenenfalls auftretende Abstufungen in der Bindungsstärke und methodenbedingte unterschiedlich hohe Iodierungsgrade wurden zu einem Gesamtergebnis zusammengefaßt. Eine mögliche Zielstruktur ist unten angegeben. Je nach Aufarbeitung oder Herstellungsvariante des Eduktes können auch andere Gegenionen der Sulfonsäure und andere Iodierungsgrade auftreten.



50

Zur Radiomarkierung wurde entweder ^{131}I oder ^{125}I zu einer Lösung des Tyramin-Derivates **49** 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 8) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Chloramin-T in 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 8) gestartet und eine Minute später mit Wasser gestoppt. Zur Reinigung wurde eine SepPack C-18 Säule benutzt. Die Kartusche wurde mit Methanol, danach mit 0.1 M Natriumacetatpuffer (pH 5.4) aktiviert. Die radioaktive Lösung wurde auf die Säule gegeben und das freie Iod mit 0.1M Natriumacetatpuffer (pH 5.4) und das iodierter Blankophor mit Methanol eluiert. Die Blankophor-Lösung wurde vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand in 0.9proz. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen. Aus den Aktivitätsbestimmungen des Filtrates und der erhaltenen Produkte ergibt sich nach deren Reinigung eine Gesamtausbeute an radioaktiv markiertem Farbstoff 40 %.

4.4 Bindungs-Studien

Die Bindung der markierten Substanzen kann in zwei grundsätzlich verschiedene Bereiche aufgeteilt werden. Bei einem Einsatz als *in vivo*-Diagnostikum ist eine unspezifische Bindung an Proteine und Lipide z. B. der Blutgefäßinnenwände in Betracht zu ziehen. Bei den im folgenden als Testsystem ausgewählten *C. albicans*-Zellen können ähnliche Zellwandbestandteile unspezifische Bindungsstellen repräsentieren. Die spezifische Bindung findet an β -Glukanen statt. Sowohl die unspezifische als auch die spezifische Bindung erfolgt nicht-kovalent über van-der Waals-

Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Sie ist also prinzipiell reversibel. Um die Bindungsfähigkeit des radioaktiven Präparates zu untersuchen wurde folgendes Experiment ausgeführt. Zu 10^5 autoclavierten *Candida albicans* CBS 2730 Zellen in 200 μ L PBS wurden 18.5 kBq 131 I-Tyramin-Blankophor in 10 μ l 0.9proz. Natriumchlorid-Lösung gegeben. Man inkubierte eine Stunde bei 37 °C. Zum Vergleich wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen den *Candida*-Suspensionen vor der Zugabe der radioaktiv markierten Substanz zusätzlich unterschiedliche Mengen unjodierten Tyramin-Blankophors zugesetzt wurde. Neben der Gemeinsamkeit zwischen unspezifischer und spezifische Bindung bestehen aber auch wesentliche Unterschiede. Die unspezifische Bindung beruht auf schwachen Wechselwirkungen. Sie kann an verschiedenen Substraten erfolgen. Die Zahl unspezifischer Bindungsstellen kann die der spezifischen Bindungsstellen stark übertreffen. Wesentliches Merkmal für spezifische Bindungsstellen ist ihre hochaffine Bindung. Die Zahl dieser Bindungsstellen kann klein sein im Vergleich zur Zahl der unspezifischen Bindungsstellen. Das erklärt, warum von der Gesamtdosis radioaktiven Materials nur ein geringer Prozentsatz gebunden wurde. In derjenigen Lösung, die kein unjodiertes Substrat enthielt, wurden 10.47 Prozent der Gesamtaktivität gebunden. In den folgenden Interpretationen sind die Meßergebnisse auf diesen Wert als 100 % normiert wiedergegeben. Die spezifische Bindung läßt sich von der unspezifisch Bindung dadurch unterscheiden, daß an spezifische Bindungsstellen gebundene Substrate merklich kompetitiv verdrängbar sind. Aufgrund der großen Anzahl unspezifischer Bindungsstellen wird die daran gebundene Substratmenge durch kompetitive Liganden kaum verändert werden. Der in der Suspension enthaltene optische Aufheller belegt zunächst die für eine spezifische Bindung zur Verfügung stehenden Segmente der *Candida*-Zellwände. Das nachfolgend zugesetzte 131 I-Tyramin-Blankophor belegt daraufhin lediglich die noch nicht vom Blankophor in Anspruch genommenen Glukaneinheiten oder wird unspezifisch angelagert. Die erhaltenen Meßwerte sind in Tab. 6 aufgeführt. Aus diesen Meßwertpaaren wird deutlich, daß im gesamten gemessenen Bereich eine für die kompetitive Verdrängung typische Abnahme gebundener Aktivität feststellbar ist, wenn die Konzentration des verdrängenden Substrates zunimmt.

Tab. 6: Konzentrationen an underivatisiertem Blankophor und die von der Hintergrundstrahlung bereinigten, gebundenen Aktivitäten.

C(41) / [mol/L]	Aktivität / [Bq]	% gebundene Aktivität, normiert
$2.00 \cdot 10^{-5}$	229	52.1 %
$2.00 \cdot 10^{-6}$	290	66.1 %
$2.00 \cdot 10^{-8}$	468	106.7 %
$2.00 \cdot 10^{-9}$	323	73.6 %
$2.00 \cdot 10^{-10}$	397	90.4 %
$2.00 \cdot 10^{-11}$	363	82.7 %
$2.00 \cdot 10^{-12}$	361	82.2 %
$2.00 \cdot 10^{-13}$	361	82.2 %
$2.00 \cdot 10^{-14}$	469	106.9 %
0	439	100.0 %

Diese Bindungsexperimente wurden durchgeführt, um die Bindungseigenschaften des Tyramin-derivatisierten Blankophors zu quantifizieren. Ganz ohne einen Zusatz von kompetitivem Substrat werden also (normiert) etwa 52 % der an die Pilzstrukturen gebundenen Aktivität spezifisch angelagert. Durch diese Experimente konnte nachgewiesen werden, daß trotz der Derivatisierung mit Tyramin und der nachfolgenden Iodierung die spezifische Affinität der Aufheller an die entsprechenden Glukane erhalten bleibt.

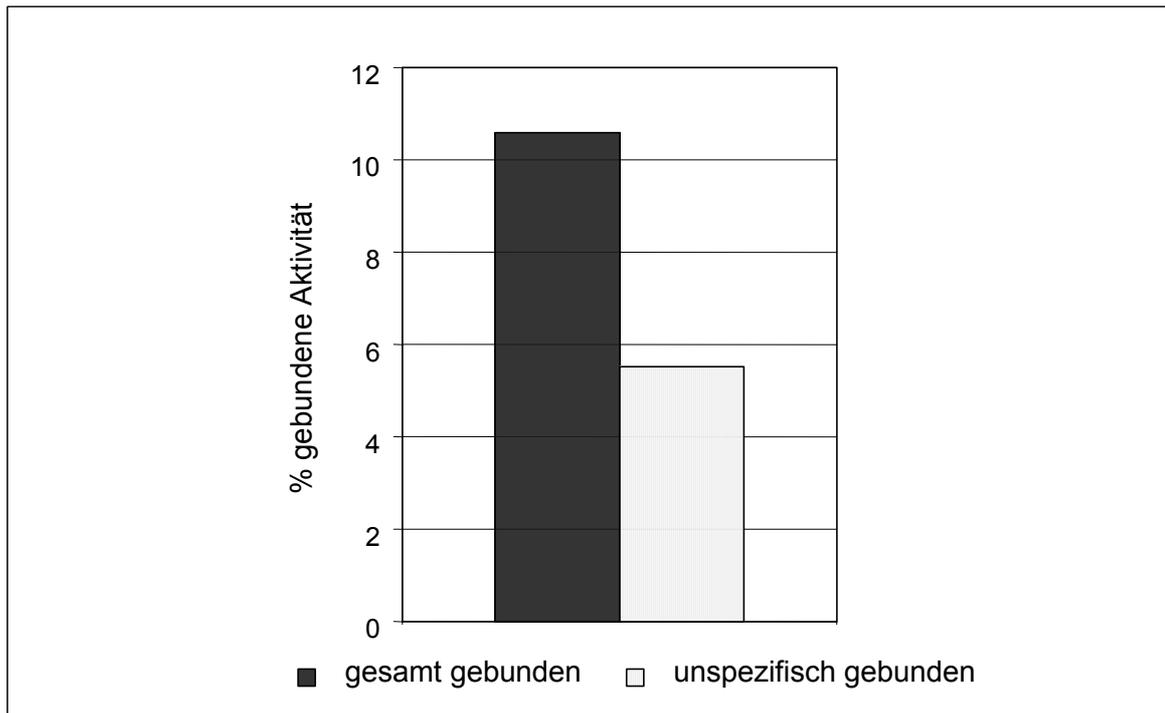


Abb. 18: Bindung von ^{131}I -Tyramin-Blankophor an *Candida albicans*, nicht normiert. Die gesamt gebundene Aktivität ist der Mittelwert aus Zeile 10 und 11 von Tab. 6.

Um die Eignung eines radioaktiv markierten Präparates als Diagnostikum *in vivo* zeigen zu können, war es zunächst wichtig, Vergleichswerte zu haben, mit denen die Aussagen aus den nachfolgend geplanten Experimenten an erkrankten Tieren verglichen werden konnten. Andernfalls könnte eine besonders starke oder besonders niedrige von einem Organ ausgehende Strahlung falsch interpretiert werden. Um eine richtige Einordnung zu ermöglichen, wurden Bioverteilungsstudien geplant und durchgeführt, die die Verteilung und möglicherweise verstärkte oder abgeschwächte Retention der Testsubstanz unter normierten Bedingungen an gesunden Tieren *in vivo* zeigen sollten. Gleichzeitig sollte durch diese Experimente auch die Geschwindigkeit der Eliminierung der Testsubstanz aus dem Körper bestimmt werden. Eine solcher Wert ist nicht nur von theoretischem pharmakologischen Interesse, sondern kann auch konkret praktische Auswirkungen haben. Wird die radioaktive Substanz auch von gesundem Gewebe längere Zeit gespeichert, kann sie möglicherweise Radioiod freisetzen. Diese könnte nach den oben beschriebenen Mechanismen in der Schilddrüse akkumuliert werden. Die Ergeb-

nisse der folgenden Experimente liefern also zusätzlich erste qualitative Bewertungsmöglichkeiten.

4.5 Bioverteilungs-Studien

Die Tierversuche wurden nach einer Überprüfung durch die Ethik-Kommission entsprechend der deutschen Gesetzgebung mit der Erlaubnis 60442502 vom Regierungsbezirk Braunschweig durchgeführt.

Die Bioverteilungs-Studien und die imaging-Studien wurden an voll entwickelten männlichen New Mexico Research Institute-Mäusen (NMRI-Mäuse, Harlan, Borchon, Germany) mit einem Gewicht von etwa 30 g durchgeführt. Die Mäuse wurden einzeln in Standard-Käfigen auf Sägemehl-Streu gehalten. Futter- und Wasseraufnahme erfolgte *ad libitum*.

Vorher unbehandelten Tieren wurde 111 kBq des iodierten Tyramin-Stilbenderivates injiziert. Nach einer Stunde, 4 Stunden und 24 Stunden wurde jeweils eine Gruppe der Mäuse mit Kohlendioxid getötet und sofort danach seziiert. Die Masse der einzelnen Organe wurde bestimmt. Danach wurde die prozentuale Strahlendosis pro Gramm Gewebe in Bezug auf die injizierte Gesamtdosis (% i.d./g) bestimmt. Dazu wurden die von den einzelnen Organproben ausgehende Aktivität mit einem γ -Zähler vermessen. Die Mittelwerte und deren Standardabweichungen wurden jeweils für Gruppen aus drei Mäusen bestimmt.

Für einige typische Vertreter der optischen Aufheller aus der Klasse der Diaminostilbene liegen LD-Werte vor, die deren bemerkenswert geringe Toxizität gegenüber Warmblütern unterstreichen. Diese Fluoreszenzfarbstoffe sind unter physiologischen Bedingungen sehr reaktionsträge und unterliegen einer raschen Elimination. Auch das iodierte Blankophor wird von ansonsten unbehandelten Mäusen innerhalb von 24 Stunden zu 91.5 ± 4.7 % ausgeschieden. Wie erwartet kann eine leichte Retention der Aktivität in allen stark durchbluteten Körperbereichen, also in den inneren Organen, beobachtet werden. So zeigte der Magen eine starke Aktivität. Die Nieren als Hauptausscheidungsorgan zeigten in Übereinstimmung mit ihrer starken Durchblutung mit 0.44 ± 0.00 % i.d./g nach vier Stunden ebenfalls

wie erwartet eine erhöhte Aktivität. Korrespondierend mit der schnellen renalen Elimination sank diese Aktivität innerhalb von 24 Stunden auf 0.045 ± 0.003 % i.d./g ab.

Tab. 7: Mittelwerte der Bioverteilung des markierten Blankophor-Derivates in Mäusen in [% i.d./g] nach einer, vier und 24 Stunden und deren Standardabweichungen.

	% i.d./g nach 1 h	% i.d./g nach 4 h	% i.d./g nach 24 h
Herz	0.25±0.01	0.08±0.01	0.009±0.004
Lunge	0.44±0.02	0.11±0.01	0.017±0.006
Leber	0.40±0.06	0.22±0.03	0.021±0.001
Pankreas	0.29±0.07	0.11±0.01	0.007±0.002
Milz	0.22±0.00	0.07±0.01	0.008±0.004
Magen	1.05±0.15	0.71±0.14	0.024±0.007
Darm	0.47±0.27	0.23±0.11	0.013±0.007
Nieren	0.93±0.22	0.44±0.00	0.045±0.003
Knochen	0.46±0.22	0.07±0.02	0.008±0.002
Muskeln	0.30±0.23	0.07±0.01	0.007±0.004

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß alle zum Beginn der Syntheseüberlegungen erhobenen Forderungen, die an ein geeignetes Substrat gestellt werden müssen, erfüllt werden

- 1) hohe und selektive Affinität zu β -1,3 und β -1, 4-Polysacchariden
- 2) gute Löslichkeit in Wasser, um eine ausreichende Mobilität zu gewährleisten
- 3) rasche Iodierbarkeit

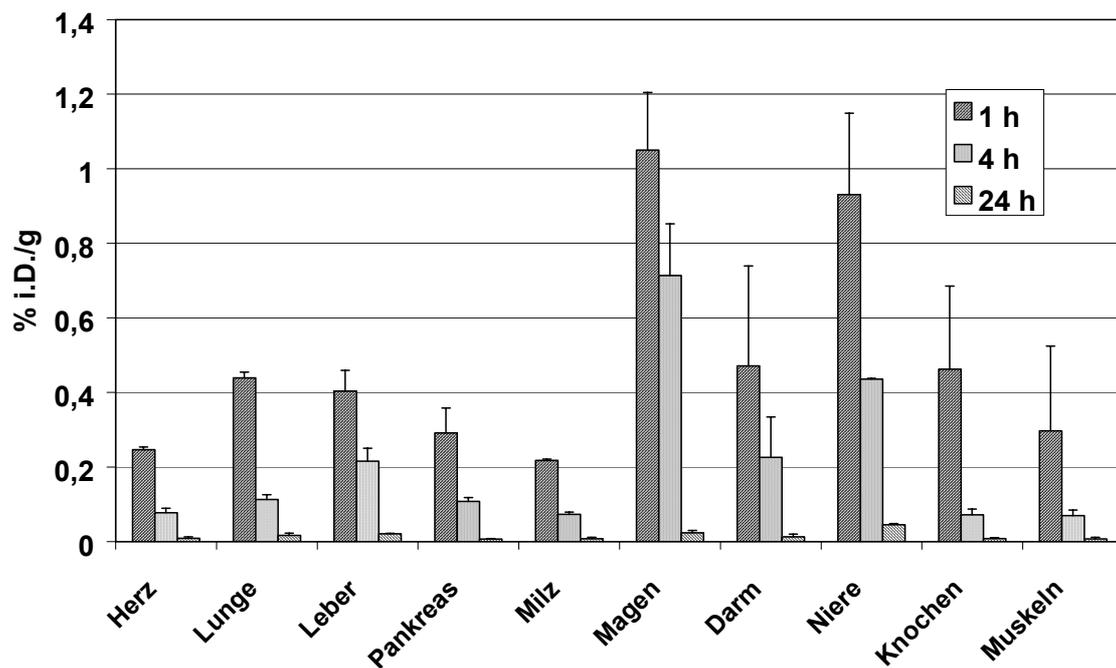


Abb. 19: Bioverteilung des markierten Blankophorderivates in Mäusen in [% i.d./g] nach einer, vier und 24 Stunden.

Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht vorbehaltlos als positiv eingestuft werden, da sich aus der verzögerten clearance in Magen, Darm und Niere ein für das gesamte Konzept grundlegende Fragestellung ergab.

Die Akkumulation in den genannten Organen ist nicht auf deren spezielle Funktion, sondern unspezifisch auf die starke Durchblutung zurückzuführen. Sofort nach der Injektion verteilt sich die Aktivität im Blut. Von besonders blutreichen Organen wird daher auch ein besonders hoher Anteil der Gesamtaktivität aufgenommen. Demnach muß in jeder Situation, in der ein Gewebe verstärkt durchblutet wird, eine entsprechende Anreicherung des radioaktiven Materials erwartet werden. Solch eine Situation ist zum Beispiel bei jedem entzündlichen Vorgang gegeben. Eine von radioaktivem Material ausgehende, aber nicht durch Anlagerung an Pilzbestandteile bedingte, verstärkte Aktivität könnte daher zu falsch positiven Aussagen führen.

Es mußte deshalb geklärt werden, ob eine nicht gewünschte unspezifische Anlagerung an verstärkt durchblutetes entzündliches Gewebe auftritt, ob eine gleichzeitig zur entzündlichen Reaktion die Detektion einer ebenfalls vorliegenden My-

kose beeinflussen kann und ob in diesem Fall eine Unterscheidung von unspezifisch entzündlichem Gewebe und mykotischen Bereichen möglich ist.

4.6 Untersuchungen zur Bindungs-Spezifität

Um diese Fragestellung untersuchen zu können, mußten Mäuse teilweise gleichzeitig beide, teilweise unabhängig voneinander nur eine der oben beschriebenen Erkrankungen aufweisen.

Um die Bindungs-Spezifität der markierten Komponenten *in vivo* zu untersuchen, wurden weitere drei Gruppen aus jeweils vier Mäusen gebildet. Diese Mäuse wurden mit Kohlendioxid betäubt. Den Tieren der ersten Gruppe wurde jeweils 50 µl einer wäßrigen Suspension von 2×10^9 autoklavierten *Candida albicans*-Zellen pro ml intramuskulär in den hinteren linken Oberschenkel injiziert. Den Tieren der zweiten Gruppe wurde jeweils 50 µl einer sterilisierten wäßrigen Suspension von 8×10^8 *E. coli* / ml intramuskulär in den hinteren rechten Oberschenkel injiziert. Den Tieren der dritten Gruppe injizierte man jeweils jeweils 50 µl einer wäßrigen Suspension von 2×10^9 autoklavierten *Candida albicans*-Zellen pro ml intramuskulär in den linken hinteren Oberschenkel und 50 µl einer sterilisierten wässrigen Suspension von 8×10^8 *E. coli* / ml intramuskulär in den hinteren rechten Oberschenkel. Zwei Stunden später injizierte man allen Tieren der ersten beiden Gruppen und zwei Tieren der dritten Gruppe 111 kBq des ^{125}I -markierten Blankophor-Derivates in die Schwanzvene. Zwei Stunden darauf wurden die Tiere wie beschrieben getötet. Nach der Sektion wurden die % i.d./g- Werte der Beine und die Verhältnisse der Werte der verschiedenen Gruppen zueinander berechnet.

Die Aktivität in den mit Hefen belasteten Muskeln war dabei deutlich größer als in den mit Bakterienzellen behandelten und durch die so hervorgerufene Entzündung verstärkt durchbluteten Muskeln. Die erregerefreien Muskeln zeigten in Übereinstimmung mit den Erwartungen eine deutlich niedrigere Aktivität als die infizierten Muskeln. Desweiteren konnte man ebenfalls eine höhere Aktivität in den mit Bakterienzellen versetzten Muskeln im Vergleich zu denjenigen Muskeln feststellen, in die lediglich ein identisches Volumen einer Natriumchlorid-Blindlösung injiziert wurde. Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, daß auch eine unspezifische

Entzündung, bzw. die daraus erwachsene verstärkte Durchblutung eine Erhöhung der hier zu messenden Aktivität verursacht. Die Scintigraphie zeigte außerdem eine stärkere Aufnahme der iodierten Verbindung in den Bereichen der Pilzinfektion im Vergleich mit den durch die Bakterieninjektion entzündeten Schenkeln. Insgesamt war die größte Aktivität in den *Candida*-belasteten Muskeln festzustellen.

Tab. 8 Vergleich der Anreicherung des markierten Blankophorderivates in den mit Pilz- oder Bakterienzellen infizierten Beinen von Mäusen in [% i.d./g]. Gruppe 1: *C. albicans* im linken Bein; Gruppe 2: Bakterienzellen im linken Bein; Gruppe 3: *C. albicans* im linken Bein, Bakterienzellen im rechten Bein

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Bein links [% i.d./g]	5.35±1.10	3.37±0.70	7.02±0.72
Bein rechts [% i.d./g]	2.97±0.51	2.37±0.05	4.42±0.94
Verhältnis links/rechts	1.80	1.42	1.59

Die infizierten Beine wurden anschließend präpariert. Die injizierten Hefezellen konnten durch die Fluoreszenz unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden.

Den zwei verbliebenen Mäusen der dritten Gruppe injizierte man 9 MBq des ¹³¹I-markierten Blankophor-Derivates und betäubte die Tiere daraufhin mit Hostaket, um die Bioverteilung mit einer γ -Kamera sichtbar zu machen. In der ersten Stunde nach der *i.v.*-Injektion des radioaktiv markierten Blankophor-Derivates ist die Bioverteilung der Aktivität hauptsächlich Ausdruck der (statistischen) Verteilung des Blutes im Organismus. Weil nun die markierte Substanz rasch über die Niere ausgeschieden wird, zeigt sich nach 24 Stunden außer im Bein mit *C. albicans*-Injektion eine nennenswerte Aktivität nur noch in den an der renalen Elimination beteiligten Organen und Kompartimenten.

Die Anreicherung der markierten Substanz in entzündetem Gewebe steht nach diesen Ergebnissen nicht im Zusammenhang mit einer evtl. unspezifischen Anlagerung an diese Gewebereiche. Vielmehr bewegt sich das Verhältnis der gemessenen Aktivitäten im gleichen Bereich, wie es auch in den Bioverteilungsstu-

dien zwischen Magen und Niere zu Muskeln und Leber festgestellt wurde. Darüberhinaus kann man feststellen, daß sich selbst unter störenden Einflüssen mit der hier vorgestellten Methode schon zwei Stunden nach der Injektion mykotische Gewebe deutlich erkennen lassen.

Diese Aktivitätsverhältnisse nehmen mit der Zeit zu, wie der unten abgebildete scintigraphische Scan einer weiteren Anwendung eindrucksvoll zeigt.

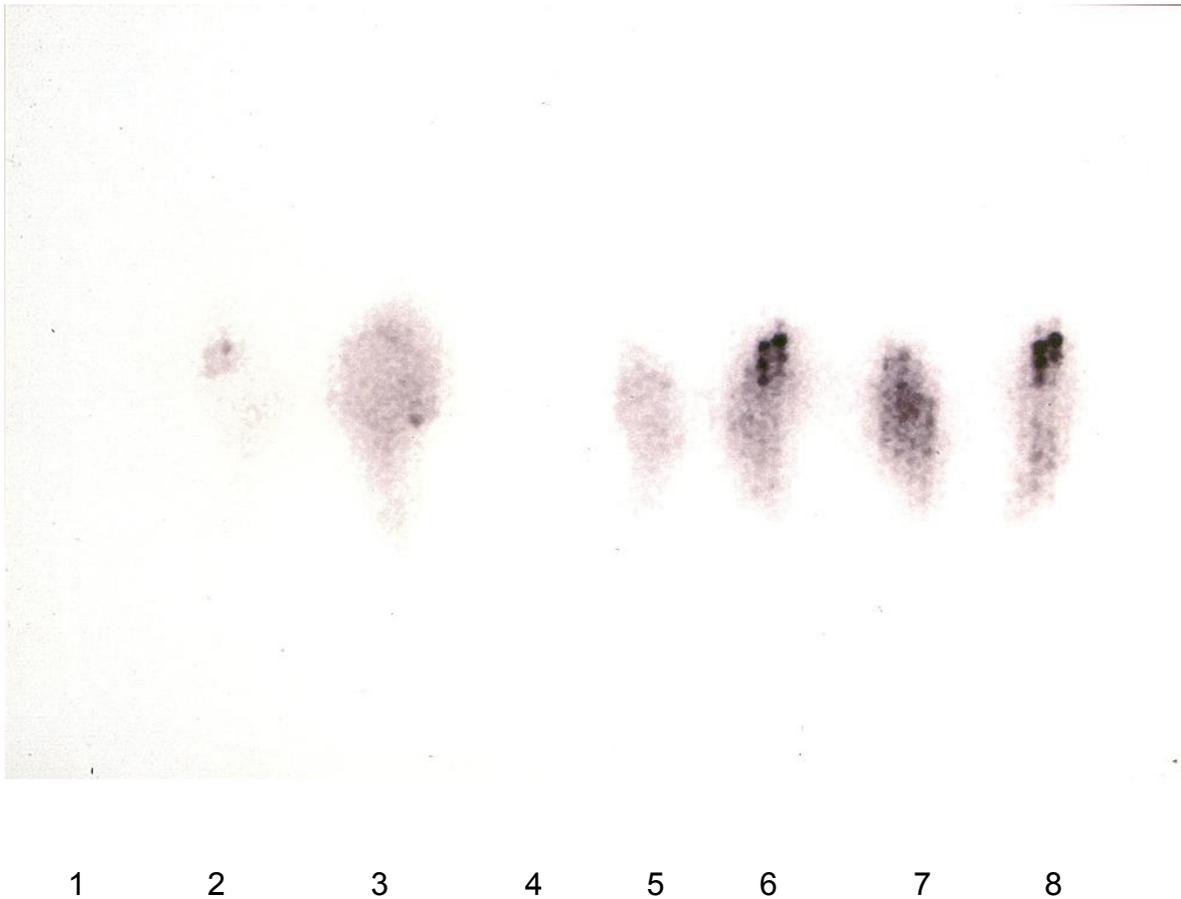


Abb. 20: Scintigraphischer Scan von Mäusen mit Lungen-Aspergillose 48 h nach einer Injektion des ^{131}I -markierten Radiodiagnostikums.

Behe und Rüchel haben das mit ^{131}I markierte **41** Mäusen injiziert, die zuvor intranasal mit 10^7 *Aspergillus fumigatus*-Conidien infiziert wurden. Nach 48 Stunden zeigten gesunde Kontrolltiere (1 und 4) keinerlei Retention des markierten Aufhellers.

5. Zusammenfassung

Die frühzeitige Diagnose systemischer Mykosen ist für eine erfolgversprechende Therapie von entscheidender Bedeutung. Die diagnostischen Werkzeuge der Medizin können dieser Aufgabe bislang nur schwer gerecht werden. Hauptsächlich werden klinische Proben aus Biopsien und respiratorischen Sekreten speziellen Färbeverfahren unterzogen, isolierte Erreger angezüchtet oder serologische Untersuchungen vorgenommen, deren Aussagefähigkeit allerdings noch umstritten ist. Manch andere Vorgehensweisen wurden vorgeschlagen, jedoch eignen sie sich weder für eine sehr frühe Diagnostik, noch als Standard-Laborverfahren. In der Therapie ist man zudem auf unzureichende Medikamente angewiesen, die im fortgeschrittenen Verlauf einer systemischen Mykose kaum eine sichere Erreger-Eradikation gewährleisten. Ihr Wirkspektrum überstreicht oft nicht alle Erreger, sie sind zum Teil nur fungistatisch oder rufen schwerste Nebenwirkungen hervor.

Einige Vertreter einer schon jetzt für diagnostische Färbeverfahren *in vitro* eingesetzten Substanzklasse weisen Eigenschaften auf, die sie für eine Weiterentwicklung geeignet erscheinen ließen. Die optischen Aufheller vom Typ der Tetranatrium-4,4'-bis-[[4-(*p*-sulfonato-phenylamino)-6-alkylamino-1,3,5-triazin-2-yl]-amino]-stilben-2,2'-disulfonate verfügen über eine spezifische und sehr hohe Affinität gegenüber β -Glykosiden, die in der Zellwand von allen Pilzen, nicht aber in menschlichen Zellen vorkommen. Vom Menschen gebildete Polysaccharide, z. B. gespeichertes Glykogen, sind α -Glykoside. Ihre sehr gute Wasserlöslichkeit bleibt auch in Gegenwart von physiologischen Elektrolytkonzentrationen erhalten. In geeigneter Weise substituiert sind sie nahezu inert. Umfangreiche Daten weisen diesen Substanzen eine sehr geringe Toxizität zu. Aus diesem Eigenschaftspool ergab sich das sehr breit angelegte Grundkonzept, mit Hilfe dieser optischen Aufheller andere Substanzen an die pilzspezifischen Strukturen heranzuführen. Um die Tragfähigkeit des Konzeptes nachzuweisen, konnte genauso eine therapeutische wie eine diagnostische Zielsetzung im Vordergrund stehen. Dabei bot sich bald die Entwicklung eines Diagnostikums an. Im Zentrum stand die Synthese eines Trägermoleküls, daß in der Lage sein sollte, ein Radionuklid selektiv an mykotischen Strukturen zu befestigen. Die nunmehr konzentriert am mykotischen Herd gebundene Strahlungsquelle sollte sich dann auch außerhalb des Körpers genau lokali-

sieren lassen. Ein solches Molekül sollte im Körper mobil sein, um möglichst alle von einer Mykose bedrohten Organe erreichen zu können. Es soll gleichzeitig geringstmögliche Wechselwirkungen mit körpereigenen Strukturen zeigen, um den Körper schnell wieder verlassen können, falls keine Mykose vorliegt. So werden keine ungerechtfertigten Strahlenbelastungen hervorgerufen. Durch die Auswahl von radioaktiven Nukliden des Iod als Signalgeber konnte auch die zu synthetisierende Struktur festgelegt werden. Da Tyramin sich mit präparativ einfachen Standardverfahren iodieren läßt, wurde als Substituent eine Triazinylamino-stilbensulfonsäure ausgewählt. Die extrem polaren Syntheseprodukte wurden wegen der Eigenarten der verwendeten Edukte stets von einer Vielzahl ebenfalls sehr polarer Nebenprodukte begleitet. Durch umfangreiche Variationen des Synthesemusters konnte schließlich eine Reaktionsführung ermittelt werden, die einige Nebenprodukte vermied und so ein Produkt zugänglich machte, daß für die Herstellung des Radiodiagnostikums verwendet werden konnte. Man variierte dazu verschiedene Parameter der Synthese, die vom Tetranatrium-4,4'-Bis-[(4-chloro)-6-(4-sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)]-amino]-trans-stilben-2,2'-disulfonat ausging. Durch mehrfache Chromatographie mit optimierten Laufmitteln konnten verschiedene Laufgeschwindigkeiten der sonst extrem eng aneinanderliegenden Banden erzeugt werden. Durch die Verwendung von Ammoniak als Bestandteil der Laufmittel wurde das Produkt gleichzeitig in sein Ammoniumsalz übergeführt, was eine sehr gute Wasserlöslichkeit mit sich brachte. Für die Produkte war vor allem entscheidend, daß sie markierbar und in der geforderten Weise bindungsfähig waren. Dabei kam es nicht auf ein einheitliches Produkt an. Gefordert waren leistungsfähige Moleküle. Das die angestrebten Substanzen vorlagen, konnte deshalb am besten durch die Überprüfung ihrer Wirksamkeit im Rahmen des vorgestellten Konzeptes bewiesen werden. Die rein qualitativen Vor- tests zur Bindungsfähigkeit des Tyraminderivates an Chitin und Cellulose, die sich auf das uniodierte Derivat bezogen, konnten in weiteren Bindungsstudien an autoklavierten *C. albicans*-Zellen mit Erfolg auf das radioaktive Derivat übertragen werden. Es konnte festgestellt werden, daß 52 % der insgesamt gebundenen Dosis an spezifische Bindungsstellen angelagert wurden. Durch die Experimente konnte nachgewiesen werden, daß trotz der Derivatisierung mit Tyramin und der nachfolgenden Iodierung die spezifische Affinität der Aufheller an die entsprechenden Glukane erhalten bleibt. Nicht spezifisch gebundene Anteile des radioak-

tiven Materials wurde von Mäusen innerhalb von 24 Stunden zu 91.5 ± 4.7 % eliminiert. Darüberhinaus konnte mit dem markierten Aufheller *in vivo* deutlich zwischen Depots mit *C. albicans*-Zellen und *E. coli* unterschieden werden, die in das linke oder rechte Hinterbein injiziert wurden. Lag nur ein Depot von *C. albicans* vor, konnte ein Verhältnis der Aktivitäten zwischen belastetem und unbelasteten Bein von 1.80 zu 1 festgestellt werden. Bei einem alleinigen *E. coli*-Depot wurde diese Verhältnis mit 1.42 zu 1 bestimmt. Das Aktivitätsverhältnis der Depots von *C. albicans* zu *E. coli* betrug 1.59 zu 1. Diese Ergebnisse sind nach zwei Stunden erhalten worden. Sie zeigen deutlich, daß das Konzept der Radiodiagnostik systemischer Mykosen tragfähig ist und so selbst unter störenden Einflüssen innerhalb kurzer Zeit ein Mykoseherd detektiert werden kann.

6. Materialien und Methoden

6.1 Allgemeines

Verwendete Abkürzungen

%i.d./g: Prozent injizierter Dosis pro Gramm (Organmasse), AA: Acrylamid, AmB: Amphotericin B, AP: Ammoniumperoxodisulfat, Ar: Arylrest, BAL: Bronchoalveoläre Lavage, BIS: N,N'-Methylen-bis-acrylamid, DC: Dünnschichtchromatographie, DMF: Dimethylformamid, DMSO: Dimethylsulfoxid, EE: Essigsäureethylester, Et: Ethyl, HPLC: Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie, HRCT: Hochauflösende Computertomographie, HSCCC: High Speed Counter Current Chromatographie, Me: Methyl, MRT: Magnetresonanztomographie, NY: Nystatin, R: Alkylrest, TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, THF: Tetrahydrofuran

HPLC: Analytische Anlage: Gerät I) Knauer HPLC-Anlage bestehend aus Spektral-Digital-Photometer A0293. zwei Pumpen Typ 64 A0307 und HPLC-Software V2.22 mit PC-XT Commodore, Mischkammer: A0285. Knauer Injektions-Schaltventil 6/1 A0263 (Typ Rheodyne); Probenschleife 20 µl. Gerät II) Jasco HPLC-Anlage bestehend aus Dioden-Array-Multiplewavelength Detector Jasco MD-910 mit Time acc. 800 ms, Wave acc. 4 nm, zwei Pumpen des Typs Jasco Intelligent Pump PU-987 mit Mischkammer, Rheodyne-Ventil mit 20 µl Probenschleife, Borwin HPLC-Software; Präparative Anlage: analog der analytischen, nur mit I) Knauer präparativer Durchflußküvette (d = 0.5 mm), Probenschleife 500 µl, II) Jasco präparativer Durchflußküvette (d = 1 mm), Probenschleife 500 µl; analytische Säulen: 1) Vertex 4 x 250 mm mit 4 x 4 mm Vorsäule, Stationäre Phase: Eurochrom Eurospher RP 100-C18, 5 µm, 2) Vertex 4.6 x 125 mm, Stationäre Phase: Hypersil RP 120-C18, 5 µm, 3) Vertex 4.6 x 250. Stationäre Phase: Nucleosil NP 100-C18, 5 µm, 4) Vertex 4.6 x 250. Stationäre Phase: LiChrosorb CN, 5 µm 5) Vertex 4.0 x 250. Stationäre Phase: LiChrosorb Diol, 5 µm, 6) Vertex 4.6 x 125. Stationäre Phase: Nucleosil CN , 5 µm, 7) Vertex 4.0 x 125. Stationäre Phase: Spherisorb Phenyl , 5 µm, 8) Vertex 4.0 x 125. Stationäre Phase: Polyencab A, 5 µm präparative Säulen: Vertex 16 x 250 mm mit 16 x 30 mm Vorsäule, Stationäre

Phase: Eurochrom Eurospher RP 100-C18, 5 μm ; Lösungsmittel für HPLC: Alle Eluenten wurden über Membranfilter (Wasser: Celluloseacetat, Porenweite 45 μm , Sartorius, Göttingen; Acetonitril: Filter RC-Vlies verstärkt, Porenweite 45 μm , Sartorius, Göttingen) filtriert und 15 min durch Ultraschall entgast; die Proben wurden durch ein PTFE-Filter (Minisart SRP15, Porenweite 0.20 μm , Sartorius, Göttingen) filtriert. Für die Trennung wurde durch fraktionierte Destillation zurückgewonnenes Acetonitril/Wasser-Azeotrop (83.7 % Acetonitril / 16.3 % Wasser, Siedepunkte: 78.5 °C) eingesetzt. – **Massenspektren**: EI-MS mit Varian MAT 731 (70 eV), Varian 311A (70 eV), AMD-402 (70 eV). Hochauflösung: Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz. DCI-MS: Finnigan MAT 95 A, Reaktandgas: NH_3 ; (+)ESI-MS mit Quattro Triple Quadrupole Mass Spectrometer, Finnigan TSQ 7000 mit nano-ESI-API-Ionenquelle; ESI-MS LCQ (Finnigan). – **$^1\text{H-NMR-Spektren}$** : Varian XL 200 (200 MHz), Varian VXR 200 (200 MHz), Varian VXR 300 (300 MHz), Bruker WM 300 (300 MHz), Bruker Advance DRX 500 (500 MHz), Varian INOVA 500 (500 MHz), Varian VXR 500 (500 MHz). – **$^{13}\text{C-NMR-Spektren}$** : Varian XL 200 (50.3 MHz), Varian VXR 200 (50.3 MHz), Varian VXR 300 (75.5 MHz), Bruker WM 300 (75.5 MHz), Bruker Advance DRX 500 (125.7 MHz), Varian INOVA 500 (125.7 MHz), Varian VXR 500 (125.7 MHz). – **HSCCC**: HSCCC Ser #679 mit Triple Coil No. 14 (PC.INC.) mit 10 ml Probenschleife, LKB HPLC Pumpe 2150 (Pharmacia) – **Gelelektrophorese**: Es wurden Gele der Dimension 15×20 cm gegossen. PantaPhor Standard Elektrophorese Apparatur (Labor-Müller KG, Hann.Münden), Schleicher & Schuell BIOTRAP BT 1000. Ref. No.447700 (in den USA und in Canada unter dem Namen ELUTRAP vertrieben) sowie die zugehörigen Membrane BT1 und BT2. Camag Power Supply Typ 63050. 220 / 5000V; Die eluierende Elektrophorese mit der BIOTRAP-Apparatur wurde bei 200 V durchgeführt. Die Stromstärke ergab sich jeweils aus dem verwendeten Puffer. – **γ -Detektor**: Model 1185 R Automatic Gamma System Searle Analytic Inc. Alle Proben wurden für jeweils eine Minute vermessen.

6.2 Materialien

Dünnschichtchromatographie (DC): DC-Folien Polygram SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel & Co., Düren). R_f -Werte beziehen sich, wenn nicht anders angegeben,

auf das angegebene Laufmittel an neutralem Kieselgel. – **Präparative Dick-schichtchromatographie (PDC)**: Kieselgel P/UV₂₅₄ (55 g/100 ml Wasser, Macherey-Nagel & Co.) goß man auf waagrecht liegende Glasplatten (20 × 40 cm oder 2 je 20 × 20 cm), ließ an der Luft trocknen und aktivierte 4 h bei 130 °C. – **Säulenchromatographie (SC)**: MN Kieselgel 60: 0.05 - 0.2 mm, 70 - 270 mesh (Macherey-Nagel & Co.); Kieselgel für Flash-Chromatographie: 30 - 60 µm (J. T. Backer); Modifiziertes Kieselgel für Flash-Chromatographie: 40 – 63 µm LiChroPrep-DIOL[®] (Merck); Die Säulen wurden naß gefüllt. – **Glasfasertiefenfilter**: No 6. 150 mm No 370008 (Schleicher & Schuell). – **Chemikalien, Reagenzien**: BIS: Biomol, Ilvesheim, AA, TEMED: Serva, Heidelberg, Amberlyst 15. 20 –50 mesh, Fluka, NaOH-microprills sind etwa 1 mm große NaOH-Kügelchen. Di-Natrium-4,4'-bis[[4-anilino-6-chloro-1,3,5-triazin-2yl]amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat und Tetranatrium-4,4'-bis[[4-(*p*-sulfoanilino)-6-chloro-1,3,5-triazin-2yl]amino]-*trans*-stilben-2,2'-tetrasulfonat wurden von der Bayer AG, Leverkusen bereitgestellt. Natriumiodid aus ¹²⁵I und ¹³¹I : MDS Nordion Europe S.A., Fleurus, Belgien. Hostaket: Hoechst Roussel Vet GmbH, Wiesbaden / Rompun BayerVital, Leverkusen.

Sprühreagenzien: Echtblausalz B - Lösung A) 0.5 g Echtblausalz B (3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenyldiazoniumchlorid-Zinkchlorid-Doppelsalz) wurden mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Nur frisch verwenden! Lösung B): 0.4 g NaOH wurden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Man sprühte nacheinander mit Lösung A und Lösung B Phenole und kupplungsfähige Amine werden blau bis braun gefärbt. – **Silbernitrat / Fluorescein**: Lösung A) 1 g Silbernitrat wurden mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Lösung B): 50 mg Fluorescein wurden mit Ethanol auf 50 ml aufgefüllt. Direkt vor Gebrauch wurden 5 ml Lösung A mit 25 ml Lösung B gemischt. Wenn aus der Lösung tief rote Kristalle ausfallen, ist sie nicht mehr verwendbar! Alkyl- und Arylsulfonsäuren geben gelbe Flecken auf tief rosa Untergrund.

6.3 Elektrophorese

Falls nicht anders vermerkt, wurden die Proben in Probenpuffer gelöst in die Gele eingebracht. Der Probenpuffer bestand aus 2 ml Glycerin, 5 ml Wasser und jeweils 3 ml der auch als Umlauf - / Trenngelpuffer verwendeten Pufferlösung.

6.3.1 Pufferlösungen

Na-phosphat-Puffer (25 mM) pH 7.1: Lösung A: 89.0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 500 ml Wasser gelöst und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Lösung B: 78.0 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 500 ml Wasser gelöst und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Von Lösung A wurden 69.6 ml mit 30.4 ml Lösung B vermischt und auf 2000 ml aufgefüllt. Zur Elektrophorese mit Pufferumlauf wurde der gleiche Puffer verwendet, mit dem auch das Trenngel gegossen wurde.

Boratpuffer (3.5 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 38 mM H_3BO_3 , 10 mM NaCl) pH 8,2: 11.78 g H_3BO_3 wurden in 4 l Wasser gelöst (dauert lange), 6.60 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ und 2.78 g NaCl zugefügt und vollständig gelöst. Man füllte mit Wasser auf 5000 ml auf. Um Puffer geringerer Konzentration zu erhalten, wurde ein genau abgemessenes Volumen dieser Lösung auf das doppelte oder 10fache Volumen aufgefüllt. Zur Elektrophorese mit Pufferumlauf wurde der gleiche Puffer verwendet, mit dem auch das Trenngel gegossen wurde.

6.3.2 Betriebsparameter

Betriebsparameter für Gele mit Phosphatpuffer: Mit diesem Puffer wurden Gele von 3 mm gegossen, die mit Pufferumlauf und einer Stromstärke von 90 mA an bis zu 200 Volt verwendet wurden. Unabhängig von der angelegten Spannung ist die angestrebte Stromstärke das limitierende Parameter! Während der ersten 3 Stunden wurden nur etwa 75 % der als Maximalwert angegebenen Spannung angelegt. **Standardgel mit Phosphatpuffer:** Unmittelbar bevor mit diesem Puffer ein Gel hergestellt wurde, hat man 155 ml des auf 10 °C gekühlten Puffer bei 200 hPa für 10 min in einem Ultraschallbad entgast. In 150 ml des auf 10 °C gekühlten Puffers wurden 8.55 g AA und 0.45 g BIS gelöst und filtriert. In einem Erlenmeyerkolben mit Magnetrührer wurde in diese Lösung 50 mg Na_2SO_3 eingetragen und so lange gerührt, bis es sich vollständig gelöst hatte. Daraufhin wurde der Rührer abgeschaltet. Nun wurden 0.1 ml TEMED (Serva) vorsichtig auf die Oberfläche der Lösung geschichtet und bei geringster Umdrehungszahl des Rührers eingerührt. Direkt vor dem Gießen der Gele wurden in diese Monomer-Lösung 2.8 ml einer frisch angesetzten 2proz. wäßrigen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung zügig eingerührt. Die Polymerisation fand im Kühlraum bei 3 °C und zusätzlicher Was-

serkühlung statt, um die Bildung von Gasbläschen zu vermeiden. **Betriebsparameter für Gele mit Boratpuffer:** Mit diesem Puffer wurden Gele von 3 mm und 10 mm Dicke gegossen, die jeweils mit Pufferumlauf und einer Stromstärke von 100 mA an bis zu 300 Volt (3 mm) und bis zu 120 Volt (10 mm) verwendet wurden. Unabhängig von der angelegten Spannung ist die angestrebte Stromstärke das limitierende Parameter! Während der ersten 3 Stunden wurden nur etwa 75 % der als Maximalwert angegebenen Spannung angelegt. **Standardgel 3 mm mit Boratpuffer:** Unmittelbar bevor mit diesem Puffer ein Gel hergestellt wurde, hat man 155 ml des auf 10 °C gekühlten Puffers bei 200 hPa für 10 min in einem Ultraschallbad entgast. In 150 ml des auf 10 °C gekühlten Puffers wurden 8,55 g AA und 0.45 g BIS gelöst und filtriert. In einem Erlenmeyerkolben mit Magnetrührer wurde in diese Lösung 50 mg Na₂SO₃ eingetragen und so lange gerührt, bis es sich vollständig gelöst hatte. Daraufhin wurde der Rührer abgeschaltet. Nun wurden 0.1 ml TEMED (Serva) vorsichtig auf die Oberfläche der Lösung geschichtet und bei geringster Umdrehungszahl des Rührers eingerührt. Direkt vor dem Gießen der Gele wurden in diese Monomer-Lösung 2.8 ml einer frisch angesetzten 2proz. wässrigen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung zügig eingerührt. Die Polymerisation fand im Kühlraum bei 3 °C und zusätzlicher Wasserkühlung statt, um die Bildung von Gasbläschen zu vermeiden. **Standardgel 10 mm mit Boratpuffer:** Unmittelbar bevor mit diesem Puffer ein Gel hergestellt wurde, hat man 355 ml des auf 10 °C gekühlten Puffer bei 200 hPa für 10 min in einem Ultraschallbad entgast. In 350 ml des auf 10 °C gekühlten Puffers wurden 20.0 g AA und 1.05 g BIS gelöst und filtriert. In einem Erlenmeyerkolben mit Magnetrührer wurde in diese Lösung 117 mg Na₂SO₃ eingetragen und so lange gerührt, bis es sich vollständig gelöst hatte. Daraufhin wurde der Rührer abgeschaltet. Nun wurden 0.23 ml TEMED (Serva) vorsichtig auf die Oberfläche der Lösung geschichtet und bei geringster Umdrehungszahl des Rührers eingerührt. Direkt vor dem Gießen der Gele wurden in diese Monomer-Lösung 6.53 ml einer frisch angesetzten 2proz. wässrigen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung zügig eingerührt. Die Polymerisation fand im Kühlraum bei 3 °C und zusätzlicher Wasserkühlung statt, um die Bildung von Gasbläschen zu vermeiden. **Herstellung sehr dichter Gele 10 mm mit Boratpuffer:** Zur Elektrophorese wurde dieser Puffer gegebenenfalls verdünnt. Unmittelbar bevor mit diesem Puffer ein Gel hergestellt wurde, hat man 330 ml des auf 10 °C gekühlten Puffer entgast. Dazu wurde der Puffer bei 200 hPa für 10 min in

ein Ultraschallbad gestellt. Zum Gießen der Gele werden 144 g AA und 3.75 g BIS in 300 ml des zuvor entgasten und auf 10 °C gekühlten Puffers gelöst und filtriert. In einem Erlenmeyerkolben mit Magnetrührer wurde in diese Lösung 800 mg Natriumsulfit eingetragen und so lange gerührt, bis es sich vollständig gelöst hatte. Daraufhin wurde der Rührer abgeschaltet. Nun wurden 1.70 ml TEMED vorsichtig auf die Oberfläche der Lösung geschichtet und bei geringster Umdrehungszahl des Rührers eingerührt.

Erst direkt vor dem Gießen der Gele wurden in diese Monomer-Lösung 4.5 ml einer frisch angesetzten 2proz. wäßrigen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung zügig eingerührt. Die Polymerisation fand im Kühlraum bei 3 °C und zusätzlicher Wasserkühlung statt, um die Bildung von Gasbläschen zu vermeiden. Besonders bei Gelen, die dicker als 5 mm sind, hat sich diese Vorgehensweise als zwingend herausgestellt, da die bei der Polymerisation entstehende Wärme ansonsten eine gleichmäßige, rißfreie und reproduzierbare Gelbildung verhindert.

6.3.3 Vorproben an der Miniaturelektrophorese

Bei 5 °C wurde analog zu der Herstellung von Standardgelen 30 ml der jeweiligen Gelmischung zubereitet. Man hielt sofort beidseitig offene Schmelzpunktbestimmungskapillaren so in die Gelmischung, daß sich die Kapillaren selbständig etwa 4 cm hoch mit der Mischung füllten und die obere Hälfte der Kapillare frei blieb. Dann wurden beide Seiten mit Knetgummi verschlossen und zur Polymerisation aufrecht stehend bei 5 °C gelagert. Zum Gebrauch wurden beide Enden des Glasröhrchens auf Höhe der Knetgummistopfen mit einem Korund angeritzt und vorsichtig abgebrochen. In 1 ml Wasser wurde 1 mg Probensubstanz gelöst. Man versetzte die Lösung mit 0.1 ml Glycerin, mischte gut durch, gab mit einer fein ausgezogenen Pipette eine 2 mm hohe Schicht dieser Lösung in die Kapillare und füllte mit dem zur Gelherstellung benutzten Puffer auf. Mit der gelgefüllten Seite nach unten wurde die Kapillare durch das Septum der Miniaturelektrophoreseapparatur geschoben. Beide Pufferreservoirs wurden so mit dem gleichen Puffer gefüllt, daß beide Gelen Kontakt zu jeweils einem Pufferreservoir hatten. Die Kontaktdrähte wurden in die Pufferlösungen gesenkt und mit der Stromquelle verbunden. Man betrieb die Kapillargele mit 15 mA an maximal 80 V.

6.4 Inbetriebnahme der HSCCC

Die Coil wurde bei einer maximalen Pumpleistung von 30 ml/min und einem Maximaldruck von 10 bar gefüllt. Hoher Druck und zu hohe Fließgeschwindigkeiten (Erwärmung niedrig viskoser Flüssigkeiten) können die Coil beschädigen. Der Rotor wurde bei niedriger Pumpleistung langsam gestartet. Ergaben sich starke Vibrationen, wurden die Gegengewichte der Coil entsprechend verändert. Danach wurde zuerst der Rotor ausgeschaltet. Nachdem er zum Stillstand gekommen war, wurde auch die Pumpe abgestellt. Nun wurde das Lösungsmittelreservoir gegen die mobile Phase ausgetauscht; Luftblasen vermeiden. Der Auslaß wurde in einem 100 ml Meßzylinder fixiert. Zum Equilibrieren wurde die Pumpe mit einer Flußrate von 1 l/min gestartet. Um ein Bersten der dünnen Coil-Wicklung zu vermeiden, wurde der von der Pumpe maximal gelieferte Druck auf ca. 200 psi entsprechend 14 bar begrenzt. Nach 10 sek wurde der Rotor angeschaltet und langsam auf die entsprechende Umdrehungszahl gebracht. Dabei trat erst nur stationäre Phase aus. Als die mobile Phase durchbrach, als sich also erkennbar im Meßzylinder zwei Phasen bildeten, wurde der Meßzylinder bei ansonsten unveränderten Einstellungen gewechselt. Dadurch konnte besonders gut festgestellt werden, wann nur noch sehr wenig bis gar keine stationäre Phase mehr austrat. Traten bei equilibriertem Lösungsmittelsystem wegen der Dichteunterschiede der beiden Phasen nun wieder Vibrationen auf, wurde der Rotor erneut austariert. Dazu wurde erst der Rotor ausgeschaltet und sofort nach dessen Stillstand auch die Pumpe, um möglichst wenig stationäre Phase zu verdrängen. Nun wurde die Proben substanz in der geringstmöglichen Menge mobiler Phase gelöst. (Da eine verstopfte HSCCC-Coil unter Umständen unrettbar zerstört ist, sind an die zu injizierenden Probelösungen mindestens gleiche Ansprüche zu stellen wie an eine HPLC-Probe!). Nachdem man die Probelösung durch ein 2 µm Membranfilter filtrierte, wurde sie luftblasenfrei in die Probenschleife injiziert. Der Meßzylinder wurde durch einen Fraktionssammler ersetzt und anschließend wie schon bei der Equilibrierung beschrieben erst die Pumpe und danach der Rotor gestartet.

6.5 Herstellung der Puffersalzmischung

36.1 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat und 13.9 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat zermahlte man einzeln zu feinen Pulvern, deren Korngröße 0.2 mm nicht überstieg. Danach wurden beide pulverisierten Salze grob vermischt und dreimal durch ein Sieb mit 0.8 mm Maschenweite gegeben.

6.6 Tierversuche

Man verwendete voll entwickelte männliche New Mexico Research Institute-Mäuse (NMRI-Mäuse, Harlan, Borchon, Germany) mit einem Gewicht von etwa 30 g. Die Mäuse wurden einzeln in Standard-Käfigen auf Sägemehl-Streu gehalten. Futter- und Wasseraufnahme erfolgte *ad libitum*. Man verwendete *Candida albicans* CBS 2730 vom Centralbureau voor Schimmelcultures in Baarn, Niederlande und *Escherichia coli*-Bakterien. Die *Candida*-Impflösungen wurden aus über Nacht in Sabouraud Glukosebrühe (SGB) gewachsenen Kulturen und wäßriger Natriumchlorid-Lösung (0.2 mg/ml) hergestellt. Die Kolonien bildenden Einheiten (colony forming units, cfu) in den Impflösungen wurden durch Hempcytometrie bestimmt. Eine Kontrolle fand durch Wuchstests auf Sabouraud Glucose-Agar (SGA) statt. PBS (Phosphate Buffered Saline, Isotonische phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung): 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ und 0.24 g KH₂PO₄ wurden mit Wasser auf nahe 1000 ml aufgefüllt, mit 5 N NaOH auf pH 7.4 eingestellt und volle 1000 ml aufgefüllt.

7. Untersuchungen zum Aufbau der Aufheller

7.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

7.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 zur Umsetzung von Tetranatrium-4,4'-bis-[(4-chloro)-6-(*p*-sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat (**6**) mit Aminen und Alkoholen (AAV 1)

In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler suspendierte man 5.13 g (5 mmol) **6** in 50 ml 20proz. wäßriger NaCl-Lösung, fügte 10 mmol des jeweiligen Amino- oder Hydroxy-Derivates zu und erwärmte auf 100 °C. Dabei setzte man die zur Neutralisation des freiwerdenden HCl und der gegebenenfalls in den Edukten vorliegenden sauren Gruppen oder daran gebundener Säure theoretisch benötigte Menge Na₂CO₃ als 1 molare Lösung so zu, daß der pH-Wert der Reaktionsmischung immer neutral blieb. Bei α,ω -Diaminen wurde kein zusätzlicher Säurefänger eingesetzt. Diese Edukte wurden so langsam zugegeben, daß der pH-Wert der Reaktionsmischung immer neutral blieb. Die Reaktion galt als beendet, wenn 15 min lang keine Na₂CO₃-Lösung zur Neutralisation mehr zugesetzt werden mußte. Man ließ noch weitere 15 min rühren, gab anschließend 5 g Puffersalzmischung sowie 10 g KCl zu und ließ abkühlen. Die erhaltenen Suspensionen wurden im leichten Vakuum durch ein mit einem Glasfaser-Tiefenfilter bedecktes grobes Papierfilter filtriert. Den Filterkuchen überführte man in ein Becherglas, schlämmte mit der 5fachen Menge Wasser auf und ließ 3 h bei Raumtemp. rühren. Im Folgenden filtrierte man erneut auf die oben beschriebene Weise, trocknete bei 40 °C i. Vak. und kristallisierte aus einer Mischung aus DMF und Ethanol (1:9) um.

7.1.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 zum Aufbau von 4,4'-Bis-[[4-(*p*-sulfo-phenylamino)-6-(alkylamino/alkoxy)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonsäuren (AAV 2)

In einem Braunglas-Zweihalskolben legte man unter Eiskühlung 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in 30 ml Aceton vor und setzte 20 mmol des jeweiligen Spacers ohne weiteres Lösungsmittel zu. Innerhalb von 30 min gab man das zur Neutralisation der theoretisch bei der Reaktion freiwerdenden Menge HCl, der gegebenenfalls an die Spacer gebundenen HCl sowie in den Spacer-Molekülen vorhandenen sauren Gruppen gerade ausreichende Volumen 1 N NaOH-Lösung so zu, daß der pH-Wert in dem Bereich von 6.5-7 blieb. Anschließend gab man 3.46 g (20 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) zu und versetzte zügig mit 0.8 g NaOH-microprills. Man erwärmte 3 h auf 35-40 °C und gab 20 ml 1 N NaOH so zu, daß die Reaktionslösung einen pH-Wert zwischen 6.5-7 besaß. Anschließend destillierte man das Lösungsmittel i. Vak. ab, versetzte mit einer Suspension aus 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) in 30 ml 1,4-Dioxan, gab zügig 0.8 g NaOH-microprills zu, spülte mit 10 ml Wasser nach und erwärmte auf 100 °C und beließ 5 h bei dieser Temperatur. Währenddessen hielt man den pH-Wert der Reaktionsmischung durch Zugabe von 20 ml 1 N NaOH-Lösung neutral. Man ließ auf 50 °C abkühlen, fügte 20 ml konz. HCl zu und ließ den ausgefallenen Feststoff absitzen. Man filtrierte und wusch den Filterkuchen so lange mit Eiswasser, bis das Filtrat der Suspension nur noch leicht saure Reaktion zeigte.

7.1.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 zum Aufbau von 4,4'-Bis-[[4-(*p*-sulfo-phenylamino)-6-(alkylamino/alkoxy)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonsäuren (AAV 3)

In einem Braunglas-Zweihalskolben wurden unter Eiskühlung 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in 30 ml Aceton vorgelegt und 20 mmol des jeweiligen Spacers ohne weiteres Lösungsmittel zugesetzt. Innerhalb von 30 min gab man das zur Neutralisation der theoretisch bei der Reaktion freiwerdende Menge HCl, der gegebenenfalls an die Spacer gebundene HCl sowie in den Spacer-Molekülen vorhandenen sauren Gruppen gerade ausreichende Volumen 1 N NaOH-Lösung so zu, daß der pH-Wert immer bei 6.5-7 blieb. Anschließend gab man 3.70 g (10

mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) zu und versetzte zügig mit 0.8 g NaOH-microprills. Man erwärmte 3 h auf 35-40 °C und fügte 20 ml 1 N NaOH so zu, daß der pH-Wert im Bereich von 6.5-7 blieb. Anschließend destillierte man das Aceton i. Vak. ab, versetzte mit einer Suspension aus 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure in 50 ml 1,4-Dioxan, gab zügig 1.6 g NaOH-microprills hinzu, spülte mit 10 ml Wasser nach und erwärmte zum Rückfluß. Innerhalb von 5 h hielt man die Reaktionsmischung durch Zugabe von 20 ml 1 N NaOH-Lösung neutral bis leicht sauer. Man ließ auf 50 °C abkühlen, gab 50 ml konz. HCl zu und ließ den ausgefallenen Feststoff absitzen. Man filtrierte, schlämmte den Filterkuchen erneut mit 50 ml konz HCl auf, filtrierte erneut und schlämmte dann wiederholt mit 50 ml Eiswasser auf, bis das Filtrat der Suspension nur noch leicht saure Reaktion zeigte.

7.1.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 zum Aufbau von 4,4'-Bis-[[4-(*p*-sulfo-phenylamino)-6-(alkylamino/alkoxy)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonsäuren (AAV 4)

In einem Braunglas-Zweihalskolben wurden unter Eiskühlung 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in 30 ml Aceton vorgelegt und 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) zugesetzt. Innerhalb einer halben Stunde gab man 40 ml 1 N NaOH-Lösung so zu, daß der pH-Wert immer bei 6.5-7 lag. Man fügte 20 mmol der Spacerkomponenten zu und erwärmte auf 35-40 °C. Innerhalb von 3 h gab man das zur Neutralisation der theoretisch bei der Reaktion freiwerdende HCl-Menge, der gegebenenfalls an die Spacer gebundenen HCl sowie in den Spacer-Molekülen vorhandenen sauren Gruppen gerade ausreichende Volumen 1 N NaOH-Lösung so zu, daß der pH-Wert immer bei 6.5-7 lag. Anschließend destillierte man das Aceton bei 100 hPa ab, versetzte mit einer Suspension aus 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) in 50 ml 1,4-Dioxan, spülte mit 10 ml Wasser nach und erwärmte zum Rückfluß. Innerhalb von 5 h hielt man die Reaktionsmischung durch Zugabe von 60 ml 1 N NaOH-Lösung neutral bis leicht sauer. Man ließ auf 50 °C abkühlen, gab 50 ml konz. HCl zu und ließ den ausgefallenen Feststoff absitzen. Man filtrierte, schlämmte den Filterkuchen erneut mit 50 ml konz HCl auf, filtrierte erneut und schlämmte dann wiederholt mit 50 ml

Eiswasser auf, bis das Filtrat der Suspension nur noch leicht saure Reaktion zeigte.

7.1.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 zur Umsetzung von Tetranatrium-4,4'-bis-[(4-chloro)-6-(*p*-sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat mit Aminen und Alkoholen (AAV 5):

In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler suspendierte man 2.50 g (2.4 mmol) **6** in 50 ml einer Mischung aus gleichen Volumina Tripropylamin, DMSO und DMF fügte 10 mmol der jeweiligen Spacerkomponente und 50 mg Tetrahexylammoniumiodid zu und ließ 5 h unter Rückfluß rühren. Man tropfte die noch heiße Lösung langsam in 1.5 l getrockneten, heftig gerührten Diethylether, ließ die ausgefallenen Produkte absitzen, dekantierte die Lösungsmittel ab und kristallisierte aus DMF / Ethanol (1:9) um.

7.1.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 zur Umsetzung von Tetranatrium-4,4'-bis-[(4-chloro)-6-(*p*-sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat (AAV 6):

In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler suspendierte man 2.50 g (2.4 mmol) **6** in 50 ml einer Mischung aus gleichen Volumina Tributylamin, DMSO, DMF und Toluol, fügte 10 mmol der jeweiligen Spacerkomponente und 50 mg Tetrahexylammoniumiodid zu und ließ 5 h unter Rückfluß rühren. Man tropfte unter starkem Rühren die noch heiße Lösung langsam in 1.5 l wasserfreien Et₂O, ließ die ausgefallenen Produkte absitzen, dekantierte die Lösungsmittel ab und kristallisierte aus DMF / Ethanol (1:9) um.

7.1.7 Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 zur Umsetzung von Tetranatrium-4,4'-bis-[(4-chloro)-6-(*p*-sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat mit Aminen und Alkoholen (AAV 7)

In einen Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler gab man zu 2.50 g (2.4 mmol) **6** 10 mmol der entsprechenden Spacerkomponente. Wenn es sich bei dieser nicht um ein α,ω -Diamin handelte, wurden zusätzlich 2.5 ml Tributylamin zugesetzt. Man ließ 5 h bei 120 °C rühren und auf 100 °C abkühlen. Nachdem 100 ml halbkonzentrierte HCl zugesetzt wurden, brach man die leicht blasigen Produkte im Reaktionskolben mit einem Teflonstab auf und zerrieb sie zu einem feinen Pulver. Man filtrierte, schlämmte den Filterkuchen in 100 ml Wasser auf, filtrierte abermals und digerierte den Filterkuchen in 50 ml Diethylether. Man filtrierte erneut und trocknete bei 20 °C i. Vak.

7.2 Umsetzungen mit Tyramin-Hydrochlorid

Tetrakalium-4,4'-bis-[(4-(*p*-hydroxyphenyl)-ethylamino)-6-(*p*-sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: a) Gemäß AAV 1 wurden 5.13 g (5 mmol) **6**, 1.73 g (10 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) und 20 ml 1N NaOH-Lösung (20 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt ein orangegelbes, nach Umkristallisation hellgelbes, durch HPLC (C18, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O bzw. 0.1proz. TFA) sowie durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) nicht trennbares Produktgemisch.

b) In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler wurden 25 ml eiskaltes Aceton vorgelegt, unter Rühren 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) zugefügt und nach 3 min 30 g Eis, 15 g NaCl und 30 ml Wasser versetzt. Zu dieser Mischung wurden 2.74 g (20 mmol) Tyramin (**24**) als 0.25 molare, mit Na₂CO₃ neutralisierte Tyramin-Hydrochlorid-Lösung gegeben. Unter Eiskühlung wurde 2 h gerührt. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wurde stets durch 0.25 molare Na₂CO₃-Lösung im neutralen bis leicht sauren Bereich gehalten. Nachdem 40 ml Na₂CO₃-Lösung verbraucht waren, ließ man noch 15 min rühren. Anschließend gab man 3.46 g (20 mmol) Sulfanilsäure (**10**) als 0.25 molare, mit Na₂CO₃ neutralisierte Lösung zu und

erwärmte auf 35 °C. Die Reaktionsmischung wurde durch 0.25 molare Na₂CO₃-Lösung neutral bis leicht sauer gehalten. Nachdem 40 ml Na₂CO₃-Lösung verbraucht waren, ließ man noch 15 min rühren. Anschließend gab man 3.70 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) als 0.25 molare, mit Na₂CO₃ neutralisierte Lösung zu und erwärmte die Mischung auf 95 °C. Die Reaktionsmischung wurde durch 0.25 molare Na₂CO₃-Lösung neutral bis leicht sauer gehalten. Nachdem 40 ml Na₂CO₃-Lösung verbraucht waren, gab man 10 g Puffersalzmischung zu, ließ 15 min nachrühren, kühlte die Lösung auf 20 °C ab und versetzte mit 20 g KCl. Die Flüssigkeit der erhaltenen Suspensionen wurde mit sehr geringem Unterdruck durch ein mit einem Glasfaser-Tiefenfilter bedecktes grobes Papierfilter filtriert. Der Filterkuchen wurde in ein Becherglas überführt, zweimal hintereinander mit der 3fachen Menge Wasser aufgeschlämmt, 3 h bei Raumtemp. gerührt, wie oben filtriert, bei 40 °C i. Vak. getrocknet und aus einer Mischung aus DMF und Ethanol (1:9) umkristallisiert. Man erhielt ein intensiv gelbes Pulver, das im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) neben acht weiteren zwei intensiv fluoreszierenden Zonen (366 nm) bei $R_f = 0.51$ und $R_f = 0.55$ zeigte. Nach PDC im selben Laufmittel konnte nur die Probe die aus der Zone mit $R_f = 0.51$ hervorgegangene Probe durch HPLC (Nitrilphase, CH₃CN-H₂O-Aceotrop / 50 mmolarer Phosphatpuffer pH 7.1) teilweise aufgetrennt werden, zeigte im Dünnschichtchromatogramm jedoch neben der ursprünglichen Zone 10 weitere Komponenten mit R_f -Werten von 0.13 bis 0.64 von denen 7 Zonen vorher nicht aufgetreten waren.

c) In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler wurden 25 ml eiskaltes Aceton vorgelegt, 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) eingerührt und nach 3 min mit 30 g Eis, 15 g NaCl und 30 ml Wasser versetzt. Sofort danach wurden 3.47 g (20 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde stets durch 1 N NaOH-Lösung neutral bis leicht sauer gehalten. Nachdem 40 ml NaOH-Lösung verbraucht waren, ließ man noch 15 min rühren. Anschließend gab man 3.46 g (20 mmol) Sulfanilsäure (**10**) zu und erwärmte auf 35 °C. Die Reaktionsmischung wurde stets durch 1 N NaOH-Lösung neutral bis leicht sauer gehalten. Nachdem 40 ml NaOH-Lösung verbraucht waren, ließ man noch 15 min rühren. Anschließend gab man 3.70 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) zu und erwärmte die Mischung auf 95 °C, wobei man das Aceton abdes-

tillierte. Die Reaktionsmischung wurde stets durch 1 N NaOH-Lösung neutral bis leicht sauer gehalten. Nachdem 40 ml NaOH-Lösung verbraucht waren, gab man 10 g Puffersalzmischung zu, ließ 15 min nachrühren, kühlte die Lösung auf 20 °C ab und versetzte mit 20 g KCl. Die Flüssigkeit der erhaltenen Suspensionen wurde mit sehr geringem Unterdruck durch ein mit einem Glasfaser-Tiefenfilter bedecktes grobes Papierfilter filtriert. Der Filterkuchen wurde in ein Becherglas überführt, zweimal hintereinander mit der 3fachen Menge Wasser aufgeschlämmt, 3 h bei Raumtemp. gerührt, wie oben filtriert, bei 40 °C i. Vak. getrocknet und aus einer Mischung aus DMF und Ethanol (1:9) umkristallisiert. Man erhielt ein intensiv gelbes Pulver, dessen Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) in Lage und Anzahl der Banden mit dem bei b) erhaltenen nahezu identisch war und daher nicht weiter untersucht wurde.

d) In einem Braunglaskolben wurden 20 ml Wasser, 20 g Eis und 12 g NaCl vorgelegt und 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) unter Rühren hinzugefügt. Zu dieser Mischung gab man sofort 2.74 g (20 mmol) Tyramin (**24**) als 0.25 molare, mit Na₂CO₃ neutralisierte Tyramin-Hydrochlorid-Lösung (**24**). Die Mischung wurde unter Eiskühlung gerührt und dabei immer im neutralen bis leicht sauren pH-Bereich gehalten, indem insgesamt 40 ml der Na₂CO₃-Lösung zugetropft wurden. Anschließend ließ man 15 min rühren. Nun gab man 3.46 g (20 mmol) Sulfanilsäure (**10**) als 0.25 molare, mit Na₂CO₃ neutralisierte Lösung zu und erwärmte auf 25 °C. Die Reaktionsmischung wurde durch 0.25 molare Na₂CO₃-Lösung immer bei einem pH-Wert nahe 8 belassen. Nachdem 40 ml Na₂CO₃-Lösung verbraucht waren, ließ man noch 15 min rühren. Anschließend gab man 3.70 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) als 0.25 molare, mit Na₂CO₃ neutralisierte Lösung zu und rührte unter Rückfluß. Dabei wurde die Reaktionsmischung durch 0.25 molare Na₂CO₃-Lösung immer bei einem pH-Wert nahe 10 belassen. Nachdem 40 ml Na₂CO₃-Lösung verbraucht waren, gab man 10 g Puffersalzmischung zu, ließ 15 min rühren, kühlte die Lösung auf 20 °C ab und versetzte mit 20 g KCl. Die erhaltenen Suspensionen wurden im schwachen Vak. durch ein mit einem Glasfaser-Tiefenfilter bedecktes grobes Papierfilter filtriert. Der Filterkuchen wurde in ein Becherglas überführt, zweimal hintereinander mit der 3fachen Menge Wasser aufgeschlämmt, 3 h bei Raumtemp. gerührt, wie oben filtriert, bei 40 °C i. Vak. getrocknet und aus einer Mischung aus DMF und Ethanol (1:9) umkristalli-

siert. Man erhielt ein intensiv gelbes Pulver, das im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, NH_3 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) zwischen $R_f = 0.12$ und 0.68 15 stark ineinander übergehende Banden zeigte, von denen nur eine ($R_f = 0.51$) intensive Fluoreszenz im UV (366 nm) zeigte. Nach PDC im selben Laufmittel konnte eine aus dieser Zone hervorgegangene Probe durch HPLC (Nitrilphase, $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O-Acetrop}$ / 50 mmolarer Phosphatpuffer pH 7,1) teilweise aufgetrennt werden, zeigte im Dünnschichtchromatogramm jedoch neben der ursprünglichen Zone 13 weitere Komponenten mit R_f -Werten von 0.15 bis 0.64. von denen 7 Zonen vorher nicht aufgetreten waren. Durch einen Vergleich mit den bis dahin verwendeten Lösungsmitteln konnte eine Verunreinigung aus diesen Quellen ausgeschlossen werden.

e) In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler wurden unter Eiskühlung 25 ml eiskaltes Aceton vorgelegt, 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) eingerührt und nach 3 min 2.74 g (20 mmol) Tyramin (**24**) als 0.25 molare, mit Na_2CO_3 neutralisierte Tyramin-Hydrochlorid-Lösung zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde stets durch 1 N NaOH-Lösung neutral bis leicht sauer gehalten. Nachdem 10 min lang keine NaOH-Lösung mehr verbraucht wurde, fügte man 3.46 g (20 mmol) Sulfanilsäure (**10**) als 0.25 molare, mit Na_2CO_3 neutralisierte Lösung zu und erwärmte auf $55\text{ }^\circ\text{C}$. Die Reaktionsmischung wurde durch 1 N NaOH-Lösung neutral bis leicht sauer gehalten. Nachdem 10 min lang keine NaOH-Lösung mehr verbraucht wurde, fügte man 3.70 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) als 0.25 molare, mit Na_2CO_3 neutralisierte Lösung zu und erwärmte die Mischung auf $95\text{ }^\circ\text{C}$, wobei man das Aceton abdestillierte und zusätzlich zur NaOH-Lösung, mit der die Reaktionsmischung neutral gehalten wurde, von Zeit zu Zeit soviel Wasser zusetzte, daß eine leicht rührbare Suspension erhalten blieb. Nachdem 10 min lang keine NaOH-Lösung mehr verbraucht wurde, gab man 10 g Puffersalzmischung zu, ließ 15 min nachrühren, kühlte die Lösung auf $20\text{ }^\circ\text{C}$ ab und versetzte mit 20 g KCl. Die Flüssigkeit der erhaltenen Suspensionen wurde mit sehr geringem Unterdruck durch ein mit einem Glasfaser-Tiefenfilter bedecktes grobes Papierfilter filtriert. Der Filterkuchen wurde in ein Becherglas überführt, zweimal hintereinander mit der 3fachen Menge Wasser aufgeschlämmt, 3 h bei Raumtemp. gerührt, wie oben filtriert, bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ i. Vak. getrocknet und aus einer Mischung aus DMF und Ethanol (1:9) umkristallisiert. Man erhielt ein intensiv gel-

bes Pulver, das im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, NH_3 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) neben 11 weiteren 2 intensiv fluoreszierende Zonen (366 nm) bei $R_f = 0.40$ und $R_f = 0.55$ zeigte. Nach PDC im gleichen Laufmittel konnten die aus diesen Banden hervorgegangenen Proben durch HPLC nicht weiter gereinigt werden.

f) In einem Braunglas-Dreihalskolben mit Magnetrührer und Rückflußkühler wurden 25 g Eis, 1.85 g (5 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) und 0.4 g (10 mmol) NaOH bis zur vollständigen Auflösung der Sulfonsäure verrührt. Anschließend wurden innerhalb von 15 min 1.84 g (10 mmol) Trichlortriazin (**7**) in 10 ml Aceton zugetropft und daraufhin während 15 min 4 ml einer 1 N NaOH-Lösung zugesetzt. Man ließ noch 15 min rühren und versetzte mit einer Mischung aus 1.74 g (10 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) in 8 ml 0.5 N NaOH-Lösung und erwärmte auf 40 °C. Nach 15 min gab man binnen 15 min 4 ml einer 1 N NaOH-Lösung zu und ließ nach beendeter Zugabe bei gleicher Temperatur noch weitere 15 min rühren. Nun wurden 1.73 g (10 mmol) Sulfanilsäure (**10**) zugegeben. Man erwärmte auf 95 °C, destillierte dabei das Aceton ab und fügte gleichzeitig über einen Zeitraum von 30 min insgesamt 16 ml einer 0.5 N NaOH-Lösung zu. Nach beendeter Zugabe wurden 5 g Puffersalzmischung und 10 g KCl zugesetzt. Man spülte mit 25 ml Wasser nach, rührte noch 1 min unter Rückfluß und ließ anschließend abkühlen. Die erhaltenen Suspensionen wurden mit sehr geringem Unterdruck durch ein mit einem Glasfaser-Tiefenfilter bedecktes grobes Papierfilter filtriert. Der Filterkuchen wurde in ein Becherglas übergeführt, mit 50 ml Wasser aufgeschlämmt, 3 h bei Raumtemp. gerührt und erneut filtriert. Das bei 40 °C i. Vak. getrocknete Produktgemisch wurde aus einer Mischung aus DMF und Ethanol (1:9) umkristallisiert. Man erhielt ein leicht ockerfarbenes Produktgemisch, welches sich bei Lage und Anzahl der Banden bei DC (Kieselgel, NH_3 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) nicht von vorher erhaltenen Proben unterschied, bei denen keine Reinigung möglich war. Eine weitere Trennung wurde nicht unternommen.

g) In einem Braunglas-Dreihalskolben mit Magnetrührer und Rückflußkühler wurden 25 g Eis, 1.85 g (5 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) und 680 mg (10 mmol) einer 25proz. Ammoniak-Lösung vorgelegt. Man spülte mit 10 ml

Wasser nach, tropfte innerhalb von 15 min bei 0 °C 1.84 g (10 mmol) Trichlortriazin (**7**) in 10 ml Aceton zu. In einem 50 ml Rundkolben mit 10 ml Wasser wog man 680 mg einer 25proz. Ammoniak-Lösung ein und tropfte diese Lösung innerhalb von 15 min zu der Reaktionsmischung. Man ließ noch 15 min rühren und versetzte mit einer Mischung aus 1.74 g (10 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) 10 ml Wasser und 680 mg einer 25proz. Ammoniak-Lösung und erwärmte auf 40 °C. Nach 15 min gab man binnen 15 min 680 mg einer 25proz. Ammoniak-Lösung zu, die zuvor mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt wurde. Nach beendeter Zugabe ließ man bei gleicher Temperatur noch weitere 15 min rühren. Nun wurden 1.73 g (10 mmol) Sulfanilsäure (**10**) zugegeben. Man erhitze auf 95 °C. Man verdünnte 1.36 g einer 25proz. Ammoniak-Lösung mit 20 ml Wasser und tropfte sie während 30 min in die Reaktionsmischung. Nach beendeter Zugabe wurden 5 g Puffersalzmischung und 10 g KCl zugesetzt. Man spülte mit 5 ml Wasser nach und ließ abkühlen. Die Flüssigkeit der erhaltenen Suspensionen wurden mit sehr geringem Unterdruck durch ein mit einem Glasfaser-Tiefenfilter bedecktes grobes Papierfilter filtriert. Der Filterkuchen wurde in ein Becherglas übergeführt, mit 50 ml Wasser aufgeschlämmt, 3 h bei Raumtemp. gerührt und erneut filtriert. Das bei 40 °C i. Vak. getrocknete Produkt wurde aus einer Mischung aus DMF und Ethanol (1:9) umkristallisiert. In dem vorliegenden Produktgemisch konnte durch DC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) die Zielsubstanz weder durch Vergleich mit vorher bei anderen Experimenten entwickelten Chromatogrammen noch durch die Verwendung von Flurescein / Silbernitrat- und Echtblausalz B-Sprühlösungen nachgewiesen werden.

h) In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler wurden 100 g Eis, 9.26 g (26 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**), und 9.22 g (50 mmol) Cyanurchlorid (**7**) miteinander verrührt. Innerhalb von 2 h ließ man unter Eiskühlung 4 g (0.1 mol) NaOH als halbgesättigte Lösung so zulaufen, daß der pH-Wert nicht über 7.5 stieg. Man gab 8.7 g (50 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) zu, erwärmte auf 50 °C und gab innerhalb 1 h bei dieser Temperatur 4 g NaOH als halbgesättigte Lösung zu. Nach beendeter Zugabe wurden 8.7 g (50 mmol) fein pulverisierte Sulfanilsäure (**10**) zugesetzt. Während man zum Rückfluß erhitze, gab man immer soviel einer aus 4 g (0.1 mol) NaOH hergestellten halbgesättigten NaOH-Lösung zu, daß der pH-Wert nicht über 7.5 stieg. Man rührte unter

Rückfluß, bis die gesamte NaOH-Lösung verbraucht war. Man gab 26 g Puffersalzmischung zu, ließ 15 min rühren, versetzte mit 52 g KCl und ließ abkühlen. Nach der Aufarbeitung gemäß AAV 1 konnte durch DC (Kieselgel, NH_3 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) in dem Rohprodukt eine Vielzahl von Nebenprodukten festgestellt werden, die durch PDC (Kieselgel, NH_3 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) nicht entfernt werden konnten.

i) In einem 500 ml Dreihalskolben mit Thermometer, Rückflußkühler und Magnetrührer wurden 10.6 g Trichlortriazin (**7**) (57 mmol) bei $-5\text{ }^\circ\text{C}$ in 100 ml Aceton gelöst und mit 10.4 g (28 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) versetzt. Innerhalb 15 min wurde eine Lösung aus 2.24 g (56 mmol) NaOH in 30 ml Wasser derart zugetropft, daß der pH-Wert nicht über 7.5 anstieg. Nach beendeter Zugabe rührte man noch 5 min. Anschließend wurde eine mit Na_2CO_3 neutralisierte Lösung aus 10 g Tyramin-Hydrochlorid (**24**) (57.5 mmol) in 20 ml Wasser in einer Portion zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf $40\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt, wobei der pH-Wert durch Zugabe von fein pulverisiertem Na_2CO_3 neutral bis leicht sauer gehalten wurde. Als 15 min auch ohne weitere Zugabe von Na_2CO_3 der pH-Wert unverändert blieb, versetzte man mit 9.7 g Sulfanilsäure (**10**) (56 mmol), fügte 20 ml Wasser zu und ersetzte den Kühler durch eine Destillationsbrücke. Man erwärmte die Mischung langsam auf $95\text{ }^\circ\text{C}$. Dabei wurde durch Zusatz von Na_2CO_3 der pH-Wert der Reaktionsmischung immer im neutralen bis leicht sauren Bereich gehalten. Als kein Aceton mehr übergang, wechselte man die Destillationsbrücke wieder mit dem Rückflußkühler und ließ in der Siedehitze unter pH-Kontrolle weiterreagieren, bis der pH-Wert auch ohne weitere Na_2CO_3 -Zugabe konstant blieb. Man gab 35 g Puffersalzmischung zu, ließ 15 min rühren, versetzte mit 35 g KCl und ließ abkühlen. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß AAV 1. Das tief gelbe, hochpolare Produktgemisch konnte mit chromatographischen Methoden nicht getrennt werden.

j) In einem 500 ml Dreihalskolben mit Thermometer, Rückflußkühler und Magnetrührer wurde eine Suspension aus 9.22 g (50 mmol) Cyanurchlorid (**7**), 50 ml Aceton und 50 g Eis vorgelegt. Zu dieser Mischung wurde unter Eiskühlung 9.26 g (25 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) zugefügt. Bei gleicher Temperatur wurden langsam 2.65 g (25 mmol) Na_2CO_3 gelöst in 30 ml Wasser, so

zugetropft, daß der pH-Wert der Reaktionsmischung nicht über einen Wert von 7 stieg. Nachdem die gesamte Na₂CO₃-Lösung zugegeben war, wurde das Eisbad entfernt. Man ließ noch 5 min rühren. Anschließend wurden 8.66 g fein pulverisierte Sulfanilsäure (**10**) (50 mmol) in die Reaktionsmischung eingetragen, welche daraufhin auf 40 °C erwärmt wurde. Man löste 2.65 g (25 mmol) Na₂CO₃ in 30 ml Wasser und tropfte von dieser Lösung langsam immer so viel in die Reaktionsmischung, daß sich der pH-Wert der Reaktionsmischung immer im Bereich von 6.5-7 bewegte. Nach beendeter Zugabe wurde das Aceton abdestilliert. Die verbliebene rein wäßrige Lösung wurde mit 8.68 g Tyramin-Hydrochlorid (**24**) (50 mmol) versetzt und langsam auf 95 °C erwärmt. Dabei wurde von einer Lösung aus 5.3 g (50 mmol) Na₂CO₃ in 50 ml Wasser immer so viel in die Reaktionsmischung eingetroppt, daß deren pH-Wert immer neutral bis leicht sauer war. Man gab 28 g Puffersalzmischung zu, ließ 15 min nachrühren, versetzte mit 52 g KCl und ließ abkühlen. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß AAV 1. Da sich das intensiv gelbe Produkt in Lage und Anzahl der Banden bei DC (Kieselgel, NH₃ 26proz.: EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) nicht von vorher untersuchten, nicht trennbaren Produkten unterschied, wurden keine weiteren Reinigungsversuche unternommen.

4,4'-Bis-[(4-(*p*-hydroxyphenyl)-ethylamino)-6-(*p*-sulfo-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)]-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonsäure: a) Gemäß AAV 2 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 3.47 g (20 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**244**) unter Zugabe von 40 ml 1 N NaOH (1.6 g, 40 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 3.46 g (20 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) in 1,4-Dioxan unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Die Titelverbindung konnte nicht von den zahlreichen Nebenprodukten des hochpolaren Produktgemisches getrennt werden.

b) Gemäß AAV 3 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 3.47 g (20 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) unter Zugabe von 40 ml 1 N NaOH (1.6 g,

40 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und mit 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) in Dioxan unter Zugabe von 1.6 g (40 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Man erhielt ein untrennbares, hochpolares Produktgemisch.

b) Gemäß AAV 4 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 3.47 g (20 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) unter Zugabe von 40 ml 1 N NaOH (1.6 g, 40 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und mit 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) in Dioxan unter Zugabe von 60 ml 1 N NaOH-Lösung (2.4 g, 60 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Man konnte die Titelverbindung nicht aus dem hochpolaren Produktgemisch isolieren.

Tetra-tripropylammonium-4,4'-bis-[(4-(*p*-hydroxyphenyl)-ethylamino)-6-(*p*-sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)]-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: Gemäß AAV 5 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 1.73 g (10 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (C18, Diol, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O oder 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) konnte das Zielmolekül nicht isoliert werden.

Tetra-tributylammonium-4,4'-bis-[(4-(*p*-hydroxyphenyl)-ethylamino)-6-(*p*-sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)]-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: a) Gemäß AAV 6 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 1.73 g (10 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (C18, Diol, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O oder 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) konnte das Zielmolekül nicht isoliert werden.

b) In einem dickwandigen Reagenzglas wurden 1.0 g (5.8 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) zusammen mit 0.6 g (0.58 mmol) des Monochlortriazins, 3 ml DMSO und 3 ml Tributylamin eingeschmolzen, in einen Metallmantel mit Druckausgleichsbohrungen übergeführt und 17 h lang auf 110 °C erhitzt. Man erhielt tief dunkelbraune, zähe Klümpchen, aus denen durch Vakuum-Flüssigkeits-Chromatographie (60 × 40mm, Kieselgel, 10 mal 30 ml Wasser / MeOH 1:0. 29:1. 28:2. 20:10) ausschließlich tief dunkelbraunen Produkte. DC (Kieselgel, NH₃ 26proz.: EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) gab einen durchgehenden dunkelbraunen Streifen. Beim Austausch von NH₃ in dem obigen Lösungsmittel durch Wasser und verd. HAc blieb die Mischung am Startpunkt.

Tetranatrium-4,4'-bis-[(4-(*p*-hydroxyphenyl)-ethylamino)-6-(*p*-sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)]-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: Man verrieb 1.0 g (5.8 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) in einer Reibschale mit 230 mg (5.8 mmol) NaOH und erhitzte das Gemisch bis zur beginnenden Erweichung mit einem Heißluftgebläse in einem Porzellantiegel. Man ließ erkalten, pulverisierte und mischte innig mit 0.6 g (0.58 mmol) des Monochlortriazins. Man erwärmte die Mischung mit einem Heißluftgebläse, bis sie eine hochviskose Konsistenz aufwies. Man erhielt ein dunkelbraunes bis schwarzes Produktgemisch, aus dem durch Vakuum-Flüssigkeits-Chromatographie (60 × 40mm, Kieselgel, 10mal 30 ml Wasser / MeOH 1:0.29:1. 28:2. 20:10) keine einheitlichen Verbindungen isoliert werden konnten. Durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) konnte keine Trennung erreicht werden.

Tetra-tripropylammonium-4,4'-bis-[(4-(*p*-hydroxyphenyl)-ethylamino)-6-(*p*-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)]-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: In einem Zweihalskolben mit Rückflußkühler und Magnetrührer wurden 1.5 g eines nach AAV 1 aus Trichlortriazin (**7**), Anilin (**9**) und 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) erhaltenen Produktgemisches (entsprechend 1.8 mmol bei MW = 855) bei Raumtemp. in 25 ml trockenem Pyridin suspendiert und unter einer Stickstoffatmosphäre mit 1.0 g (5.8 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) versetzt. Diese Mischung wurde 2 h auf 100 °C erhitzt. Danach wurde auf Raumtemp. abgekühlt. Die gebildeten Klümpchen wurden im Kolben vorsichtig mit einem Teflonstab zerkleinert. Im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:

Wasser / 3:8:10:4) waren im R_f -Werte-Bereich von 0.14 bis 0.73 14 teilweise stark ineinanderlaufende, orangefarbene bis rotbraune Banden zu erkennen. Zwei rotbraune Banden zeigten im UV (366 nm) schwache Fluoreszenz. Durch PDC (Kieselgel, NH_3 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und HPLC (C18, CH_3CN - H_2O -Aceotrop / 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) konnten keine einheitliche Verbindung isoliert werden.

Tetraammonium-4,4'-bis-[(4-(*p*-Hydroxyphenyl)-ethylamino)-6-(*p*-sulfonatophenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)]-amino]-trans-stilben-2,2'-disulfonat: Vom Diaminostilben-Disulfonsäure-Natriumsalz (**8**) wurden 1.5 g (1.5 mmol) mit 1.3 g (7.5 mmol) Tyramin-Hydrochlorid (**24**) sowie 300 mg (7.5 mmol) Natriumhydroxid in 20 ml 20proz. Natriumchlorid-Lösung suspendiert und bis zum leichten Sieden erhitzt. Innerhalb von 4 h wurden 30 ml einer 0.1 N NaOH-Lösung in die Reaktionsmischung eingetropft, daß der pH-Wert immer zwischen 6.5–8.0 lag. Nach 4 h goß man die Reaktionsmischung in 100 ml einer eiskalten 0.1 N HCl. Der Filtrationsrückstand wurde durch PDC an SiO_2 (EE, Wasser, *i*-Prop-OH, 25 % NH_3 ; 4:4:8:1 bis 3) gereinigt. Man suspendierte die entsprechenden Zonen in DMSO und tropfte diese Lösung in die 300fache Menge heftig gerührten trockenen Ether.

Man erhielt 380 mg (21 %) eines hellgelben Pulvers mit dem Schmelzpunkt 298°C , das bei DC (Kieselgel, NH_3 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) noch zwei weitere, schwach fluoreszierende Banden zeigte.

7.3 Syntheseversuche an Amberlyst 15

Aktivierung und Beladung des Harzes: In einem Kolben mit Rückflußkühler wurden 20 g Amberlyst 15 mit Thionylchlorid überschichtet, mit 0.5 ml DMF versetzt und 30 min unter Rückfluß erhitzt. Man ließ abkühlen, destillierte den größten Teil des Thionylchlorids ab, breitete das Harz in dünner Schicht in einer Glasfilternutsche aus und saugte scharf ab. Man überschichtete die Kügelchen in einem Rundkolben zweimal mit Toluol und einmal mit Benzol, erhitzte 15 min zum Sieden und saugte abschließend scharf ab. Man erhielt 20.58 g (86.6 %) des aktivierten Harzes. 5.63 g (48,4 mmol) Diaminohexan wurden in einem Rundkolben mit Rückflußkühler in 100 ml Wasser mit dem mit Thionylchlorid / DMF behandelten

Amberlyst 15 unter Rückfluß erhitzt. Dabei wurde eine 0.1 N NaOH-Lösung stets so zugesetzt, daß die Reaktionsmischung immer basische Reaktion zeigte. Als die Reaktionsmischung auch ohne weitere Hydroxidzugabe basisch blieb, ließ man eine weitere halbe Stunde sieden, filtrierte und kochte anschließend dreimal mit 100 ml Wasser. Man erhielt 24.3 g (99,1 %) sich sehr glatt anfühlende Harzkugeln.

7.4 Kupplungsversuche am Harz

Tetranatrium-4,4'-bis-[(6-(6-aminohexylamino)-4-(*p*-sulfonyl-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: a) In einem Rundkolben wurden 7.7 g (7.5 mmol) **6** mit 8 g des aktivierten Harzes und 50 ml Wasser 5 h unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde durch 0.1 N NaOH-Lösung ständig neutral gehalten. Man filtrierte, kochte die Perlen 5mal für je 15 min in 100 ml Wasser aus und trocknete bei 40 °C Man erhielt 10.2 g im UV (360 nm) stark fluoreszierendes Harz entsprechend 29proz. Umsatz.

b) In einem Rundkolben wurden 7.7 g (7.5 mmol) **6** mit 8 g des aktivierten Harzes und 50 ml DMSO auf 100 °C erwärmt. Nach 1 h in der insgesamt 0.2 ml Triethylamin zugegeben wurden, reagierte die Reaktionsmischung stehende Flüssigkeit dauerhaft alkalisch. Man filtrierte, kochte die Perlen 5mal für je 15 min in 100 ml Wasser aus und trocknete bei 40 °C Man erhielt 8.3 g im UV (360 nm) fluoreszierendes Harz entsprechend 4proz. Umsatz.

c) In einem Rundkolben wurden mit 8 g des aktivierten Harzes und 50 ml DMSO / Pyridin 1:1 zum Sieden erhitzt. Innerhalb 30 min wurden 7.7 g (7.5 mmol) **6** zugesetzt. Dabei verklumpte die Reaktionsmischung zu einem terracottafarbenen Schleim, der sich auch nach weiteren 60 min nicht wieder auflöste. Der Reaktionsansatz wurde verworfen.

Das aus a) erhaltene Harz wurde 3mal alternierend für jeweils 4 h in konz. HCl und Wasser, dem nach Kontakt mit dem Harz so viel 1 N NaOH-Lösung zugesetzt wurde, daß es dauerhaft alkalisch blieb, unter Rückfluß erhitzt. Man filtrierte jeweils ab, sammelte die Salzsäure für den nächsten Vorgang und konzentrierte die Lauge bis fast zur Trockene. Man erhielt eine im UV (366 nm) intensiv hell gelb

fluoreszierende Lösung, die nur Spuren des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe enthielt.

7.5 Umsetzung mit 6-Aminohexansäure (25)

Hexakalium-4,4'-bis-[(6-(5-carboxyl-pentylamino)-4-(*p*-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: Gemäß AAV 1 wurden 5.13 g (5 mmol) **6**, 1.31 g (10 mmol) 6-Aminohexansäure (**25**) und 20 ml 1N NaOH-Lösung (20 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt ein orangegelbes, nach Umkristallisation hellgelbes, Produktgemisch, das im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) im Bereich von 0.38 bis 0.58 10 hell gelb bis weißlich blau fluoreszierende (UV, 366 nm), stark überlappende Banden zeigte. Durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE: Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) konnte kein einheitliches Produkt erhalten werden.

7.6 Umsetzungen mit 11-Aminoundecansäure (26)

Hexakalium-4,4'-bis-[(6-(10-carboxyl-decylamino)-4-(*p*-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: a) Gemäß AAV 1 wurden 5.13 g (5 mmol) **6**, 2.01 g (10 mmol) 11-Aminoundecansäure (**26**) und 20 ml 1 N NaOH Lösung (20 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt ein orangegelbes, nach Umkristallisation hellgelbes Produktgemisch. Durch HPLC (Nitrilphase, CH₃CN-H₂O-Acetrop / 0.1proz.TFA 80:20) konnte nur eine unvollständige Reinigung erreicht werden. Die Hauptfraktion zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) 9 nicht in Substanz isolierbare Banden.

b) Trichlortriazin (**7**) 10.6 g (57,5 mmol) wurden in einem 500 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Magnetührer bei 0 °C in 100 ml eiskaltem Aceton gelöst und bei Eiskühlung langsam mit 10.4 g (28 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) versetzt. Bei gleicher Temperatur wurde anschließend NaOH (2.24 g, 56 mmol) als halbkonzentrierte wäßrige Lösung langsam zugetropft. Anschließend wurden 2.96 g (28 mmol) Na₂CO₃ als halbkonzentrierte wäßrige Lösung so zugegeben, daß der pH-Wert der Reaktionsmischung im neutralen Be-

reich blieb. Daraufhin wurden 11.6 g (57.6 mmol) Aminoundecansäure (**26**) und 2.3 g (57.6 mmol) NaOH als halbkonzentrierte Lösung eingetragen. Die Reaktionsmischung wurde auf 50 °C erwärmt und mit 4.84 g (57.6 mmol) NaHCO₃ als halbkonzentrierte Lösung neutral bis leicht basisch gehalten. Nach beendeter Zugabe wurden 17.3 g (0.1 mol) Sulfanilsäure (**10**) und eine 60 °C warme Lösung aus 8.4 g (0.1 mol) NaHCO₃ und 50 ml Wasser zugefügt. Man destillierte das Aceton ab und erwärmte weiter auf Siedetemperatur. Dabei tropfte man von insgesamt 2.3 g (57,5 mmol) NaOH, gelöst in 50 ml Wasser, immer soviel in die Reaktionsmischung, daß der pH-Wert stets bei 7.5±0.5 lag. Man setzte 28 g Puffersalzmischung und 50 g KCl zu, ließ abkühlen und arbeitete nach AAV 1 auf. Das Zielmolekül konnte aus dem hochpolaren Produktgemisch durch HPLC (Nitrilphase, Diolphase, C18, CH₃CN-H₂O-Acetrop mit H₂O bzw. 50 mmol Phosphatpuffer) nicht isoliert werden.

c) In einem 250 ml Braunglas-Zweihalskolben mit Eiskühlung und Magnetührer wurden bei 0 °C 10.56 g Cyanurchlorid (**7**) (57 mmol) in 100 ml Aceton eingetragen. Man bereitete aus 4.3 g (108 mmol) NaOH eine halbkonzentrierte Lösung und tropfte davon unter Eiskühlung so viel in eine Suspension aus 10.0 g 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) (27 mmol) und 25 ml eiskaltem Wasser, daß sich die Sulfonsäure nahezu vollständig löste, der pH-Wert aber nicht basisch wurde. Diese Mischung wurde zügig zu der Triazin-Lösung gegeben. Man gab anschließend den Rest der halbkonzentrierten NaOH-Lösung bei 0 °C so zu, daß der pH-Wert immer neutral oder leicht sauer blieb. Anschließend ließ man noch weitere 5 min ohne weitere Kühlung rühren. Man gab 8.9 g (51 mmol) fein pulverisierte Sulfanilsäure (**10**) in einer Portion zu und tropfte insgesamt 4.2 g (104 mmol) NaOH als halbkonzentrierte Lösung innerhalb einer Stunde bei 35 °C so zu, daß der pH-Wert immer neutral bis leicht sauer blieb. Nach beendeter Zugabe ließ man noch 30 min bei 35 °C rühren. Die Mischung wurde mit 10.5 g (52 mmol) 11-Aminoundecansäure (**26**) versetzt und auf 95 °C erwärmt, wobei das Aceton abdestilliert wurde. Währenddessen wurden aus einem Vorrat von 4.3 g (108 mmol) NaOH als halbkonzentrierte Lösung so eingetropft, daß der pH-Wert der Reaktionsmischung immer neutral bis schwach sauer blieb. Nachdem die gesamte Menge NaOH zugesetzt worden war, ließ man noch weitere 15 min bei 95 °C rühren. Man setzte 28 g Puffersalzmischung und 56 g KCl zu, ließ abkühlen und arbeitete

nach AAV 1 auf. Das Dünnschichtchromatogramm zeigte keine positive Veränderung in Anzahl und Lage der Banden im Vergleich zu vorherigen Experimenten. Eine weitere Reinigung unterblieb.

4,4'-Bis-[(6-(10-carboxy-decylamino)-4-(*p*-sulfo-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonsäure: a) Gemäß AAV 2 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 4.02 g (20 mmol) 11-Aminoundecansäure (**26**) unter Zugabe von 40 ml 1 N NaOH (1.6 g, 40 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 3.46 g (20 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) in 1,4-Dioxan unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Die Isolierung des Zielmoleküls aus dem sehr polaren Produktgemisch konnte durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol: Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (Diol, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) nicht erreicht werden.

b) Gemäß AAV 3 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 4.02 g (20 mmol) 11-Aminoundecansäure (**26**) unter Zugabe von 40 ml 1 N NaOH (1.6 g, 40 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und mit 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) in Dioxan unter Zugabe von 1.6 g (40 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Man erhielt ein durch HPLC (Diol, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) nicht trennbares Produktgemisch.

c) Gemäß AAV 4 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 4.02 g (20 mmol) 11-Aminoundecansäure (**26**) unter

Zugabe von 40 ml 1 N NaOH (1.6 g, 40 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und mit 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) in Dioxan unter Zugabe von 60 ml 1 N NaOH-Lösung (2.4 g, 60 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Aus dem sehr polaren Produktgemisch konnte die Zielverbindung weder durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) noch durch nachfolgende HPLC (Diol, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) isoliert werden.

Hexa-tripropylammonium-4,4'-bis-[(6-(10-carboxyl-decylamino)-4-(*p*-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2.2'-disulfonat: Gemäß AAV 5 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 2.01 g (10 mmol) 11-Aminoundecansäure (**26**) umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Durch PDC und nachfolgende HPLC (C18, Diol, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / 50 mmol Phosphatpuffer oder 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) konnte das Zielmolekül nicht isoliert werden.

Hexa-tributylammonium-4,4'-bis-[(6-(10-carboxyl-decylamino)-4-(*p*-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2.2'-disulfonat: Gemäß AAV 6 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 2.01 g (10 mmol) 11-Aminoundecansäure (**26**) umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Die Zielverbindung konnte durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und HPLC (Nitrilphase, CH₃CN-H₂O-Acetrop / 50 mmol Phosphatpuffer) nicht von den Nebenprodukten getrennt werden.

7.7 Umsetzungen mit Polyethylenglycolhomologen mit einer mittleren Molmasse von 600 (PEG600) (**30**)

Tetrakalium-4,4'-bis-[(6-(ω -hydroxy-*poly*-ethylenoxy)-4-(*p*-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2.2'-disulfonathomologe, n=13-14: Gemäß AAV 1 wurden 5.13 g (5 mmol) **6**, 6.00 g (10 mmol) PEG600 (**30**) und 10 ml 1N NaOH Lösung (20 mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt ein orangegelbes, nach Umkristallisation hellgelbes Produktgemisch, das durch

HSCCC (WDT) und HPLC (Nitrilphase, Diolphase, CH₃CN-H₂O-Acetotrop / H₂O) nicht trennbar war.

4,4'-Bis-[(6-(ω -hydroxy-poly-ethylenoxy)-4-(*p*-sulfo-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfosäurehomologe, n=13-14: Gemäß AAV 7 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 6.00 g (10 mmol) Polyethylenglycolhomo-
logen der mittleren Molmasse 600 (**30**) (entsprechend 13 bis 14 CH₂-CH₂-O-
Einheiten) und 2.5 ml Tributylamin umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Ein
Gramm der bei 40 °C i. Vak. getrockneten Substanz wurde in 25 ml 20proz. me-
thanolischer Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung digeriert, abfiltriert und mit
HSCCC (WDT) untersucht. Man konnte keine reine Komponente isolieren.

7.8 Umsetzungen mit Histidin (**31**)

Hexakalium-4,4'-bis-[(6-(α -N-histidylato)-4-(*p*-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: a) Gemäß AAV 1 wurden
5.13 g (5 mmol) **6**, 1.55 g (10 mmol) Histidin (**31**) und 10 ml 1 N NaOH Lösung (20
mmol) umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt ein braungelbes, nach Umkristal-
lisation hell grünbraunes Produktgemisch, das durch HPLC (Diolphase, CH₃CN-
H₂O-Acetotrop / H₂O 1proz. TFA) nur unvollständig gereinigt werden konnte.

b) In einem 250 ml Braunglas-Zweihalskolben mit Eiskühlung und Magnetührer
wurden bei 0 °C 10.0 g Cyanurchlorid (**7**) (54 mmol) in 100 ml Aceton eingetragen.
Man bereitete aus 4.3 g (108 mmol) NaOH eine halbkonzentrierte Lösung und
tropfte davon unter Eiskühlung soviel in eine Suspension aus 10.0 g Diaminostil-
ben-disulfonsäure (**8**) (27 mmol) und 25 ml eiskaltem Wasser, daß sich die Sul-
fonsäure nahezu vollständig löste, der pH-Wert aber nicht basisch wurde. Diese
Mischung wurde zügig zu der Triazin-Lösung gegeben. Man gab anschließend
den Rest der halbkonzentrierten NaOH-Lösung bei 0 °C so zu, daß der pH-Wert
immer neutral oder leicht sauer blieb. Anschließend ließ man noch weitere 5 min
ohne weitere Kühlung rühren. Man gab 8.4 g (54 mmol) Histidin (**31**) in einer Por-
tion zu und tropfte insgesamt 2.2 g (54 mmol) NaOH als halbkonzentrierte Lösung
innerhalb 1 h bei 35 °C so zu, daß der pH-Wert immer neutral bis leicht sauer
blieb. Nach beendeter Zugabe ließ man noch eine halbe Stunde bei 35 °C rühren.

Die Mischung wurde mit 9.4 g (54 mmol) Sulfanilsäure (**10**) versetzt und auf 95 °C erwärmt, wobei das Aceton abdestilliert wurde. Währenddessen wurden 4.3 g (108 mmol) NaOH als halbkonzentrierte Lösung so zugegeben, daß der pH-Wert der Reaktionsmischung immer neutral bis schwach sauer blieb. Nachdem die gesamte Menge NaOH zugesetzt worden war, ließ man noch weitere 15 min bei 95 °C rühren. Man versetzte mit 26 g Puffersalzmischung und 50 g KCl und ließ abkühlen. Die weitere Aufarbeitung nach AAV 1 erbrachte eine durch HPLC (Diolphase, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O bzw. 0.1proz. TFA) nur unvollständig trennbare Produktmischung.

4,4'-Bis-[(6-(α -N-histidyl)-4-(*p*-sulfo-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonsäure: a) Gemäß AAV 2 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 3.10 g (20 mmol) Histidin unter Zugabe von 20 ml 1 N NaOH (0.8 g, 20 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 3.46 g (20 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) in 1,4-Dioxan unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Die Zielverbindung konnte durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (C18, Diol, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O oder 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) nicht isoliert werden.

b) Gemäß AAV 3 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 3.10 g (20 mmol) Histidin unter Zugabe von 20 ml 1 N NaOH (0.8 g, 20 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und mit 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) in Dioxan unter Zugabe von 1.6 g (40 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Die Isolierung der Zielverbindung aus dem Produktgemisch gelang nicht.

c) Gemäß AAV 4 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin in Aceton mit 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 3.10 g (20 mmol) Histidin (**31**) unter Zugabe von 20 ml 1 N NaOH (0.8 g, 20 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und mit 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) in Dioxan unter Zugabe von 60 ml 1 N NaOH-Lösung (2.4 g, 60 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Die Titelverbindung konnte durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (C18, Diol, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O oder 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) nur unvollständig gereinigt werden.

7.9 Umsetzungen mit 1,6-Diaminohexan (**28**)

Tetrakalium-4,4'-bis-[(6-(6-aminohexylamino)-4-(p-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-trans-stilben-2,2'-disulfonat: a) Gemäß AAV 1 wurden 5.13 g (5 mmol) **6** mit 1.16 g (10 mmol) 1,6-Diaminohexan (**28**) umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt eine hellgelbe, durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) nicht trennbare Produktmischung.

b) Gemäß AAV 7 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 1.16 g (10 mmol) 1,6-Diaminohexan (**28**) umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Man erhielt ein sehr polares, durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (C18, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O 1proz. TFA) nicht trennbares Produktgemisch.

7.10 Umsetzungen mit 1,12-Diaminododecan (**27**)

Tetrakalium-4,4'-bis-[(6-(12-aminododecylamino)-4-(p-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-trans-stilben-2,2'-disulfonat: Gemäß AAV 1 wurden 5.13 g (5 mmol) **6** mit 2.00 g (10 mmol) 1,12-Diaminododecan umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt ein blaß gelbes Produktgemisch, aus dem das Zielmolekül durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und

nachfolgende HPLC (C18, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O 1proz. TFA) nicht isoliert werden konnte.

4,4'-Bis-[(6-(12-aminododecylamino)-4-(*p*-sulfo-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonsäure: Gemäß AAV 4 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 4.00 g (20 mmol) Diaminododecan (**27**) in der zweiten Reaktionsstufe und mit 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) in Dioxan unter Zugabe von 60 ml 1 N NaOH-Lösung (2.4 g, 60 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Die Zielverbindung konnte durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (C18, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) nicht von den übrigen Komponenten des sehr polaren Produktgemisches getrennt werden.

Tetra-tripropylammonium-4,4'-bis-[(6-(12-aminododecylamino)-4-(*p*-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: Gemäß AAV 5 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 2.00 g (10 mmol) 1,12-Diaminododecan (**27**) umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Die Zielverbindung konnte durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (C18, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O oder 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) nicht isoliert werden.

Tetra-tributylammonium-4,4'-bis-[(6-(12-aminododecylamino)-4-(*p*-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: Gemäß AAV 6 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 2.00 g (10 mmol) 1,12-Diaminododecan (**27**) umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Die Zielverbindung konnte durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) sowie (Kieselgel, Chloroform / MeOH 93:7) und HPLC (Nitrilphase, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O) nicht von den Nebenprodukten getrennt werden.

7.11 Umsetzungen mit 1,12-Dodecandiol (39)

4,4'-Bis-[(6-(12-hydroxydodecyloxy)-4-(*p*-sulfo-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonsäure: a) Gemäß AAV 2 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 4.04 g (20 mmol) 1,12-Dodecandiol (**39**) unter Zugabe von 20 ml 1 N NaOH (0.8 g, 20 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 3.46 g (20 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) in 1,4-Dioxan unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Aus dem Produktgemisch wurde die Zielverbindung durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (C18, Diol, Nitril, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O oder 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) nicht isoliert.

b) Gemäß AAV 3 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 4.04 g (20 mmol) 1,12-Dodecandiol (**39**) unter Zugabe von 20 ml 1 N NaOH (0.8 g, 20 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und mit 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) in Dioxan unter Zugabe von 1.6 g (40 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Die Isolierung der Titelverbindung gelang durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (Diol, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O oder 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) nicht.

c) Gemäß AAV 4 wurden 3.68 g (20 mmol) Trichlortriazin (**7**) in Aceton mit 3.7 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) unter Zugabe von 0.8 g (20 mmol) NaOH-microprills sowie 20 ml 1 N NaOH-Lösung (0.8 g, 20 mmol) in der ersten Reaktionsstufe und mit 4.04 g (20 mmol) 1,12-Dodecandiol (**39**) unter Zu-

gabe von 20 ml 1 N NaOH (0.8 g, 20 mmol) in der zweiten Reaktionsstufe und mit 6.92 g (40 mmol) 4-Aminobenzolsulfonsäure (**10**) in Dioxan unter Zugabe von 60 ml 1 N NaOH-Lösung (2.4 g, 60 mmol) in der dritten Reaktionsstufe miteinander umgesetzt und das erhaltene Produkt entsprechend aufgearbeitet. Man erhielt ein Gemisch, das durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (C18, Diol, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O oder 0.1proz. TFA) nicht getrennt werden konnte.

d) Gemäß AAV 7 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 2.02 g (10 mmol) 1,12-Dihydroxydodecan (**39**) und 2.5 ml Tributylamin umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Aus dem Produktgemisch konnte die Zielverbindung nicht isoliert werden.

Tetra-tripropylammonium-4,4'-bis-[(6-(12-hydroxydodecyloxy)-4-(p-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-trans-stilben-2,2'-disulfonat: Gemäß AAV 5 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 2.02 g (10 mmol) Dodecan-1,12-diol (**39**) umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Die Zielverbindung konnte durch HPLC (C18, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O oder 0.1proz. TFA oder 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) nicht isoliert werden.

Tetra-tributylammonium-4,4'-bis-[(6-(12-hydroxydodecyloxy)-4-(p-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-trans-stilben-2,2'-disulfonat: Gemäß AAV 6 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 2.02 g (10 mmol) Dodecan-1,12-diol (**39**) umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Man erhielt ein Produktgemisch, das durch HPLC (Diolphase, Nitrilphase, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O) nicht trennbar war.

7.12 Umsetzung mit D, L-Lysin (**23**)

Hexakalium-4,4'-bis-[(6-(D,L-5-amino-5-carboxyl-pentylamino)-4-(p-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-trans-stilben-2,2'-disulfonat: Gemäß AAV 1 wurden 5.13 g (5 mmol) **6**, 1.46 g (10 mmol) Lysin (**23**) umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt ein rotbraunes Produkt, das durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgende HPLC (C18, NP, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O) nicht getrennt werden konnte.

7.13 Umsetzung mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan (29)

Tetrakalium-4,4'-bis-[(6-(8-amino-3,6-dioxaoctanamino)-4-(*p*-sulfonato-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat: Gemäß AAV 1 wurden 5.13 g (5 mmol) **6** mit 1.48 g (10 mmol) 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan (**29**) umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt ein graugrünes Gemisch, das durch HPLC (Diolphase, C18, Nitrilphase, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O) nicht getrennt werden konnte.

4,4'-Bis-[(6-(8-amino-3,6-dioxaoctanamino)-4-(*p*-sulfo-phenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl))-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonsäure: Gemäß AAV 7 wurden 2.50 g (2.4 mmol) **6** mit 1.48 g (10 mmol) 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan (**29**) Tributylamin umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Die Zielverbindung konnte durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und nachfolgender HPLC (Nitrilphase, CH₃CN-H₂O-Acetrop / H₂O) nicht getrennt werden.

7.14 Untersuchungen zu Dichlortriazinen

2-(12-Aminododecylamino)-2,6-dichlor-1,3,5-triazin (36b): In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler wurden unter Eiskühlung 15 ml Aceton vorgelegt, 1.84 g (10 mmol) Trichlortriazin (**7**) eingerührt und nach 3 min 2.00 g (10 mmol) 1,12-Diaminododecan zugesetzt. Nach 2 h ließ man die entstandene Suspension absitzen, dekantierte die überstehende Lösung ab, trocknete durch scharfes Absaugen und suspendierte den Filterkuchen in 5 ml eiskaltem Aceton. Durch SC an Kieselgel (15 × 5. Chloroform) konnte lediglich das Diaminododecan zurückgehalten werden.

2-(11-Carboxy-undecylamino)-2,6-dichlor-1,3,5-triazin (36c): In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler wurden 15 ml eiskaltes Aceton vorgelegt, 1.84 g (10 mmol) Trichlortriazin (**7**) eingerührt und nach 3 min 4.02 g (20 mmol) 11-Aminoundecansäure (**30**) zugesetzt. Der Reaktionsmischung wurde stets so viel 1 N NaOH-Lösung zugesetzt, daß eine Probe in wäßriger Lösung eine nur leicht saure Reaktion zeigte. Nachdem 10 min lang keine Hydroxid-Lösung mehr verbraucht wurde, teilte man die Suspension in zwei gleiche Teile auf. Die eine

Fraktion wurde nacheinander mit jeweils bei 20 °C gesättigter Lösung aus 5 g Puffersalzmischung sowie 10 g KCl versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Man filtrierte den Niederschlag von der Lösung ab, suspendierte den Filterkuchen in 5 ml Aceton, filtrierte, suspendierte in 5 ml kaltem Et₂O und filtrierte erneut. Das zweite Aliquot wurde mit 2 ml konz. HCl angesäuert und der Niederschlag von der überstehenden Flüssigkeit filtriert. Man suspendierte den Filterkuchen in 5 ml kaltem Aceton, filtrierte, suspendierte in 5 ml kaltem Et₂O und filtrierte erneut. Beide gefällten Produkte wurden analogen Reinigungsmethoden unterworfen: PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und HPLC (C18, CH₃CN-H₂O-Acetrop / 50 mmol Phosphatpuffer) bei 20 °C sowie mit gleichen Laufmitteln und stationären Phasen PDC bei 3 °C (Produkt läuft nicht) und analoger HPLC bei 0 °C (Elution erst nach erwärmen) lieferten das Zielmolekül nicht.

Di-Kalium-4-amino-4'-[(4,6-dichloro)-1,3,5-triazin-2-yl]-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonat (36a): In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler wurden 15 ml eiskaltes Aceton vorgelegt, 1.84 g (10 mmol) Trichlortriazin (**7**) eingerührt und nach 3 min 3.70 g (10 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) zugesetzt. Der Reaktionsmischung wurde stets so viel 1 N NaOH-Lösung zugesetzt, daß eine Probe in wäßriger Lösung eine nur leicht saure Reaktion zeigte. Nachdem 10 min lang keine Hydroxid-Lösung mehr verbraucht wurde, versetzte man mit jeweils bei 20 °C gesättigter Lösung aus 5 g Puffersalzmischung sowie 10 g KCl und kühlte auf 0 °C ab. Man filtrierte den Niederschlag von der Lösung ab, suspendierte den Filterkuchen in 5 ml Aceton und filtrierte. Bei Trennversuchen durch PDC (Kieselgel, NH₃ 26proz.:EE: Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und HPLC (C18, CH₃CN-H₂O-Acetrop / 50 mmol Phosphatpuffer) bei 20 °C und analoger PDC bei 3 °C (Produkt läuft nicht) und analoger HPLC bei 0 °C (Elution erst nach erwärmen) konnte das Zielmolekül nicht erhalten werden.

Bis-4,4'-[(4,6-dichloro)-1,3,5-triazin-2-yl]-amino]-*trans*-stilben-2,2'-disulfonsäure (32): In einem 1 l Zweihalskolben mit Salz / Eisbad wurden einer Mischung aus 150 ml Aceton, 120 g Eis und 25 ml bei Raumtemp. gesättigter Natriumchlorid-Lösung 10.2 g (55 mmol) Trichlortriazin (**7**) zugefügt. In 125 ml 5 °C kaltem Wasser wurden 9.25 g (25 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) suspendiert und unter tropfenweiser Zugabe einer Lösung von 50 mmol Na₂CO₃ in 30

ml Wasser eben gelöst. Die Diaminostilbendisulfonat-Lösung wurde innerhalb einer Stunde bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ zum Trichlortriazin (**7**) gegeben. Dabei wurde der pH-Wert mit dem Rest der Na_2CO_3 -Lösung immer neutral bis schwach sauer gehalten. Nachdem die gesamte Lösung zugegeben wurde, ließ man noch weitere 15 min reagieren, fällte mit 10 ml konz. HCl, filtrierte, schlämmte den Filterkuchen wiederholt mit Eiswasser auf, bis das Filtrat nur noch leicht saure Reaktion zeigte und trocknete bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i. Vak. Man erhielt ein leicht orangefarbenes, sehr polares Produktgemisch, das durch HPLC (C18, CH_3CN - H_2O -Aceotrop / H_2O oder 0.1proz. TFA) nicht getrennt werden konnte.

Di-Kalium-4,4'-bis-[2-chloro-(4-(p-hydroxyphenyl)-ethylamino)-6-(p-sulfonato-phenylamino)-[1,3,5]-triazin-2-yl)]-amino]-trans-stilben-2,2'-disulfonat (37**):**

In einem Braunglas-Zweihalskolben mit Rückflußkühler wurden 25 ml eiskaltes Aceton vorgelegt, 5.00 g (27 mmol) Trichlortriazin (**7**) eingerührt und nach 3 min mit 50 g Eis, 30 g NaCl und 50 ml Wasser versetzt. Zu dieser Mischung wurden 3.72 g (27 mmol) Tyramin (**24**) als 0.25 molare, mit Na_2CO_3 neutralisierte Tyramin-Hydrochlorid-Lösung (**24**) gegossen. Unter Eiskühlung wurde 2 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde stets durch 0.25 molare Na_2CO_3 -Lösung neutral bis leicht sauer gehalten. Nachdem 54 ml Na_2CO_3 -Lösung verbraucht waren, ließ man noch 15 min rühren. Anschließend gab man 5.02 (13.5 mmol) 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (**8**) als 0.25 molare, mit Na_2CO_3 neutralisierte Lösung zu und erwärmte auf $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Reaktionsmischung wurde durch 0.25 molare Na_2CO_3 -Lösung neutral bis leicht sauer gehalten. Nachdem 54 ml Na_2CO_3 -Lösung verbraucht waren, ließ man noch 15 min rühren und gab 7.8 g Puffersalzmischung und anschließend 13.5 g KCl zu. Die erhaltenen Suspensionen wurden unter schwachem Vak. durch ein mit einem Glasfaser-Tiefenfilter bedecktes grobes Papierfilter filtriert. Der Filterkuchen wurde in ein Becherglas übergeführt, mit der 5fachen Menge Wasser aufgeschlämmt, 3 h bei Raumtemp. gerührt, abermals in der gleichen Weise filtriert und bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i. Vak. getrocknet. Man erhielt ein durch PDC (Kieselgel, NH_3 26proz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) und (Kieselgel, HAc konz.:EE:Isopropanol:Wasser / 3:8:10:4) nicht trennbares orangerotes Produktgemisch.

Versuch zur Synthese von Amphotericin B-{4,4'-bis-[(6-(10-Carboxyl-decylamino)-4-phenylamino-1,3,5-triazin-2-yl)]-amino]-trans-stilben-2,2'-

dinatriumsulfonato)-amid: Bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden 30 mg (0.025 mmol) 26 zusammen mit 5,0 mg (0.05 mmol) Triethylamin, 15 mg (0.05 mmol) Phosphorsäurediphenylesterazid und 45 mg (0.05 mmol) AmB (19) 24 h gerührt wobei es auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt wurde. Die Mischung wurden mikrotropfenweise in 250 ml trockenen, heftig gerührten Diethylether eingegossen. Das ausgefallene gelbe Produkt wurde abfiltriert und nacheinander mit je 200 μL 1proz. Zitronensäure und konzentrierter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Dabei Hydrogencarbonat-Lösung nach und erhielt wieder die gelbe Farbe. Das leicht zerfließliche Produkt konnte durch HPLC (C18, nitril, Diolr, $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O-Aceotrop/ H}_2\text{O}$ und 0.1 TFA und 50 mmol Boratpuffer pH 8.2) nur unvollständig gereinigt werden.

7.15 Radiomarkierung

Zur Radiomarkierung wurden 277 MBq Na^{131}I bzw. 37 MBq Na^{125}I zu einer Lösung von 500 μg des Tyramin-Derivates in 250 μL 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 8) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μg Chloramin-T in 100 μL 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 8) gestartet. Nach 1 min wurden 500 μL Wasser zugegeben. Eine SepPack C-18-Kartusche wurde kurz mit 2 ml Methanol, danach mit 2 ml 0.1 M Natriumacetatpuffer (pH 5.4) aktiviert. Die radioaktive Lösung wurde auf die Säule gegeben und das freie Iod mit 2 ml 0.1 M Natriumacetatpuffer (pH 5.4) und das iodierte Blankophor mit 2 ml MeOH eluiert. Das MeOH wurde evaporiert und der Rückstand wurde in 0.9proz. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen. Man erhielt 111 MBq der ^{131}I -markierten und 15 MBq der ^{125}I -markierten Verbindungen (jeweils 40 %) die sofort weiterverwendet wurden.

7.15.1 Bindungs-Studien

Zu 10^5 autoclavierten *Candida albicans* CBS 2730 Zellen in 200 μL PBS wurden 18.5 kBq ^{131}I -Tyramin-Blankophor in 10 μL Natriumchlorid-Lösung gegeben. Man inkubierte eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kontrollexperimente unter sonst identischen Bedingungen wurde mit Konzentrationen von 10^{-14} bis 10^{-6} M Blankophor- / 0.9proz. Natriumchlorid-Lösung durchgeführt, um die unspezifische Bindung von ^{131}I an die *C. albicans*-Zellen zu bestimmen.

7.15.2 Bioverteilungs-Studien

Die Tierversuche wurden nach einer Überprüfung durch die Ethik-Kommission entsprechend der deutschen Gesetzgebung mit der Erlaubnis 60442502 vom Regierungsbezirk Braunschweig durchgeführt. Die Bioverteilungs-Studien und die imaging-Studien wurden an voll entwickelten NMRI-Mäusen (Harlan, Borchon, Germany) durchgeführt. Vorher unbehandelten Tieren wurde 111 kBq des Tyramin-Stilbenderivates injiziert. Nach einer Stunde, 4 Stunden und 24 Stunden wurden jeweils Gruppen aus drei Mäusen mit Kohlendioxid getötet und sofort danach sezirt. Die Masse der einzelnen Organe wurde bestimmt. Um die %i.d./g – Werte bestimmen zu können, wurde die von ihnen ausgehende Aktivität mit einem γ -Zähler vermessen.

Um die Bindungs-Spezifität zu untersuchen, wurden weitere drei Gruppen aus jeweils vier Mäusen gebildet. Diese Mäuse wurden mit Kohlendioxid betäubt. Den Tieren der ersten Gruppe wurde jeweils 50 μ l einer wässrigen Suspension von 2×10^9 autoklavierten *Candida albicans*-Zellen / ml intramuskulär in den hinteren linken Oberschenkel injiziert. Den Tieren der zweiten Gruppe wurde jeweils 50 μ l einer sterilisierten wässrigen Suspension von 8×10^8 *E. coli* / ml intramuskulär in den hinteren rechten Oberschenkel injiziert. Den Tieren der dritten Gruppe injizierte man jeweils jeweils 50 μ l einer wässrigen Suspension von 2×10^9 autoklavierten *Candida albicans*-Zellen / ml intramuskulär in den linken hinteren Oberschenkel und 50 μ l einer sterilisierten wässrigen Suspension von 8×10^8 *E. coli* / ml intramuskulär in den hinteren rechten Oberschenkel. Zwei Stunden später injizierte man allen Tieren der ersten beiden Gruppen und zwei Tieren der dritten Gruppe 111 kBq des 125 I-markierten Blankophor-Derivates in die Schwanzvene. Zwei Stunden darauf wurden die Tiere wie beschrieben getötet. Nach der Sektion wurden die %i.d./g- Werte der Beine und die Verhältnisse der Werte der verschiedenen Gruppen zueinander berechnet.

8. Literaturverzeichnis und Anmerkungen

- [1] H. Laatsch, B. Renneberg, E. Duvernay, A. J. Schmidt, *Naturforsch. Sect. B* **1995**, *50*, 151-157.
- [2] J. H. Seabury, in: *H. A. Buechner, (Hrsg.) Management of Fungus Diseases of the Lungs* **1971**, 32-33, Charles C. Thomas, Springfield, USA.
- [3] R. S. Targan, F. M. Kagnoff, M. D. Brogan, F. Shanahan, *Annals of Internal Medicine* **1987**, *106*, 854-870.
- [4] F. C. Odds, *Candida and Candidosis, a Review and Bibliography* **1988**, *8*, Balliere-Tindall, London.
- [5] S. N. Banerjee, T. G. Gemori, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, T. Horan, J. R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson, W. J. Marone, *Am. J. Med.* **1991**, *91 (Suppl. 3b)*, 86-89.
- [6] C. M. Beck-Sague, W. R. Jarvis, *J. Infect. Dis.* **1993**, *92*, 1840-1849.
- [7] T. E. Kiehn, F. F. Edwards, D. Armstrong, *Am. J. Clin. Pathol.* **1980**, *73*, 518-521.
- [8] R. Saral, *J. Clin. Oncol.* **1991**, *9*, 77-84.
- [9] J. R. Wingard, W. G. Merz, M. G. Rinaldi, T. R. Johnson, J. E. Karp, R. Saral, *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 1274-1277.
- [10] R. J. Blinkhorn, D. Adelstein, P. J. Spagnulo, *J. Clin. Microbiol.* **1989**, *27*, 236-240.
- [11] W. G. Merz, U. Khazen, M. A. Jabra-Rizk, L. C. Wu, G. J. Osterhout, P. F. Lehmann, *J. Clin. Microbiol.* **1992**, *30*, 449-454.
- [12] J. Hoy, K. C. Hsu, K. Rolston, R. L. Hopfer, M. Luna, G. P. Bodey, *Rev. Infect. Dis.* **1986**, *8*, 959-967.
- [13] W. G. Walsh, G. P. Melcher, M. G. Rinaldi, J. Lecciones, D. A. McGough, P. Kelly, J. Lee, D. Callender, M. Rubin, P.A. Pizzo, *J. Clin. Microbiol.* **1990**, *28*, 1616-1622.
- [14] K. J. Kwon-Chung, J. E. Bennett. *Medical Mycology* **1992**, 770-772, Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- [15] Z. N. Aucott, J. Fayen, H. Grossnicklas, A. Morrissey, M. M. Lederman, R. A. Salata, *Rev. Infect. Dis.* **1990**, *12*, 406-411.
- [16] P. Martino, M. Venditti, A. Micozzi, G. Morace, L. Polonelli, M. P. Mantovanil, M. C. Petti, V. L. Burgio, C. Santini, P. Serra, *Rev. Infect. Dis.* **1990**, *12*, 570-582.
- [17] R. T. Kenney, K. J. Kwon-Chung, F. G. Witebsky, D. A. Melnick, H. L. Malech, J. I. Gallin, *Am. J. Clin. Pathol.* **1990**, *94*, 344-350.

- [18] A. Y. Mussa, V. K. Singh, H. S. Randhawa, Z. U. Khan, *J. Mycol. Med.* **1998**, *8*, 196-199.
- [19] M. A. Pfaller, *Clin. Infect. Dis.* **1994**, *19 (Suppl. 1)*, 8-13.
- [20] E. S. Beneke, A. L. Rogers, *Medical Mycology and Human Mycoses* **1996**, 149-204, Star Publishing Company, Belmont, California, USA.
- [21] D. W. Denning, A. Marinus, J. Cohen, D. Spence, R. Herbrecht, L. Pagano, C. Kibbler, V. Krcmery, F. Offner, C. Cordonnier, U. Jehn, M. Ellis, L. Collette, R. Sylvester, Invasive Fungal Infection Group of the European Organization for Research and treatment of Cancer (EORTC), *J. Infect.* **1998**, *37*, 173-180.
- [22] M. D. Richardson, *J. Antimicrob. Chemother.* **1991**, *28 (Suppl A)*, 1-11.
- [23] T. J. Walsh, P. A. Pizzo, *Annu. Rev. Microbiol.* **1988**, *42*, 517-545.
- [24] G. P. Bodey, *Leuk. Lymphoma.* **1993**, *11*, 127-135.
- [25] L. Pagano, P. Ricci, A. Nosari, A. Tonso, M. Buelli, L. Cudillo, A. Canacchi, C. Savignana, L. Melillo, Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell' Adulto, *Br. J. Haematol.* **1995**, *89*, 500-505.
- [26] L. Pagano, A. Antinori, A. Ammassari, L. Mele, A. Nosari, L. Melillo, B. Martino, M. Sanguinetti, F. Equitani, F. Nobile, M. Carotenuto, E. Morra, G. Morace, G. Leone, *Eur. J. Haematol.* **1999**, *63*, 77-85.
- [27] C. Viscoli, C. Girmenia, A. Marinus, L. Collette, P. Martino, B. Vandercam, C. Doyen, B. Lebeau, D. Spence, V. Krcmery, B. E. de Pauw, F. Meunier, Invasive Fungal Infection Group of the European Organization for Research and treatment of Cancer (EORTC), *Clin. Infect. Dis.* **1999**, *28*, 1071-1079.
- [28] J. R. Wingard, W. G. Merz, G. M. Rinaldi, *New. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 1274-1277.
- [29] M. L. Wilson, T. E. Davis, S. Mirrett, J. Reynolds, D. Fuller, S. D. Allen, K. K. Flint, F. Koontz, L. B. Reller, *J. Clin. Microbiol.* **1993**, *31*, 865-71.
- [30] P. Nenoff, T. Friedrich, H. Schwenke, M. Mierzwa, L. C. Horn, U. F. Haustein, *J. med. Vet. Mykol.* **1997**, *35*, 65-69.
- [31] M. S. Seelig, *Bacteriological Reviews* **1966**, *30*, 442-459.
- [32] E. J. Anaissie, *Clin. Infect. Dis.* **1992**, *14 (Suppl. I)*, 43-53.
- [33] M. A. Pfaller, R. Wenzel, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1992**, *11*, 287-291.
- [34] M. D. Richardson, *J. Antimicrob. Chemother.* **1991**, *28 (Suppl. A)*, 1-11.
- [35] S. N. Banerjee, P. G. Emory, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, T. Horant, J. R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson, W. J. Martone *Am. J. Med.* **1991**, *91 (Suppl. 3B)*, 386-389.
- [36] D. R. Schaberg, D. H. Culver, R. P. Gaynes. *Am. J. Med.* **1991**, *91 (Suppl.*

- 3B), 72-75.
- [37] C. Binder, R. Rüchel, *Mykoses* **2000**, 43, 59-63.
- [38] C. M. Beck-Sague, W. R. Jarvis, *J. Infect. Dis.* **1993**, 92, 1840-1849.
- [39] D. W. Denning, *J. Antimicrob. Chemother.* **1991**, 28 (Suppl. B), 1-6.
- [40] R. D. Diamond, *Rev. Infect. Dis.* **1991**, 13, 480-486.
- [41] N. M. Ampel, C. L. Dols, J. N. Galgiani, *Am. J. Med.* **1993**, 94, 235-240.
- [42] R. D. Diamond, *Rev. Infect. Dis.* **1991**, 13, 480-486.
- [43] L. J. Wheat, *Clin. Infect. Dis.* **1992**, 14 (Suppl. I), 91-99.
- [44] W. T. Huges, *Pediatr. Infect. Dis.* **1991**, 10, 391-399.
- [45] E. J. Bow, R. Loewen, S. Cheang, *Clin. Infect. Dis.* **1995**, 21, 361-369.
- [46] J. D. Meyers, *Semin. Oncol.* **1990**, 17 (Suppl. 6), 374-379.
- [47] G. P. Bodey, M. Buckley, Y. S. Sathe, E. J. Freireich, *Ann. Intern. Med.* **1966**, 641, 328-340.
- [48] S. L. Gerson, G. H. Talbot, S. Hurwitz, B. L. Strom, P. A. Cassileth, *Ann. Intern. Med.* **1984**, 10, 345-351.
- [49] H. F. Guiot, W. E. Fibbe, J. W. van't Wout, *Clin. Infect. Dis.* **1994**, 181, 525-532.
- [50] J. M. Wiley, N. Smith, B. G. Leventhal, S. C. Strauss, C. A. Hurwitz, J. Modlin, D. Mellits, R. Baumgardner, B. J. Corden, *J. Clin. Oncol.* **1990**, 8, 280-286.
- [51] B. Pfaffenbach, K. Donhuijsen, J. Pahnke, *Med. Klinik* **1994**, 89, 299-304.
- [52] A. H. Groll, P. M. Shah, C. Mentzel, M. Schneider, G. Just-Nübling, K. Huebner, *J. Infect.* **1996**, 3, 23-32.
- [53] A. P. Grigg, P. Phillips, S. Durham, J. D. Shepherd, *Scand. J. Infect. Dis.* **1993**, 25, 263-267.
- [54] M. J. Robertson, R. A. Larson. *Am. J. Med.* **1988**, 84, 233-239.
- [55] C. H. Kirkpatrick, *Am. J. Med.* **1984**, 77 (4 D), 1-12.
- [56] G. P. Bodey, B. Bueltmann, W. Duguid, D. Gibbs, H. Hanack, M. Hotchi, G. Mall, P. Martino, F. Meunier, S. Milliken, S. Naoe, M. Okudaira, D. Scevola, J. van't Wout, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1992**, 11, 99-109.
- [57] C. C. Campbell, *Prev. Med.* **1974**, 3, 517-28.
- [58] L. Ajello, A. A. Padhye, Systemic mycoses, in: Beran GW, Steele J. H. (Hrsg.), Handbook of Zoonoses, 2nd ed. **1994**, 483-504, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [59] J. R. Graybill, *Infect. Dis. Clinics, N. America* **1995**, 9, 297-311.
- [60] G. A. Sarosi, S. F. Davies, Fungal Diseases of the Lung, 3rd ed. **2000**, 73, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- [61] H. S. Randhawa, Z. U. Khan, *Indian. J. Tuberc.* **1987**, 34, 3-11.

- [62] F. Offner, C. Cordonnier, P. Ljungman, H. G. Prentice, D. Engelhard, D. de Bacquer, F. Meunier, B. de Pauw, *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *26*, 1098-1103.
- [63] B. E. de Pauw, F. Meunier, *Chemother.* **1999**, *45 (Suppl. 1)*, 1-14.
- [64] C. S. Pannuti, R. Ginrich, M. A. Pfaller, C. Kao, R. P. Wenzel, *Cancer* **1992**, *69*, 2653-2662.
- [65] J. Berenguer, M. C. Allende, J. W. Lee, K. Garrett, C. Lyman, N. M. Ali, J. Bacher, P. A. Pizzo, T. J. Walsh, *Am. J. Resp. Crit. Care. Med.* **1995**, *152*, 1079-1086.
- [66] C. R. Curry, P. G. Quie, *New Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1221-1225.
- [67] E. J. Bow, R. Loewen, S. Cheang, *Clin. Infect. Dis.* **1995**, *21*, 361-369.
- [68] D. D'Antonio, A. Iacone, F. S. Schioppa, T. Bonfini, F. Romano, *Current Microbiol.* **1996**, *3*, 118-122.
- [69] T. B. Hyde, K. Gay, D. S. Stephens, D. J. Vugia, M. Pass, S. Johnson, N. L. Barrett, W. Schaffner, P. R. Cieslak, P. S. Maupin, E. R. Zell, J. H. Jorgensen, R. R. Facklam, C. G. Whitney, *J. Am. Med. Assoc.* **2001**, *286*, 1857-1862.
- [70] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, M. Schäfer-Kortig, Arzneimittelwirkungen, 8., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage **2001**, 806, Wiss. Verlags-Gesellschaft, Stuttgart.
- [71] W. G. Walsh, G. P. Melcher, M. G. Rinaldi, J. Lecciones, D. A. MCGough, P. Kelly, J. Lee, D. Callender, M. Rubin, P. A. Pizzo, *J. Clin. Microbiol.* **1990**, *28*, 1616-1622.
- [72] L. A. Zieske, R. D. Kpoke, R. Hamill, *Otolaryngol. Head, Neck. Surg.* **1991**, *105*, 567-577.
- [73] C. M. Wilson, E. J. O'Rourke, M. R. McGinnis, I. F. Salkin, *J. Infect. Dis.* **1990**, *161*, 102-107.
- [74] I. F. Salkin, M. R. McGinnis, M. J. Dykstra, M. G. Rinaldi, *J. Clin. Microbiol.* **1988**, *26*, 498-503.
- [75] E. Anaissie, G. P. Bodey, H. Kantajian, J. Ro, S. E. Vartivarian, R. Hopfer, J. Hoy, K. Rolston, *Rev. Infec. Dis.* **1989**, *11*, 369-378.
- [76] W. Dwyer, *Progress in Allergy* **1984**, *35*, 15-92.
- [77] C. F. Cuff, C. M. Robers, B. J. Lamb, T. J. Rogers, *Cellular Immunology*, **1986**, *100*, 47-56.
- [78] P. Y. Paterson, R. Semo, G. Blumenschein, J. Swelstad, *Clinical and Experimental Immunology* **1971**, *9*, 595-602.
- [79] A. Fischer, J. J. Ballet, C. L. Griscelli, *Journal of Clinical Investigation* **1978**, *62*, 1005-1013.
- [80] R. D. Nelson, M. J. Herron, R. T. McCormack, R. C. Gehrz, *Infection and*

- Immunity* **1984**, *43*, 1041-1046.
- [81] E. W. Carrow, J. E. Domer, *Infection and Immunity* **1985**, *49*, 172-181.
- [82] W. M. Lee, H. P. Holley, J. Stewart, G. M. P. Galbraith, *American Journal of the Medical Sciences* **1986**, *292*, 4749.
- [83] D. W. Denning, E. G. Evans, C. C. Kibbler, M. D. Richardson, M. M. Roberts, T. R. Rogers, D. W. Warnock, R. E. Warren, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1997**, *16*, 424-436.
- [84] M. G. Rinaldi, *Rev. Infect. Dis.* **1991**, *13*, 493-435.
- [85] R. Röchel, *Ann. Hematol.* **1993**, *67*, 1-11.
- [86] J. T. Walsh, P. A. Pizzo, in: K. Holmberg, R. Meyer (Hrsg.), *Diagnosis and therapy of systemic fungal infections* **1987**, 47-70, Raven Press, Ltd., New York.
- [87] M. G. Rinaldi, *Rev. Infect. Dis.* **1991**, *13*, 493-495.
- [88] M. A. Sugar, *Arch. Intern. Med.* **1990**, *150*, 2258-2264.
- [89] T. J. Walsh, J. Lee, J. Lecciones, M. Rubin, K. Buttler, P. Francis, M. Weinberger, E. Roilides, D. Marshall, J. Gress, P. A. Pizzo, *Rev. Infect. Dis.* **1991**, *13*, 496-503.
- [90] D. W. Denning, A. Marinus, J. Cohen, D. Spence, R. Herbrecht, L. Pagano, C. Kibbler, V. Krcmery, F. Offner, C. Cordonnier, U. Jehn, M. Ellis, L. Collette, R. Sylvester, EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group, *J. Infect.* **1998**, *37*, 173-180.
- [91] R. Duthie, D. W. Denning, *Clin. Infect. Dis.* **1995**, *20*, 598-605.
- [92] P. Martino, C. Girmenia, A. Micozzi, R. Raccach, G. Gentile, M. Venditti, F. Mandelli, *Am. J. Med. Sci.* **1993**, *306*, 225-232.
- [93] D. J. Geha, G. D. Roberts, *Clin. Lab. Med.* **1994**, *14*, 83-97.
- [94] R. Lyon, G. Woods, *Am. J. Clin. Pathol.* **1995**, *103*, 660-662.
- [95] R. Röchel, *Ann. Hematol.* **1993**, *67*, 1-11.
- [96] E. Reiss, C. Morrison, *Clin. Microbiol. Rev.* **1993**, *6*, 311-323.
- [97] T. J. Walsh, P. A. Pizzo, *Laboratory diagnosis of Candida infections in: Bodey, G. P. (Hrsg.), Candidiasis, pathogenesis, diagnosis, and treatment*, **1993**, 109-136, Raven press, Ltd., New York.
- [98] R. Kappe, A. Schulze-Berge, H. G. Sonntag, *Mykoses* **1996**, *39*, 13-23.
- [99] R. Röchel, *Ann. Hematol.* **1993**, *67*, 1-11.
- [100] K. Mitsutake, T. Miyazaki, T. Tashiro, Y. Yamamoto, H. Kakeya, T. Otsubo, S. Kawamura, M. A. Hossain, T. Noda, Y. Hirakata, S. Kohno, *J. Clin. Microbiol.* **1996**, *34*, 1918-1921.
- [101] P. Herent, D. Stynen, F. Hernando, J. Fruit, D. Poulain, *J. Clin. Microbiol.* **1992**, *30*, 2158-2164.

- [102] M. Machetti, M. Feasi, N. Mordini, B. van Lint, J. P. Latgé, J. Sarfati, C. Viscoli, *Bone Marrow Transplant.* **1998**, 21, 917-921.
- [103] A. Sulahian, M. Tabouret, P. Ribaud, J. Sarfati, E. Gluckman, J. P. Latgé, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1996**, 15, 139-145.
- [104] C. M. A. Swanink, J. F. G. M. Meis, A. J. M. M. Rijs, J. P. Donnelly, P. E. Verweij, *J. Clin. Microbiol.* **1997**, 35, 257-260.
- [105] P. E. Verweij, D. Stynen, A. J. Rijs, B. E. de Pauw, J. A. Hoogkamp-Korstanje, J. F. Meis, *J. Clin. Microbiol.* **1995**, 33, 1912-1914.
- [106] K. Haynes, T. R. Rogers, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1994**, 13, 670-674.
- [107] T. Obayashi, M. Yoshida, T. Mori, H. Goto, A. Yasuoka, H. Iwasaki, H. Teshima, S. Kohno, A. Horiuchi, A. Ito, H. Yamaguchi, K. Shimada, T. Kawai, *Lancet* **1995**, 345, 17-20.
- [108] P. E. Verweij, Z. Erjavec, W. Sluiters, W. Goessens, M. Rozenberg-Arska, Y. Debets-Ossenkopp, H. F. L. Guiot, J. F. G. M. Meis, *J. Clin. Microbiol.* **1998**, 36, 1612-1616.
- [109] S. Albelda, G. H. Talbott, S. L. Gerson, W. T. Miller, P. A. Cassileth, *Am. J. Med.* **1984**, 76, 1027-1034.
- [110] C. Cordonnier, E. Escudier, F. Verra, L. Brochard, J. F. Bernaudin, J. Fleury-Feith, *Eur. Resp. J.* **1994**, 7, 114-120.
- [111] M. v. Eiff, M. Zühlsdorf, N. Roos, M. Hesse, R. Schulten, J. van de Loo, *Ann. Hematol* **1995**, 70, 135-141.
- [112] R. Jolis, J. Castella, C. Puzo, P. Coll, C. Abeledo, *Chest* **1996**, 109, 601-607.
- [113] L. B. Haramati, *Am. J. Roentgenol.* **1995**, 165, 53-55.
- [114] P. C. Yang, D. B. Chang, C. J. Yu, Y. C. Lee, S. H. Kuo, K. T. Luh, *Thorax* **1992**, 47, 457-460.
- [115] M. Thaler, B. Pastakia, T. H. Shawker, T. O'Leary, P. A. Pizzo, *Ann. Intern. Med.* **1988**, 108, 88-100.
- [116] M. Karthaus, G. Hübner, R. G. Geissler, G. Heil, A. Ganser, *Blood* **1998**, 91, 2087-2089.
- [117] H. Einsele, H. Hebart, G. Roller, J. Löffler, I. Rothenhöfer, C. A. Müller, R. A. Bowden, J. A. van Burik, D. Engelhard, L. Kanz, U. Schumacher, *J. Clin. Microbiol.* **1997**, 35, 1353-1360.
- [118] D. Buchheidt, C. Baust, H. Skladny, J. Ritter, Th. Südhoff, M. Baldus, W. Seifarth, C. Leib-Mösch, R. Hehlmann, *Onkologie* **1999**, 22 (Suppl. 1), 133.
- [119] H. Skladny, D. Buchheidt, C. Baust, F. Krieg-Schneider, W. Seifarth, C. Leib-Mösch, R. Hehlmann, *J. Clin. Microbiol.* **1999**, 37, 3865-3871.

- [120] C. P. Heussel, H. -U. Kauczor, G. Heussel, B. Fischer, M. Begrich, P. Mildenberger, M. Thelen, *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17, 796-805.
- [121] C. P. Heussel, H. U. Kauczor, G. Heussel, B. Fischer, P. Mildenberger, M. Thelen, *Am. J. Roentgenol.* **1997**, 169, 1347-1353.
- [122] C. P. Heussel, H. -U. Kauczor, G. Heussel, B. Fischer, M. Begrich, P. Mildenberger, M. Thelen, *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17, 796-805.
- [123] D. Caillot, O. Casasnovas, A. Bernard, J.-F. Couaillier, C. Durand, B. Cuisenier, E. Solary, F. Piard, T. Petrella, A. Bonnin, G. Couillault, M. Dumas, H. Guy, *J. Clin. Oncol.* **1997**, 15, 139-147.
- [124] N. Roos, A. Fahrenkamp, M. v. Eiff, S. Diederich, T. Bömmelburg, J. Ritter, J. Fegeler, P. E. Peters, *Mykoses* **1991**, 34 (Suppl. 1), 37-41.
- [125] N. M. Marina, P. M. Flynn, G. K. Rivera, W. T. Hughes, *Cancer* **1991**, 68, 594-599.
- [126] C. P. Heussel, H. U. Kauczor, G. Heussel, M. Thelen, B. Jahn, *Eur. Radiol.* **1999**, 9, 616-619.
- [127] C. P. Heußel, H. U. Kauczor, G. Heußel, M. Poguntke, S. Schadmand-Fischer, P. Mildenberger, M. Thelen, *Fortschr. Röntgenstr.* **1998**, 169, 128-134.
- [128] R. C. Semelka, J. P. Shoenut, H. M. Greenberg, E. J. Bow, *J. Magn. Reson. Imag.* **1992**, 2, 341-345.
- [129] F. H. Miller, S. Parikh, R. M. Gore, A. A. Nemcek, S. W. Fitzgerald, R. L. Vogelzang, *Radiographics* **1993**, 13, 587-596.
- [130] G. J. Hageage, B. J. Harrington, *Lab. Med.* **1984**, 15, 109-112.
- [131] H. H. Koch, M. Pimsler, *Lab. Med.* **1987**, 18, 603-606.
- [132] R. Rüchel, M. Schaffrinski, P. Schobert, *Mykoses* **1995**, 38 (Suppl. 1), 28-32.
- [133] ebd.
- [134] J. E. Monheit, D. F. Cowan, D. G. Moore, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1984**, 108, 616-618.
- [135] R. Rüchel, S. Margraf, *Mykoses* **1993**, 36, 239-242.
- [136] H. Maeda, N. Ishida, *J. Biochem.* **1967**, 62, 276-278.
- [137] R. Rüchel, S. Margraf, *Mykoses* **1993**, 36, 239-242.
- [138] Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Rüchel für die Bereitstellung der Aufnahme.
- [139] S. Andreas, S. Heindl, C. Wattky, K. Möller, R. Rüchel, *Eur. Respir. J.* **2000**, 15, 407-411.
- [140] G. Wedler, Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 3., durchgesehene Auflage, **1987**, 563, Verlag Chemie, Weinheim.

- [141] H. Zollinger, *Color Chemistry* **1987**, 203, Verlag Chemie, Weinheim.
- [142] Für Polyester und Polypropylen wird Bis-(benzoxazol-2-yl) eingesetzt, während bei Polyamiden, Wolle, Seide und Acetaten 1,3-Diphenylpyrazolin verwendet wird.
- [143] A. Brockes, *Fluorescent Whitening Agents* **1975**, *Suppl. Vol. IV*, 19-24, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- [144] F. Klaschka, *Dermatosen* **1994**, 42, 66-70 und Fußnoten darin.
- [145] ebd., 13-25, 28-32.
- [146] A. K. Resnitenko, N. M. Vosilenko, G. L. Mugikowski, E. P. Krasnovzkaja, *Gigenia i Sanitarya* **1984**, 49, 85-87.
- [147] M. A. Darken, *Science* **1961**, 133, 346.
- [148] M. A. Darken, *Appl. Microbiol.* **1962**, 10, 387.
- [149] G. J. Hageage, B. J. Harrington, *Lab. Med.* **1984**, 15, 109-112.
- [150] J. E. Monheit, D. F. Cowan, D. G. Moore, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1984**, 108, 616-618.
- [151] M. Hejtmanek, J. Dolezel, I. Holubova, *Folia Microbiol.* **1990**, 32, 437-442.
- [152] R. Rüchel, M. Schaffrinski, *J. Klin. Microbiol.* **1999**, 37, 2694-2696.
- [153] H. Maeda, N. Ishida, *J. Biochem.* **1967**, 62, 276-278.
- [154] C. H. Haigler, R. M. Brown Jr., M. Benziman, *Science* **1980**, 210, 903-906.
- [155] W. Herth, *J. Cell. Biol.* **1980**, 87, 244-250.
- [156] H. Hollaender, W. Keilig, J. Bauer, E. Rothemund, *Mykopathologica* **1984**, 88, 131-134.
- [157] N. A. R. Gow, G. M. Gadd, *The growing Fungus*, **1994**, 44, 48, Chapman & Hall, London.
- [158] N. A. R. Gow, G. M. Gadd, *The growing Fungus*, **1994**, 43, Chapman & Hall, London.
- [159] ebd.
- [160] M. Debono, R. S. Gordee, *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, 48, 471-497.
- [161] A. W. Taylor, B. J. Costello, P. A. Hunter, W. S. MacLachlan, C. T. Shanks, *J. Antibiot.* **1993**, 46, 486-493.
- [162] M. Benziman, C. H. Haigler, R. M. Brown Jr., A. R. White, K. M. Cooper, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, 77, 6678-6682.
- [163] C. J. Venglarik, A. K. Singh, R. J. Bridges, *Molecul. Cell. Biochem.* **1994**, 140, 137-146.
- [164] V. Frank, *Folia Microbio.* **1991**, 36, 92-96.
- [165] C. A. Kauffman, P. L. Carver, *Drugs* **1997**, 53, 539-549.
- [166] V. A. Luna, B. K. Stewart, D. L. Bergeron, C. R. Clausen, J. J. Plorde, T. R. Fritsche, *Amer. J. Clinic. Patholog.* **1995**, 103, 656-659.

- [167] Patentschrift DE 195 00 791 C1, Bayer AG, Leverkusen
- [168] H. Maeda, N. Ishida, *J. Biochem.* **1967**, *62*, 276-278.
- [169] M. Hejtmanek, J. Dolezel, I. Holubova, *Folia Microbio.* **1990**, *35*, 437-442.
- [170] D. Gegiou, K. A. Muszkat, E. Fischer, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 3907-3918.
- [171] F. B. Mallory, C. W. Mallory, S. E. Sen Loeb, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3773-3776.
- [172] H. Meier, *Angew. Chemie* **1992**, *104*, 1425-1446.
- [173] P. J. Wood, *Carbohydr. Res.* **1980**, *81*, 271-287.
- [174] I. D. Rattee, M. M. Greur, *The physikal chemistry of dye absorption* **1987**, 181-182, Academic Press, Inc., New York.
- [175] P. Rys, H. Zollinger, *Farbstoffchemie - Ein Leitfaden* 3. Aufl. **1982**, *78*, Verlag Chemie, Weinheim.
- [176] A. Aszalos, A. Bax, N. Burlinson, P. Roller, C. McNeal, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1699-1713.
- [177] K. M. Abusalah, *British J. Biomed. Science* **1996**, *53*, 122-133.
- [178] L. Brajtburg, W. G. Powderly, G. S. Kobayashi, G. Medoff, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 183-188.
- [179] K. Yamashita, V. Janout, E. M. Bernard, D. Armstrong, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6249-6253.
- [180] J. Bolard, *Biochem. Biophys. Acta* **1986**, *864*, 257-304.
- [181] J. Brajtburg, J. Bolard, *Clinical Microbiology Reviews* **1996**, *9*, 512-531.
- [182] W. Forth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* 6. Aufl. **1996**, 679-687, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [183] S. C. Hartsel, S. K. Benz, W. Ayenew, J. Bolard, *European Biophysics Journal* **1994**, *23*, 125-132.
- [184] B. Cybulska, J. Bolard, O. Seksek, A. Czerwinski, E. Borowski, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1240*, 167-178.
- [185] L. Brajtburg, W. G. Powderly, G. S. Kobayashi, G. Medoff, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 183-188.
- [186] M. Baginski, P. Gariboldi, E. Borowski, *Biophys. Chemistry* **1994**, *49*, 241-250.
- [187] J. Mukherjee, L. S. Zuckier, M. D. Scharff, A. Casadevall, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 580-587.
- [188] W. Forth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* 6. Aufl. **1996**, 679-687, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [189] J. Langlet, J. Berges, J. Caillet, J.P. Demaret, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1191*, 79-93.

- [190] J. Caillet, J. Berges, J. Langlet, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1240, 179-195.
- [191] J. Brajtburg, J. Bolard, *Clinical Microbiology Reviews* **1996**, 9, 512-531 und Fußnoten darin.
- [192] J. Y. Ranchere, J. F. Latour, C. Fuhrmann, C. Lagallarde, F. Loreuil, J. Antimicrob. *Chemother.* **1996**, 37, 1165-1169.
- [193] M. G. Rinaldi, *Rev. Infect. Dis.* **1991**, 13, 493-495.
- [194] E. W. van Etten, M. Otte-Lambilion, W. van Vianen, M. T. ten Katen, A. J. Bakker-Woudenberg, *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, 35, 509-519.
- [195] W. Mechlinski, C. P. Schaffer, *J. Antibiot.* **1972**, 25, 256-259.
- [196] A. Czerwinski, T. Zieniawa, E. Borowski, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 680-683.
- [197] A. Jarzebski, L. Falkoeski, E. Borowski, *J. Antibiot.* **1982**, 35, 220-229.
- [198] L. Falkoeski, A. Jarzebski, B. Stefanska, E. Bylec, E. Borowski, *J. Antibiot.* **1980**, 33, 103-104.
- [199] J. Grzybowska, E. Borowski, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 907-908.
- [200] M. J. Driver, A. R. Greenless, W. S. MacLachlan, D. T. MacPherson, A. W. Taylor, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 4357-4360.
- [201] D. F. Corbett, D. K. Dean, A. R. Greenless, D. T. MacPherson, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 509-515.
- [202] A. W. Taylor, B. J. Costello, P. A. Hunter, W. S. MacLachlan, C. T. Shanks, *J. Antibiot.* **1993**, 46, 486-493.
- [203] A. K. Czerwinski, W. A. König, T. Zieniawa, P. Sowinski, V. Sinnwell, S. Milewski, E. Borowski, *J. Antibiot.* **1991**, 44, 979-984.
- [204] A. Czerwinski, J. Grzybowska, E. Borowski, *J. Antibiot.* **1986**, 39, 1025-1027.
- [205] J. J. K. Wright, J. A. Albarella, L. R. Krepski, D. Loebenberg, *J. Antibiot.* **1982**, 35, 911-914.
- [206] L. Falkowski, J. Golik, P. Kolodziejczyk, J. Pawlak, J. Zielinski, T. Ziminski, E. Borowski, *J. Antibiot.* **1975**, 28, 244-245.
- [207] V. V. Belakhov, I. D. Shenin, R. A. Arabiiskii, E. B. Shtilbans, *Antibiotiki i Khimoterapiia* **1996**, 41, 4-8.
- [208] A. Czerwinski, W. A. König, P. Sowinski, L. Falkowski, J. Mazerkski, E. Borowski, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 1098-1110.
- [209] R. M. Kennedy, A. Abiko, S. Masamune, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 447-450.
- [210] D. P. Bonner, W. Mechlinski, C. P. Schaffer, *J. Antibiot.* **1972**, 25, 261-262.
- [211] W. Forth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* 6. Aufl. **1996**, 679-687, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- [212] W. Forth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Aufl. **1996**, 679-687, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [213] B. Torp, Diplomarbeit, 1997, Göttingen
- [214] P. F. Gordon, P. Gregory, *Organic Chemistry in Color* **1983**, 278-281, Springer Verlag, Berlin.
- [215] G. Ebner, D. Schelz, *Textilfärberei und Farbstoffe* **1989**, 296, Springer Verlag, Berlin.
- [216] I. D. Rattee, in: K. Venkatamaran, *The chemistry of Synthetic Dyes* **1978**, 1-36, Academic Press, New York.
- [217] Patentschrift DE19500791C1 Bayer AG, Leverkusen.
- [218] Offenlegungsschrift zu DT 2016773, J. R. Geigy AG, Basel.
- [219] A. P. Foucault, I. Chevolot, *J. Chromatogr.* **1998**, A 808, 3-22
- [220] Raymond, Weintraub, *science* **1959**, 711
- [221] Raymond, Wang, *Anal. Biochem.* **1969**, 1, 391-396
- [222] F. C. Greenwood, W. M. Hunter, J. S. Glover, *Biochem. J.* **1963**, 89, 114-123.
- [223] T. Kometani, D. S. Watt, T. Ji, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 2043-2046.
- [224] T. Kometani, D. S. Watt, T. Ji, T. Fitz, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 5384-5387.

Danksagungen

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Rüchel für seine stets uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude aussprechen.

Ich danke Dr. Martin Behe für die Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. Dirk Schröder bedanke ich mich für die freundschaftliche Unterstützung und seine Zeit. Danke, Dirk!

Bei Herrn Dipl.-Chem. Peter Grzeganeck bedanke ich mich für den unkomplizierten Austausch von Arbeitsmaterialien, Mittagessen, CD's,

Für die Durchführung der spektroskopischen Messungen bedanke ich mich bei den Damen und Herren der Arbeitsgruppen NMR sowie Massenspektrometrie.

Ich danke meinen Eltern, ohne die ich mein Studium weder hätte aufnehmen noch beenden können.

Mein größter Dank gebührt meiner Frau Kathrin, die mit ihrer unvergleichlichen Liebe, Kraft und Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit bei mir war. Dabei frage ich mich, warum diejenigen, die an erster Stelle stehen sollten, immer zuletzt genannt werden.

Lebenslauf

Am 8. Juli 1969 wurde ich als Sohn von Brigitte und Hans Matthias Torp in Sanderbusch geboren.

Von 1975 bis 1978 besuchte ich die Grundschule in Bad Bevensen und anschließend von 1978 bis 1980 die dortige Orientierungsstufe. Danach wechselte ich zum Gymnasialzweig der Kooperativen Gesamtschule, wo ich im Mai 1989 mit Bestehen des Abiturs die Allgemeine Hochschulreife erlangte.

Von September 1989 bis August 1990 leistete ich meinen Zivildienst bei einem Krankentransportunternehmen in Bad Bevensen ab.

Zum Wintersemester 1990/91 nahm ich das Studium der Chemie an der Georg-August-Universität in Göttingen auf, wo ich am 14. Oktober 1994 die Diplomvorprüfung ablegte. Nach anschließendem Hauptstudium fertigte ich unter wissenschaftlicher Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Laatsch (Institut für Organische Chemie) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Rüchel (Institut für Hygiene und Humangenetik) meine Diplomarbeit mit dem Thema „Zellwandaktive Substanzen in der antimykotischen Therapie – Synthese von Spacer-verbundenen Amphotericin B – Stilben-Hybriden mit hoher Polyglucan-Selektivität“ an. Am 27. Juni 1997 legte ich die Diplom-Hauptprüfung ab. Im selben Arbeitskreis arbeite ich seit Juli 1997 an meiner Dissertation mit dem Thema „Untersuchungen an Flavonsäurederivaten mit hoher β -Glukanaffinität“.

Ich besitze die deutsche Staatsbürgerschaft.