

- [1] a) H. Waldmann, M. Thutewohl, *Top. Curr. Chem.* **2001**, *211*, 117–130; b) A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360–4383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4192–4214.
- [2] S. M. Sebti, A. D. Hamilton, *Oncogene* **2000**, *19*, 6584–6593.
- [3] A. Levitzki, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 1–3.
- [4] a) M. Schlitzer, M. Böhm, I. Sattler, H.-M. Dahse, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1991–2006; b) V. Manne, N. Yan, J. M. Carboni, A. V. Tuomari, C. S. Ricca, J. Gullo Brown, M. L. Andahazy, R. J. Schmidt, D. Patel, R. Zahler, R. Weinmann, C. J. Der, A. D. Cox, J. T. Hunt, E. M. Gordon, M. Barbacid, B. R. Seizinger, *Oncogene* **1995**, *10*, 1763–1779.
- [5] K. Shiomi, H. Yang, J. Inokoshi, D. Van der Pyl, A. Nakagawa, H. Takeshima, S. Omura, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 229–234.
- [6] a) K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1298–1301; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1236–1239; b) K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 227–236.
- [7] C. Cabrele, M. Langer, A. G. Beck-Sickinger, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4353–4361.
- [8] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35–42.
- [9] Die bei der Anknüpfung des Bausteins **7** unter Standardbedingungen auftretende beträchtliche Racemisierung konnte durch Kupplung mit PyAOP weitgehend zurückgedrängt werden.
- [10] Für eine detaillierte Zusammenstellung der Synthesergebnisse siehe Hintergrundinformationen (Tabelle S1 und Abbildung S1).
- [11] D. L. Pompiano, R. P. Gomez, N. J. Anthony, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7945–7946.
- [12] Modifizierung der Vorschrift aus [11]: Verwendet wurde ein Fluorocan-FL-Fluorometer der Firma Ascent Labsystems; Filter:  $\lambda_{\text{ex}} = 355$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm. 96er Mikrotiterplatte: Pro Feld wurden 20  $\mu\text{L}$  einer Lösung von Ratten-Farnesyltransferase (2.6  $\mu\text{M}$  im unten angegebenen Puffermedium) über die Dispenserfunktion des Gerätes zu 180  $\mu\text{L}$  einer bei 30 °C vorinkubierten Lösung von FPP (10  $\mu\text{M}$ ), Dansyl-GCVLS-Peptid (10  $\mu\text{M}$ ), variierten Konzentrationen des Inhibitors, in 20  $\mu\text{L}$  Methanol und 160  $\mu\text{L}$  Pufferlösung (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM DTE, 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 % (w/v) *n*-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid) gegeben und anschließend der Kurvenverlauf während 5 min bei 30 °C aufgenommen.
- [13] Modifizierung eines Verfahrens gemäß D. L. Pompiano, E. Rands, M. D. Schaber, S. D. Mosser, N. J. Anthony, J. B. Gibbs, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3800–3807. Zu 100  $\mu\text{L}$  einer Lösung von K-Ras (0.27  $\text{mg L}^{-1}$ ), humaner PFT, im Puffermedium (8.6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 17.1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 1.32  $\text{mg mL}^{-1}$  DTT, 86 mM Tris/HCl pH 8.0) werden 10  $\mu\text{L}$  [ $^3\text{H}$ ]-FPP-Lösung (3.3 mM, 15–30 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ , New England Nuclear) pipettiert und die Mischung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  einer Lösung von konz. HCl in Ethanol (15 %) abgebrochen, das ausgefallene Ras-Protein wird über Filtermatten (Typ B) in einem Tomtec-Harvester filtriert und die übertragene Radioaktivität mit einem Wallac 1024 Betaplate Szintillationszähler gemessen.
- [14] Für Details zum Molecular Modelling siehe die Hintergrundinformationen. Für Molecular-Modelling-Untersuchungen an der PFT siehe a) J. Sakowski, M. Böhm, I. Sattler, H. M. Dahse, M. Schlitzer, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2886–2899; b) M. Schlitzer, M. Böhm, I. Sattler, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 615–620; c) A. Perdetti, L. Villa, G. Vistoli, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1460–1465.
- [15] I.-M. Karaguni, K.-H. Glüsenkamp, A. Langerak, C. Geisen, V. Ullrich, G. Winde, T. Mörry, O. Müller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 709–713.
- [16] J. Behrens, M. Mareel, F. M. Van Roy, W. Birchmeier, *J. Cell. Biol.* **1989**, *108*, 2435–2447.
- [17] Bei 100  $\mu\text{M}$  und höheren Inhibitorkonzentrationen bis zu 1 mM wurde bei MDCK-Zellen kein Effekt beobachtet.
- [18] Abkürzungen: DEAD = Azodicarbonsäure-diethylester, HATU = 1-[bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5*b*]pyridinium hexafluorophosphat 3-oxid, PyAOP = 7-aza-1-hydroxybenzotriazol-1-yl-*N*-oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphat, NMP = 1-Methyl-2-pyrrolidon, DIC = *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid, HOAt = 7-aza-1-hydroxybenzotriazol, DTT = 1,4-Dithio-D,L-threit, DTE = 1,4-Dithioerythrit, DIPEA = Diisopropylethylamin, NMA = *N*-Methylamin, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin.

## Mit molekularer Symmetrie zu neuen Wirkstoffen: Hydroxymethyl-substituierte 3,9-Diazatetraasterane als erste eigenständige Klasse symmetrischer MDR-Modulatoren\*\*

Andreas Hilgeroth,\* József Molnár und Eric De Clercq

Integrale Proteine als Ionenkanäle, Neurorezeptoren oder Transportproteine sind problematische Targetstrukturen für die moderne Wirkstoffentwicklung, da die Erkennungs- oder Bindungsregionen von funktionsmodifizierenden Arzneistoffen häufig nicht oder nur unzureichend bekannt sind.<sup>[1]</sup> Ein Design auf der Basis von Struktur-Wirkungs-Beziehungen setzt die möglichst genaue Kenntnis der räumlichen Anordnung der proteinogenen Aminosäuren dieser Bindungsregionen voraus.<sup>[1]</sup> Da die Strukturaufklärung bei integralen Membranproteinen außerordentlich problematisch ist, gründen sich Theorien über ihre Funktion und deren Beeinflussung mit Wirkstoffen häufig auf Modelle.<sup>[1,2]</sup> Zu diesen bislang in ihrer Funktion nur modellhaft beschriebenen und hochaktuellen Targetstrukturen für die Bekämpfung der problematischen Mehrfachresistenz (multidrug resistance, MDR) in der Krebstherapie gehören die transmembranständigen Molekelpumpen P-Glycoprotein (P-GP) und das Multidrug-Resistance-assoziierte Protein (MRP).<sup>[3,4]</sup> Durch ihre Einbindung in die fluide Membran der Zelle ist eine Kristallisation erheblich erschwert, die notwendig wäre für die Strukturaufklärung der Bindungsregion für modifizierende Arzneistoffe, die die MDR im Sinne einer Blockade der Molekelpumpen modulieren oder umkehren könnten. Bis heute ist damit eine gezielte Entwicklung von so genannten MDR-Modulatoren auf der Basis von Targetstrukturen nicht möglich. Dennoch konnten bislang zahlreiche Arzneistoffe aus unterschiedlichen Wirkstoffklassen wie Verapamil (VRP) oder Cyclosporin A als MDR-Modulatoren in In-vitro-Assays charakterisiert werden, die bei Applikation mit den P-GP- und MRP-Substraten deren Ausschleusen aus den Tumorzellen als Inhibitoren der Pumpen vermindern.<sup>[5]</sup> Ihre pharmakologische Eigenwirksamkeit, durch die auch weiterentwickelte, strukturell modifizierte Verbindungen gekennzeichnet

[\*] Priv.-Doz. Dr. A. Hilgeroth  
Martin-Luther-Universität  
Institut für Pharmazeutische Chemie  
Wolfgang-Langenbeck-Straße 4  
06120 Halle (Deutschland)  
Fax: (+49) 345-55-27026  
E-mail: hilgeroth@pharmazie.uni-halle.de

Prof. Dr. J. Molnár  
Universität Szeged  
Abteilung für Medizinische Mikrobiologie  
Dom ter 10, 6720 Szeged (Ungarn)

Prof. Dr. E. De Clercq  
Katholieke Universiteit Leuven  
Rega Institute for Medical Research  
3000 Leuven (Belgien)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft und von der EU im Rahmen der COST-B16-Aktion gefördert.

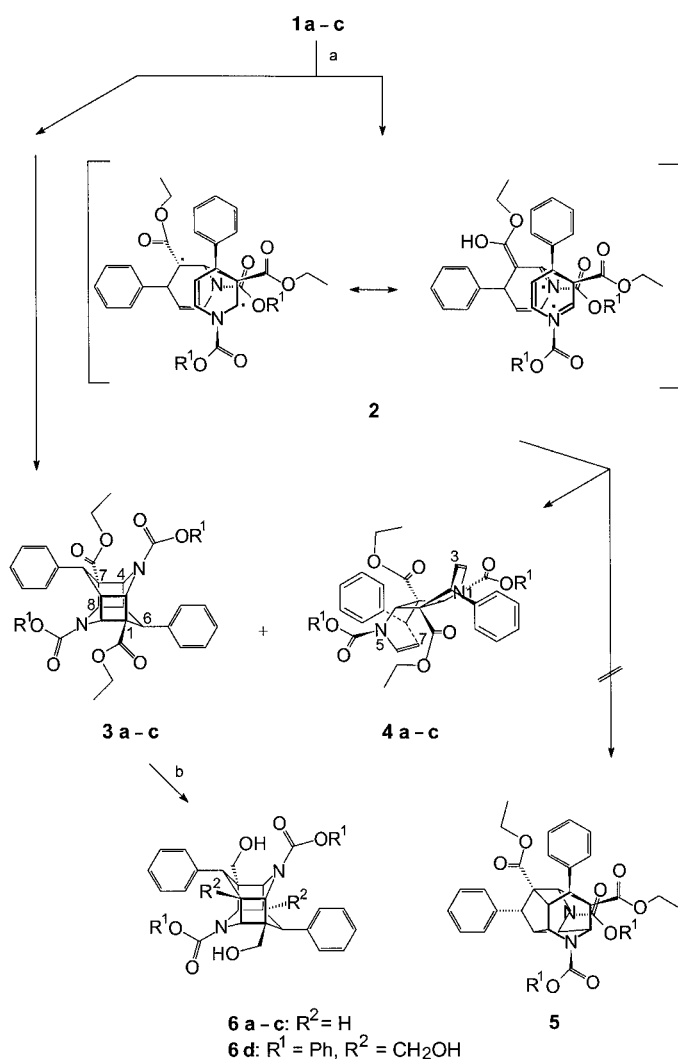
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder beim Autor anzufordern.

sind, schließt jedoch eine Anwendung als MDR-Modulatoren aus, da für die gewünschten inhibierenden Effekte überwiegend Konzentrationen in Bereichen erforderlich wären, in denen die Eigenwirkungen überwiegen oder toxische Nebenwirkungen auftreten.<sup>[6]</sup>

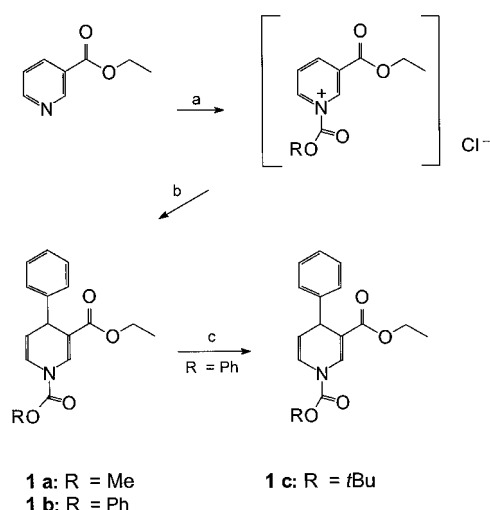
Wir stellen hier die bislang einzige Klasse eigenständiger symmetrischer Modulatoren vor. In ersten In-vitro-Assays an MDR-resistenten Krebszellen konnten wir zeigen, dass zur Umkehr der MDR Konzentrationen unterhalb zytotoxischer Relevanz ausreichend sind. Die neuartigen Modulatoren vom Typ der Hydroxymethyl-substituierten 3,9-Diazatetraasterane weisen im Gegensatz zu allen anderen bisherigen Wirkstoffen einen symmetrischen Bau auf. Mit ihrer rigiden Käfigstruktur ist die Anordnung der funktionellen Gruppen für Wechselwirkungen mit Aminosäuren der potenziellen Bindungsregion genau festgelegt. Da die Verbindungen stark inhibitorisch wirksam sind, könnte mit ihrem rigiden symmetrischen Bau erstmals ein Hinweis auf einen möglichen, bislang unbekannten symmetrischen Bau der potenziellen Proteinbindungsregion der Modulatoren gegeben sein.

Zur Herstellung der symmetrischen Inhibitoren **6a–c** gingen wir von den *N*-substituierten 4-Aryl-1,4-dihydropyridinen **1a–c** aus. **1a** und **1b** wurden durch Umsetzung von Nicotinsäureethylester mit Chlorameisensäuremethyl- bzw. -phenylester und anschließende regioselektive Arylierung an der 4-Position unter Kupfer(I)-iodid-Katalyse<sup>[7]</sup> erhalten (Schema 1); das *N*-Boc-Derivat **1c** wurde aus **1b** mit Kalium-*tert*-Butoxid erhalten.

Interessanterweise lieferte die Bestrahlung von Lösungen der Verbindungen **1a–c** mit Ultra-Vitalux-Lampen bei  $\lambda > 270$  nm unter Anregung des 1,4-Dihydropyridin-Chromophors zwischen 296 und 305 nm die 3,9-Diazatetraasterane **3a–c** als Kopf-Schwanz-verknüpfte, zentrosymmetrische Dimerisierungsprodukte neben den entsprechend verknüpften neuartigen *anti*-Dimeren **4a–c** (Schema 2). Beide Arten der Dimerisierungsprodukte sind bislang als direkte Reaktionsprodukte für 5-unsubstituierte 4-Aryl-1,4-dihydropyridine



Schema 2. Synthese der Targetstrukturen **6a–c** aus den monomeren 4-Aryl-1,4-dihydropyridinen. a)  $h\nu$ ,  $\lambda > 270$  nm, 4 Wochen, 27°C, THF, **3a** (44%), **4a** (33%), **3b** (46%), **4b** (32%), **3c** (41%), **4c** (38%); b)  $LiAlH_4$  (1 Äquiv.), 2 h, –8°C, THF, **6a** (78%), **6b** (75%), **6c** (65%).



Schema 1. Synthese der monomeren 4-Aryl-1,4-dihydropyridine. a)  $CuI$  (5 Mol-%),  $ROCOCl$  (1 Äquiv.), 10 min, –8°C, THF; b)  $PhMgCl$  (1 Äquiv.), 30 min, RT, **1a** (75%), **1b** (83%); c)  $tBuOK$  (2 Äquiv.), 30 min, –18°C, THF, **1c** (69%).

nicht beschrieben; für die entsprechenden *N*-Alkyl-substituierten monomeren 1,4-Dihydropyridin-Derivate wurden Tetrakis-homocubane **5** als Reaktionsprodukte gefunden.<sup>[7]</sup> Zurzeit untersuchen wir die Ursachen des überraschend andersartigen Reaktionsverlaufs. Im Falle der *anti*-Dimere ziehen wir einen stabilisierenden konjugativen Effekt der *N*-Oxycarbonylgruppe auf ein hypothetisches intermediäres Biradikal **2** in Betracht, der über eine Bindungsrotation dann zur *anti*-Dimerenbildung führt. Die abschließende selektive Estergruppenreduktion am substituierten Cyclobutanring der Dimere zu den Zielverbindungen **6a–c** erfolgte mit Lithiumaluminiumhydrid bei tiefer Temperatur.

Im In-vitro-Assay auf Hemmung der Molekelpumpenaktivität wird mit einer Fluoreszenzmessung unbehandelter und mit P-GP-Modulatoren behandelter Zellen das Verhältnis der Aufnahme eines spezifisch bindenden, fluoreszierenden P-GP-Transportersubstrates, z. B. Rhodamin R123, von Tumorstammzellen einerseits und von mittels MDR-Gentransfektion resistent gewordenen Zellen andererseits als P-GP-inhibitorisches Aktivitätsverhältnis (*R*) berechnet (Tabel-

le 1).<sup>[8]</sup> Durch diesen direkten Vergleich der Fluoreszenzdaten ist gesichert, dass die beobachteten Aktivitäten von der spezifischen P-GP-Inhibition durch die MDR-Modulatoren herrühren.

Tabelle 1. Effekte der Hydroxymethyl-3,9-diazatetraasterane **6a–d** auf die MDR von Tumorzellen (Maus-T-Lymphom).<sup>[a]</sup>

Verbindung	Aktivitätsverhältnisse ( <i>R</i> ) <sup>[b,c]</sup>	
	3 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$
<b>6a</b>	1.11	18.62
<b>6b</b>	28.10	30.87 <sup>[d]</sup>
<b>6c</b>	6.81	7.42 <sup>[d]</sup>
<b>6d</b>	0.97	5.40

[a] VRP-Kontrolle mit 11  $\mu\text{M}$ : 7.27. 11  $\mu\text{M}$  ist nach Lit. [8] die relevante Maximalkonzentration zur MDR-Modulation. Die Verbindungen sind aktiv (A), wenn das Verhältnis  $R > 1.1$  ist, und sehr aktiv (AA) für  $R$ -Werte  $> 10$ .<sup>[8]</sup> [b]  $R = \frac{(\text{MDR, behandelt/MDR, unbehandelte Kontrolle})}{(\text{Stammzelllinie, behandelt/Stammzelllinie, unbehandelte Kontrolle})}$ . [c] Mittelwerte aus zwei Bestimmungen. [d] Sättigungskonzentration für P-GP-Inhibition.

Bei den untersuchten Hydroxymethyl-Käfigverbindungen **6a–c** wurde für die *N*-Methoxycarbonyl-substituierte Verbindung **6a** eine Wirksamkeit ähnlich der von VRP ermittelt, wobei ein linearer Zusammenhang von Konzentration und inhibitorischer Aktivität festgestellt wurde. Als Strukturmerkmale für eine ausreichende Aktivität von MDR-Modulatoren gelten zwei lipophile Reste und ein basisches Stickstoffatom, das in Arbeiten von Ecker et al. erstmals durch eine Estergruppenfunktion als Wasserstoffbrücken(WB)-Acceptor ersetzt wurde.<sup>[9,10]</sup> In unseren Verbindungen ist das Stickstoffatom als hydrophiles Strukturelement durch die Hydroxymethylgruppen ersetzt. Mit einer Zunahme der Aktivität für die mit lipophileren Gruppen am N-Substituenten ausgestatteten Verbindungen **6b** und **6c** bei geringen Konzentrationen wird das Konzept einer ausreichenden Lipophilie für eine gute MDR-Modulation unterstützt.<sup>[11]</sup> Interessant ist dabei, dass mit einer Erhöhung der Gesamtanzahl an potenziellen WB-Donor/Acceptorfunktionen von vier (zwei Hydroxymethylgruppen und zwei Carbamidestergruppen) in Verbindung **6b** auf insgesamt sechs (vier Hydroxymethylgruppen und zwei Carbamidestergruppen) in Verbindung **6d**<sup>[12]</sup> ein völliger Verlust der Wirksamkeit bei gleicher geringer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  verbunden ist. Bislang wurde für eine optimale Bindungsaffinität zum P-GP eine hohe Anzahl von WB-Bindungsfunktionen für Wechselwirkungen mit den Amidfunktionen der diskutierten Bindungsseite des P-GP favorisiert.<sup>[11,13,14]</sup> Erste Untersuchungen einer Reihe von 3,9-Dialkyl-3,9-diazatetraasteranen<sup>[15]</sup> zeigen für ein 3,9-Dibenzyl-Derivat mit vier Hydroxymethylgruppen inhibitorische Aktivitätsverhältnisse von 30.19 bei 3  $\mu\text{M}$  und 24.83 bei 30  $\mu\text{M}$ . Mit insgesamt vier WB-Donor/Acceptorfunktionen entspricht die Wirksamkeit damit der der Verbindung **6b**, die ja ebenfalls mit zwei Hydroxymethylgruppen und zwei Carbamidestergruppen vier entsprechende Funktionen für WB-Bindungen aufweist. Ein 3,9-Dimethyl-3,9-diazatetraasteran mit vier Hydroxymethylgruppen weist mit  $R = 0.88$  (3  $\mu\text{M}$ ) und 4.7 (30  $\mu\text{M}$ ) erst bei 30  $\mu\text{M}$  eine nennenswerte P-GP-inhibitorische Aktivität auf. Dies unterstreicht die Bedeutung eines voluminösen lipophilen N-Substituenten für die inhibitorische Aktivität, die sich bereits beim Ver-

gleich des 3,9-Dimethoxycarbonyl-Derivates **6a** mit dem 3,9-Diphenoxycarbonyl-Derivat **6b** zeigt. Eine Verringerung der Anzahl an Hydroxymethylgruppen von vier auf zwei in dem 3,9-Dibenzyl- und dem 3,9-Dimethyl-Derivat führt zu einer Abnahme der inhibitorischen Aktivitätsverhältnisse  $R$  auf 16.42 (3  $\mu\text{M}$ ) und 10.69 (30  $\mu\text{M}$ ) bzw. 0.67 (3  $\mu\text{M}$ ) und 2.7 (30  $\mu\text{M}$ ). Für vier Hydroxymethylgruppen werden ähnliche Ergebnisse erhalten wie für die Kombination von zwei Hydroxymethylgruppen und zwei Carbamidestergruppen. Hingegen sind vier Hydroxymethylgruppen und zwei Carbamidestergruppen und damit insgesamt sechs WB-Donor/Acceptorfunktionen als ungünstig anzusehen. Unsere Ergebnisse, die zumindest für unsere Reihe erster symmetrischer Modulatoren eine Begrenzung der WB-Donor/Acceptorgruppenzahl nahelegen, leisten damit einen wesentlichen Beitrag zur Diskussion der Rolle der WB-Bindung in Bezug auf die Wirksamkeit. Der Vergleich der Konzentrationen für eine ausreichende inhibitorische Aktivität ( $< 3 \mu\text{M}$ ) und der im MTT-Assay<sup>[16]</sup> für die Bestimmung des Ausmaßes an Lactatdehydrogenase(LDH)-Aktivität in metabolisch aktiven normalen Zellen (MT-4) ermittelten  $\text{CC}_{50}$ -Werte für die Zytotoxizitäten von **6b** und **6c** ( $> 93$  bzw. 125  $\mu\text{M}$ ) macht deutlich, dass die neuartigen MDR-Modulatoren überzeugende inhibitorische Effekte in Konzentrationen unterhalb zytotoxischer Bedenklichkeit hervorrufen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Hydroxymethyl-substituierte 3,9-Diazatetraasterane eine eigenständige Klasse von neuartigen MDR-Modulatoren darstellen, deren Wirksamkeit in Konzentrationen unterhalb zytotoxischer Effekte liegt. Ein hochinteressantes Charakteristikum der Verbindungen ist ihr streng symmetrischer Charakter, der sich bei ihrer außerordentlichen Wirkung auf das Target der Molekelpumpen oder deren potenzielle Bindungsregion, über deren Struktur bislang nichts bekannt ist, übertragen lassen könnte. Zielsetzung weiterer Arbeiten wird eine Überprüfung dieser „Symmetriehypothese“ mit der Herstellung und Untersuchung unsymmetrischer Verbindungen sein. Zur Einschätzung des klinischen Potenzials sind Untersuchungen an weiteren resistenten Zelllinien in Vorbereitung, deren MDR in der Expression anderer Molekelpumpen als dem P-GP begründet ist.

Eingegangen am 7. März 2002,  
veränderte Fassung am 5. Juli 2002 [Z18849]

- [1] D. A. Dougherty, H. A. Lester, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2463–2466; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2329–2331.
- [2] D. Rees, A. J. Chirino, K.-H. Kim, H. Komiya in *Membrane Protein Structure* (Hrsg.: S. H. White), Oxford University Press, New York, **1994**, S. 1–26.
- [3] a) R. L. Juliano, V. Ling, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *455*, 152–162; b) M. M. Gottesmann, I. Pastan, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 385–427; c) K. C. Almquist, D. W. Loe, D. R. Hipfner, J. E. Mackie, S. P. Cole, R. G. Deeley, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 102–110.
- [4] R. Preiss, *Int. J. Clin. Pharmacol. Therapeut.* **1998**, *36*, 3–8.
- [5] a) T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai, *Cancer Res.* **1982**, *41*, 1967–1972; b) N. J. Chao, M. Aihara, K. G. Blume, B. I. Sikic, *Exp. Hematol.* **1990**, *18*, 1193–1198; c) J. S. Kukl, B. I. Sikic, K. G. Blume, N. J. Chao, *Exp. Hematol.* **1992**, *20*, 1048–1054.
- [6] a) H. Nawrath, M. Raschack, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1987**, *242*, 1090–1097; b) R. Pirker, D. J. Fitzgerald, M. Raschack, Z. Frank, M. C. Willingham, I. Pastan, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4791–4795; c) T.

- Watanabe, M. Naito, T. Oh-hara, Y. Itoh, D. Cohen, T. Tsuruo, *Jpn. J. Cancer Res.* **1996**, 87, 184–193.
- [7] A. Hilgeroth, U. Baumeister, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 588–590; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 576–578.
- [8] a) D. Kessel, *Cancer Commun.* **1989**, 1, 145–149; b) J. L. Weaver, D. Szabo, P. S. Pine, M. M. Gottesmann, S. Goldberg, A. Aszalos, *Int. J. Cancer* **1993**, 54, 456–461; c) D. Sharples, G. Hajos, Z. Riedl, D. Csanyi, J. Molnar, D. Szabo, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, 334, 269–274.
- [9] a) H. L. Pearce, M. A. Winter, W. T. Beck, *Adv. Enzyme Regul.* **1990**, 30, 357–373.
- [10] G. Ecker, M. Huber, D. Schmidt, P. Chiba, *Mol. Pharmacol.* **1999**, 56, 791–796.
- [11] A. Seelig, E. Landwojtowicz, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 12, 31–40.
- [12] A. Hilgeroth, A. Billich, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1999**, 332, 380–384.
- [13] A. Seelig, L. Blatter, F. Wohnsland, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, 38, 111–121.
- [14] Versuche zur Bestimmung der Aktivitäten der Estergruppen-haltigen Vorstufen **3a–c** scheiterten an ihrer unzureichenden Löslichkeit im Assaysystem.
- [15] A. Hilgeroth, M. Wiese, A. Billich, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4729–4732.
- [16] Assay mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) als Substrat: S. N. Pandeya, D. Sriram, E. De Clercq, C. Pannecouque, M. Witvrouw, *Indian J. Pharm. Sci.* **1998**, 60, 207–212.

## Fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung der Freisetzung von cyclischen Nucleotiden aus photoaktivierbaren [Bis(carboxymethoxy)-cumarin-4-yl]methylestern in Zellen\*\*

Volker Hagen,\* Stephan Frings, Jürgen Bendig, Dorothea Lorenz, Burkhard Wiesner und U. Benjamin Kaupp

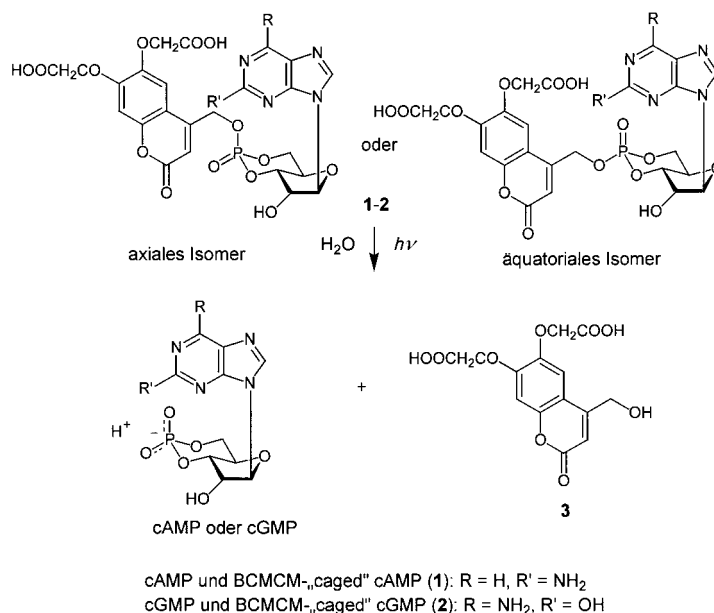
Die Verwendung von photoaktivierbaren („caged“) Verbindungen gilt als elegante Methode zur Erzeugung schneller Konzentrationssprünge von Biomolekülen innerhalb einer Zelle.<sup>[1]</sup> Diese Verbindungen sind photolabile inaktive Derivate von biologisch aktiven Molekülen; die biologisch aktive Substanz kann mit Hilfe einer photochemischen Reaktion schnell freigesetzt werden. Mit den inaktivierten Verbindungen wird die zeit- und raum aufgelöste Analyse komplexer biologischer Vorgänge möglich.

[\*] Dr. V. Hagen, Dr. D. Lorenz, Dr. B. Wiesner  
Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie  
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49)30-94793-159  
E-mail: hagen@fmp-berlin.de  
Priv.-Doz. Dr. S. Frings, Prof. Dr. U. B. Kaupp  
Institut für Biologische Informationsverarbeitung,  
Forschungszentrum Jülich (Deutschland)  
Doz. Dr. J. Bendig  
Institut für Chemie  
Humboldt-Universität Berlin (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken B. Dekowski und Dr. S. Helm für ihre technische Unterstützung.

Für viele Anwendungen wäre es äußerst nützlich zu wissen, wie viel von der inaktivierten Verbindung innerhalb der Zelle photolysiert wird. Bisher gelang dies in wenigen Fällen nur über relativ aufwendige Messungen der biologischen Wirkung. Wir zeigen hier am Beispiel der axialen und äquatorialen Diastereomere der [6,7-Bis(carboxymethoxy)cumarin-4-yl]methyl(BCMCM)-Ester von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) **1** und cyclischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) **2**,<sup>[2]</sup> die ausgezeichnete Phototrigger für cyclische Nucleotide darstellen, dass dies auf einfache Weise durch Fluoreszenzmessungen möglich ist.

**1** und **2** bilden bei der Bestrahlung mit UV-Licht in wässrigen Pufferlösungen und innerhalb von Zellen sehr schnell – binnen 2–5 Nanosekunden<sup>[3]</sup> – cAMP oder cGMP und 6,7-Bis(carboxymethoxy)-4-(hydroxymethyl)cumarin (**3**, BCMCM-OH) (Schema 1). Die Photolyse verläuft kinetisch einheitlich mit Quantenausbeuten von 0.08 bis 0.14<sup>[2]</sup> und pro Molekül **3** entsteht 1 Molekül cAMP oder cGMP.



Schema 1. Photolyse von **1** und **2**.

**1** und **2** zeigen nur geringe Fluoreszenzquantenausbeuten, während der Alkohol **3** stark fluoresziert (Tabelle 1, vgl. auch Abbildung 1a). Bei der Photolyse beobachtet man daher einen drastischen (in Pufferlösungen ca. 40 bis 50-fachen) Fluoreszenzanstieg (Abbildung 1b). In HEPES-Pufferlösun-

Tabelle 1. Fluoreszenzmaxima  $\lambda_{\text{f}}^{\text{max}}$ , Fluoreszenzquantenausbeuten  $\varphi_{\text{f}}$  und Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_{\text{f}}$  der BCMCM-„caged“ cAMPs und cGMPs **1–2** sowie von **3** in HEPES-KOH-Puffer, pH 7.2;  $\lambda_{\text{exc}} = 333$  nm.

Verbindung	$\lambda_{\text{f}}^{\text{max}}$ [nm]	$\varphi_{\text{f}}^{\text{[a]}}$	$\tau_{\text{f}}$ [ns]
<b>1</b> (axial)	440	0.015	n.g.
<b>1</b> (äquatorial)	439	0.016	< 0.2
<b>2</b> (axial)	436	0.012	n.g.
<b>2</b> (äquatorial)	441	0.014	< 0.2
<b>3</b>	431	0.62	3.18

[a] Fehlergrenzen  $\pm 0.002$  (**1,2**) bzw.  $\pm 0.01$  (**3**); n.g. = nicht gemessen.