

Aktivierung eines photoresponsiven Kinaseinhibitor-Prodrugs durch Tscherenkow-Strahlung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Melanie Busse
Kiel 2023

Dekan:
Erster Gutachter:
Zweiter Gutachter:
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Frank Kempken
Prof. Dr. Christian Peifer
Prof. Dr. Maaz Zuhayra
24.02.2023

Kurzzusammenfassung

Photopharmakologische Konzepte wie die Photoaktivierung eines Wirkstoffs durch Abspalten einer Schutzgruppe im Sinne eines Prodrugs werden in den letzten Jahren aufgrund ihres selektiven Einsatzes durch die zeitliche und räumliche Kontrolle der Aktivierung vermehrt untersucht. Jedoch ist deren therapeutische Anwendung bis heute hauptsächlich durch die notwendige Bestrahlung innerhalb des biooptischen Fensters begrenzt. Um eine ausreichende Gewebedurchdringung zu erreichen, wird in der Regel Licht mit Nahinfrarot-Wellenlängen von mehr als 650 nm benötigt. Andererseits reagieren die meisten bisher untersuchten photopharmakologischen Verbindungen lediglich auf die Bestrahlung mit UV-Licht, welches kaum in das Gewebe eindringen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Tscherenkow-Strahlung als mögliche Aktivierungsquelle untersucht. Sie entsteht als Nebenprodukt beim Zerfall von Radionukliden und erzeugt elektromagnetische Strahlung im UV-Bereich von 250 - 600 nm. Radionuklide können durch verschiedene Methoden wie zum Beispiel die selektive interne Strahlentherapie (SIRT) gezielt zum Tumor gebracht werden. Bei gleichzeitigem Einsatz eines photoaktivierbaren Arzneistoffes könnte dieser Tumor neben der Bestrahlung durch Radioaktivität zusätzlich durch den Arzneistoff spezifisch bekämpft werden, welcher durch die lokal entstandene Tscherenkow-Strahlung aktiviert wird.

Zur Verifizierung dieser Hypothese wurden die klinisch etablierten Isotope ^{18}F , ^{68}Ga und ^{90}Y ausgewählt und anhand des Kamiokannenexperiments auf entstehende Tscherenkow-Strahlung untersucht. Hier zeigte sich bei ^{68}Ga und ^{90}Y eine Entstehung von Tscherenkow-Signalen. Bei ^{18}F jedoch konnten auch bei hohen Aktivitäten kaum Signale der Tscherenkow-Strahlung detektiert werden.

Darauffolgend wurde der CDK-Inhibitor AZD5438 als Modellverbindung mit der photolabilen 4,5-Dimethoxy-2-Nitrobenzyl-Schutzgruppe (DMNB) am Pharmakophor kovalent geblockt und damit inaktiviert. Nach photochemischer Charakterisierung dieses photoresponsiven Prodrugs wurde die Abspaltung der Schutzgruppe in Zusammenhang mit der von Radionukliden ausgesendeten Tscherenkow-Strahlung untersucht. Es zeigte sich, dass nur bei ^{90}Y eine partielle Freisetzung des Wirkstoffes AZD5438 beobachtet werden konnte. Sowohl bei ^{90}Y als auch bei ^{68}Ga kam es zusätzlich zu einer unspezifischen Zersetzung des gecagten Inhibitors. Dies konnte bereits bei Bestrahlung mit UV-Licht von 365 nm beobachtet werden. Zugrundeliegend ist ein durch ESR-Experimente bewiesener radikalischer Prozess. Bei Einsatz der Radikal-Quencher Ascorbinsäure und Gentsinsäure konnte dieser Prozess nicht verhindert werden.

Abstract

Photopharmacological concepts such as the photoactivation of an active substance by splitting off a protective group have been increasingly investigated in recent years due to their selective use through the temporal and spatial control of activation. However, their therapeutic application is still limited mainly by the necessary irradiation within the biooptical window. In order to achieve sufficient tissue penetration, light with near-infrared wavelengths of more than 650 nm is usually required. On the other hand, most photopharmacological compounds investigated so far only react to irradiation with UV light, which can hardly penetrate the tissue.

In this work, Cherenkov radiation as a possible source of activation was investigated. It is produced as a by-product during the decay of radionuclides and generates electromagnetic radiation in the UV range of 250 - 600 nm. Radionuclides can be targeted at the tumour by methods such as selective internal radiation therapy (SIRT). If a photoactivatable drug is used at the same time, the tumour could be irradiated and targeted by the drug, which is activated by the locally generated Cherenkov radiation.

To verify this hypothesis, the clinically established isotopes ^{18}F , ^{68}Ga and ^{90}Y were selected and investigated for Cherenkov radiation using the kamiokanne experiment. Here, ^{68}Ga and ^{90}Y showed an emergence of Cherenkov signals. At ^{18}F , however, barely any Cherenkov radiation signals could be detected even at high activities.

Subsequently, the CDK inhibitor AZD5438 was covalently blocked as a model compound with the photolabile 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl protecting group (DMNB) at the pharmacophore and thus inactivated. After photochemical characterisation of this photoresponsive prodrug, the removal of the protecting group was investigated in relation to Cherenkov radiation emitted by radionuclides. It was found that only for ^{90}Y a partial release of the drug AZD5438 could be observed. Both at ^{90}Y and ^{68}Ga an additional non-specific decomposition of the protected inhibitor occurred, which could be observed upon irradiation with UV light of 365 nm. This is due to a radical process proven by ESR experiments. The decomposition could not be prevented by using the radical quenchers ascorbic acid and gentisic acid.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Photopharmakologie	1
1.1.1	Photoschaltung	4
1.1.2	Photoabspaltung	5
1.1.3	Photodynamische Therapie	9
1.1.4	Optogenetik	10
1.2	Biooptisches Fenster	11
1.3	Strategien zur Überwindung der limitierten Eindringtiefe von Licht im Gewebe	13
1.3.1	Tscherenkow-Strahlung	15
1.4	Radioaktive und therapeutisch eingesetzte Beta-Strahlung . . .	17
1.4.1	Super-Kamiokande	18
1.4.2	Kosmische Strahlung	19
1.5	Proteinkinasen	21
1.6	Kinaseinhibitoren	22
2	Zielstellung	24
3	Ergebnisse und Diskussion	28
3.1	Nachweis der Tscherenkow-Strahlung	28
3.2	Untersuchung einer Aktivierung des Modellsystems caged AZD5438	30
3.2.1	Modelling	31
3.2.2	Synthese	33
3.2.3	Photochemische Charakterisierung	34
3.3	Biologische Evaluation	39
3.4	Photoresponsive Prodrug-Aktivierung durch Radionuklide . . .	41
3.4.1	¹⁸ Fluor	42
3.4.2	⁶⁸ Gallium	44
3.4.3	⁹⁰ Yttrium	47
4	Zusammenfassung und Fazit	49
5	Ausblick	52
6	Experimentalteil	55
6.1	<i>Molecular Modelling</i>	55
6.2	Reagenzien und Ausgangsstoffe	56
6.3	Synthese	57
6.4	Analytik	58

6.5	Nuklidexperimente	61
6.5.1	Kamiokanne	61
6.5.2	Aktivierung	63
6.6	Biologische Evaluation	66
6.6.1	Kinaseassay	66
6.6.2	Zellproliferationsassay	67
7	Anhang	68
7.1	Aktivitätsrechnung	68
7.2	Abkürzungs- und Fremdwörterverzeichnis	69
7.3	Veröffentlichte Arbeiten	70
8	Eidesstattliche Erklärung	97
9	Danksagung	98

1 Einleitung

1.1 Photopharmakologie

Sowohl für die Grundlagenforschung als auch für medizinische Anwendungen ist es entscheidend, biologische und chemische Prozesse präzise steuern zu können.^{1,2} Bei einer therapeutischen Behandlung kommen hauptsächlich bioaktive Verbindungen zum Einsatz, die eine pharmakologische Reaktion durch eine Interaktion mit Enzymen, Rezeptoren, Ionenkanälen oder Transportmolekülen eingehen.³ Je präziser und selektiver in einen Prozess eingegriffen werden kann, desto eher hat man die Möglichkeit, unerwünschte und schwerwiegende Nebenwirkungen, eventuelle Resistenzbildungen und eine eingeschränkte Dosiseffizienz zu vermeiden.⁴⁻⁶ Folglich spielt besonders in dem heutigen Wirkstoffdesign Selektivität eine wesentliche Rolle. Da die meisten Targets in vielen verschiedenen Bereichen im menschlichen Körper vorkommen, muss eine Methode gewählt werden, mit deren Hilfe die gewünschten Reaktionen dennoch gezielt gesteuert werden können.⁷

Die Photopharmakologie beschäftigt sich mit der Entwicklung von Molekülen, die mit Hilfe von Licht im Sinne eines Prodrugs aktivierbar sind. Licht kann sehr präzise eingesetzt werden. Dies ermöglicht eine exakte Kontrolle über einen selbst gewählten Bereich sowie Zeit und Dosis, welches zu einer besonders selektiven therapeutischen Behandlung führt.^{1,8-10} Der Einsatz von Licht als Reaktionsauslöser ist orthogonal und damit nicht invasiv und harmlos für Zellen, da ein Großteil, außer hochspezialisierte Zellen wie zum Beispiel Photorezeptoren, nicht auf Licht reagiert. Voraussetzung dabei ist, dass die eingesetzte Wellenlänge nicht unter 300 nm liegt, da hier Zellschäden entstehen können.^{5,8,11-13} Im UV-Bereich besteht besonders aufgrund vorliegendes Melanins ein Schutz für Zellen. (Kapitel 1.2 Biooptisches Fenster)

Ein bekanntes Beispiel der Phototherapie ist der Neugeborenenikterus, bei dem sich Bilirubin in das Gewebe einlagert. Diese Gelbsucht tritt bei ca. 60 % der normal entwickelten Neugeborenen innerhalb der ersten Lebenswoche auf. Wenn die Leber des Neugeborenen das Bilirubin nicht schnell genug aus dem Blut ausscheiden kann, entsteht eine Hyperbilirubinämie, welches toxisch für das Nervensystem ist und neurologische Entwicklungsstörungen verursachen kann.¹⁴ In der Phototherapie wird das Neugeborene mit Licht der Wellenlänge 459 nm bestrahlt. Dadurch wird das Bilirubin angeregt und es entstehen entweder durch irreversible Umlagerung Konstitutionsisomere (Lumirubine), reversible Konfigurationsisomere oder farblose Abbauprodukte durch die Reaktion mit Sauerstoff. Diese Produkte werden über die Galle oder den Urin ausgeschieden (Abbildung 1).

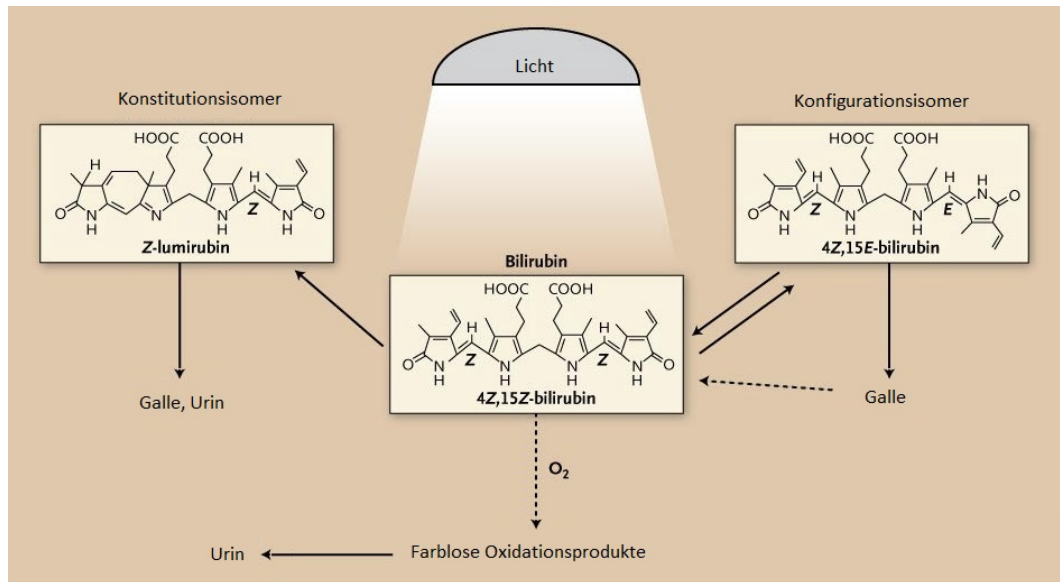


Abbildung 1: Darstellung des Bilirubinabbaus mit Hilfe von Licht in die wichtigsten vom Menschen gebildeten Photoisomeren. Der Graph wurde von Maisels *et al.* adaptiert.¹⁴

Generell umfasst die Photopharmakologie zwei Bereiche: Zum einen die Aktivierung eines Moleküls durch dessen Konfigurationsänderung (auch Schaltung genannt), wie in dem obigen Beispiel zu sehen ist. Zum anderen die Aktivierung durch Abspaltung einer Schutzgruppe (Caging) mit Hilfe von Licht einer bestimmten Wellenlänge. Darüber hinaus gibt es noch zwei Bereiche, die an die Photopharmakologie angelehnt sind. Dazu gehören die photodynamische Therapie (PDT), die auch in dem dargestellten Beispiel vorkommt, und die Optogenetik (Abbildung 2).

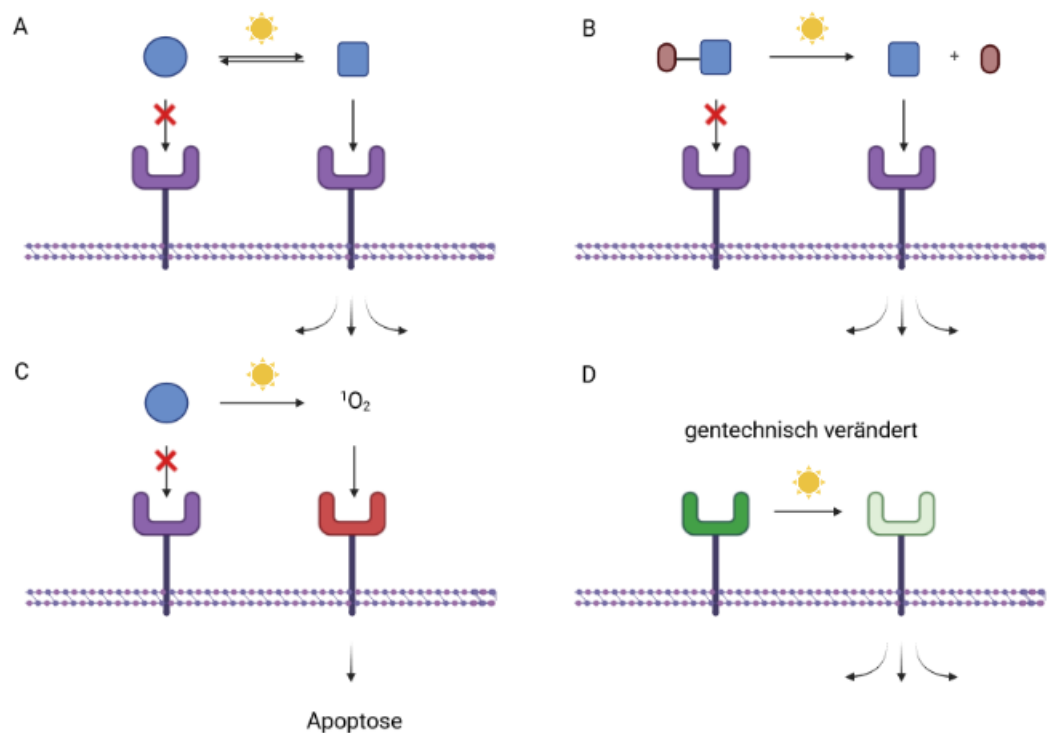


Abbildung 2: **Bereiche der Photopharmakologie und verwandte Fachgebiete.** **A** Photoschaltung. Konfigurationsänderung des Wirkstoffes mit Hilfe von Licht führt zu einer Bindung an den Rezeptor. **B** Photoaktivierung. Wirkstoffbindung durch lichtgesteuerte Schutzgruppenabspaltung. **C** Photodynamische Therapie. Durch Licht freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies 1O_2 führen zur Apoptose. **D** Optogenetik. Gentechnische Veränderung zellulärer Systeme zur Steuerbarkeit durch Licht. Die schematische Darstellung wurde mit Hilfe von BioRender konzipiert.

1.1.1 Photoschaltung

Bei der Photoschaltung (Abbildung 2A) werden Wirkstoffe mit einem Chromophor so modifiziert, dass sie je nach Konfiguration biologisch aktiv oder inaktiv sind. Durch Bestrahlen mit einer bestimmten Wellenlänge kann der Wechsel von einer Konfiguration in die nächste gesteuert werden. Dabei ist die chemische Gleichgewichtsreaktion unter der Bestrahlung besonders wichtig. Dieser photostationäre Zustand (PSS, engl. *photostationary state*) setzt sich zusammen aus den Bestrahlungsparametern, Absorptionsspektren und der Quantenausbeute und gilt als Maß für die Effizienz der photoschaltbaren Verbindung.¹⁵ Als Schalter eignen sich zum Beispiel Azobenzene, Stilbene, Spiropyrane und Hemithioindigo. Ein Schalten von einem (E)-Isomer zum (Z)-Isomer ist meist im Wellenlängenbereich von ca. 350 nm (π - π^* , oder n- π^* Übergang) möglich, von cis zu trans bei 450 nm (π - π^* Übergang) oder auch thermisch.² Besonders in den letzten 30 Jahren ist der Bereich der Photoschaltung in der Forschung und Entwicklung attraktiv für biologische Fragen geworden.¹⁶ Hier spielen neben dem Schalteffekt und dem daraus folgenden Aktivitätsunterschied von cis- und trans-Isomeren besonders die Stabilität und generell die photochemischen Eigenschaften, die sehr stark vom jeweiligen Lösungsmittel beziehungsweise von der molekularen Umgebung des Photoschalters abhängig sind, eine große Rolle.^{17,18}

1.1.2 Photoabspaltung

Bei dem Caging-Konzept (Abbildung 2B) wird ein Wirkstoff kovalent mit einer photolabilen Schutzgruppe in einer Pharmakophor-relevanten Schlüsselstellung versehen, sodass ein biologisch inaktiver Wirkstoff (Prodrug) entsteht. Durch Abspalten dieser Schutzgruppe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge kann die ursprüngliche biologische Aktivität des zugrundeliegenden Wirkstoffes wiederhergestellt werden. Im Gegensatz zu den Schaltern ist dieser Vorgang irreversibel. Die Methode wurde erstmals 1977 von Engels und Schlaeger mit caged cAMP und 1978 von Kaplan *et al.* mit caged ATP (Untersuchung Na/K-Pumpe) veröffentlicht.¹⁹ Bis heute wurde eine Photoabspaltung bei einer Vielzahl von Modellverbindungen wie z. B. anorganische Ionen, Neurotransmitter, Kinaseinhibitoren, Tubulininhibitoren als auch bei Polysacchariden, Peptiden, Proteinen und DNA untersucht.^{10,20-29}

Es gibt folgende Voraussetzungen für die Wahl einer geeigneten Schutzgruppe des Caging Konzeptes: Das entstehende Prodrug sollte keine biologisch wirksamen Eigenschaften aufweisen, möglichst gut wasserlöslich sein und unter physiologischen Bedingungen stabil bleiben. Für eine effiziente Photoaktivierung ist ein größerer Extinktionskoeffizient ϵ von Vorteil. Die Aktivierungswellenlänge sollte so gewählt worden sein, dass das Molekül nicht die Abspaltungswellenlänge absorbiert, keine undefinierbaren Reaktionen wie z. B. Umlagerungen entstehen und die Aktivierung möglichst unmittelbar bei Bestrahlung erfolgt. Für eine hohe Effizienz des Konzeptes sollte bei der Photoaktivierung ein hoher Prozentsatz der Moleküle im angeregten Zustand vorliegen, die die Reaktion durchführen (Quantenausbeute).² Die Quantenausbeute ist auch von der Abgangsgruppe abhängig.

Tabelle 1 zeigt einige der bekanntesten photoabspaltbaren Schutzgruppen. Dazu gehören die Nitroaryl-Gruppen (DMNB, NPE), die BODIPY-Gruppen (*meso*-methyl-bor-dipyrromethenyl), die Cumarin-Gruppen (Cumarin-4-ylmethyl) und die Arylcarbonylmethyl-Gruppen (*p*-Hydroxy-Phenacyl).

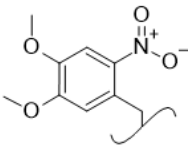
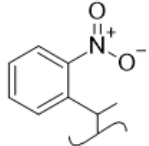
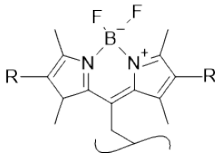
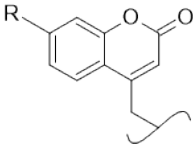
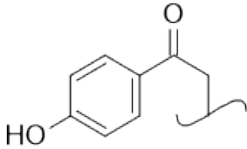
Schutzgruppe	Struktur	Vorteile und Nachteile	Abspaltungswellenlänge
4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB)		schnelle Abspaltung, gute Wasserlöslichkeit, bei Photolyse bildet sich ein Nitrosoaldehyd, das im biologischem Kontext schädlich sein kann ^{8, 30, 31}	365 nm
<i>o</i> -Nitrophenylethyl (NPE)		Wird schneller abgespalten, Wellenlänge anpassbar, z. B. mit Dimethoxygruppen, ⁸ daraus entsteht ein Nitrosoketon (ein neues Stereocenter entsteht)	365 nm ³²⁻³⁴
<i>meso</i> -Methyl-Bor-Dipyrromethenyl (BODIPY)		abspaltbar im höheren Wellenlängenbereich und damit Umgehung des biooptischen Fensters, Wellenlänge durch variierende Reste anpassbar, radikalische Zersetzung, ³⁵ unklarer Abspaltungsmechanismus mit bisher nicht definierten Reaktionsprodukten ³⁶	500 - 600 nm
Cumarin-4-ylmethyl		Wellenlänge durch Substituenten gut variierbar	312 - 505 nm ³²
<i>p</i> -Hydroxy-Phenacyl			320 nm ³⁴

Tabelle 1: **Auswahl bekannter photoabspaltbarer Schutzgruppen.** Aufgelistet sind bekannte Vertreter von Photoschutzgruppen, ihre Vor- und Nachteile und die jeweilige Abspaltungswellenlänge.²

Die 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylgruppe ist aufgrund der schnellen Abspaltung und der einfachen synthetischen Kupplung eine der am häufigsten verwendeten Schutzgruppen.^{9,29,32} In Abbildung 3 ist dieser Abspaltungsmechanismus nach Yu *et al.* abgebildet.²⁹ Nach Bestrahlung der gegagten Verbindung entsteht die irreversible Zyklisierung zum Isoxazolidinring. Darauf folgt der pH-abhängige geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Ringöffnung und die daraus resultierende Abspaltung des freien Wirkstoffes. Als Abgangsprodukt der Disproportionierungsreaktion entsteht das *o*-Nitrosobenzaldehyd, welches im global harmonisiertem System (GHS) zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien als gesundheitsschädlich und reizend eingestuft ist. Horbert *et al.* konnten in einem Modellversuch jedoch erst bei einer höheren Konzentration von 10 μM einen antiproliferativen Effekt in Zellen feststellen.³⁷ Bisher wurden *in vivo* schon einige mit Nitroaryl- geschützte Verbindungen untersucht. Zum Beispiel zeigten Ouyang *et al.* mit dem Einsatz von mit DMNB gegagtem morpholino Oligonukleotiden eine Inaktivierung von Genen im Zebrafisch und anderen optisch transparenten Organismen.³⁸

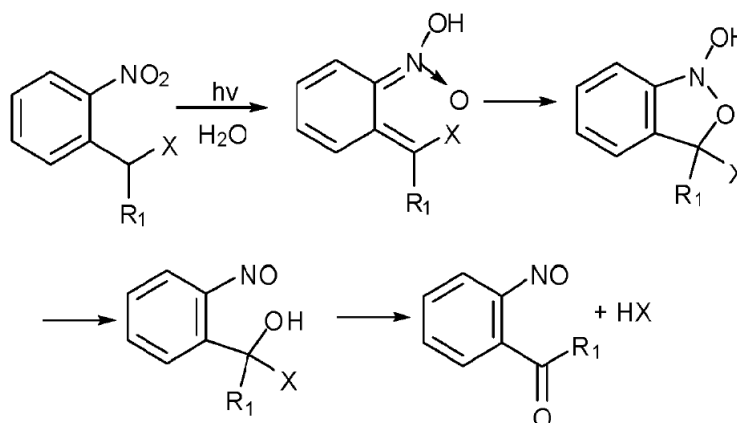


Abbildung 3: **Mechanismus der Nitroaryl-Abspaltung.** X kennzeichnet den Wirkstoff. Für das DMNB entspricht R_1 einem Wasserstoff und für das NPE einer Methylgruppe. Die Abbildung ist übernommen von Yu *et al.*²⁹

Auch die BODIPY Derivate (**Bor-Dipyrrromethen**), ursprünglich bekannt als Farbstoff oder Fluoreszenzmarker, werden häufig als photoabspltbare Schutzgruppen untersucht. Durch ihre Abspaltungswellenlänge von über 500 nm kann zur Aktivierung Licht genutzt werden, dass tiefer in das Gewebe eindringt, was für eine therapeutische Anwendung unabdingbar ist (siehe Kapitel 1.2, Biooptisches Fenster). Bis heute ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, wie die BODIPY-Abspaltung mechanistisch genau funktioniert und welche Reaktionsprodukte dabei entstehen. Dies ist jedoch für eine valide im photopharmakologischen Sinne einzusetzende Schutzgruppe essentiell. Abbildung 4 zeigt den aktuell angenommenen Abspaltungsmechanismus.³⁹⁻⁴²

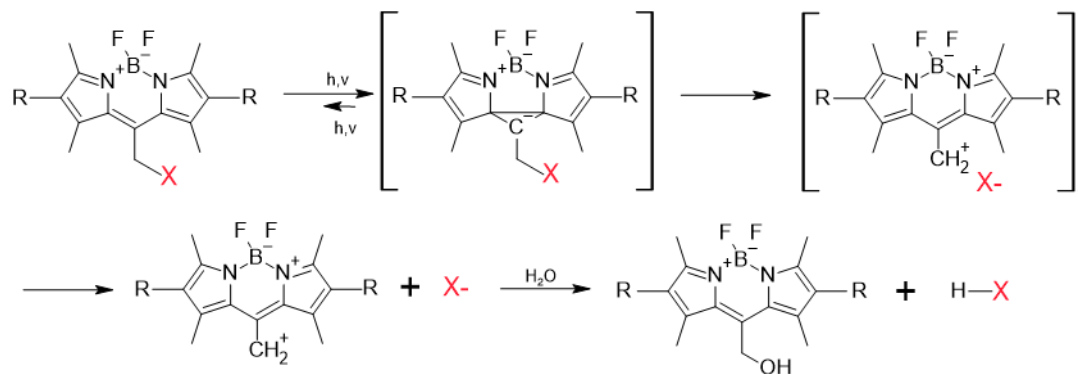


Abbildung 4: Angenommener Abspaltungsmechanismus der BODIPY-Schutzgruppe nach Rubinstein und Sitkowska *et al.*^{41,42} "X" kennzeichnet den jeweiligen Wirkstoff.

Zudem wurde von Toupin *et al.* bei Bestrahlung BODIPY-gekagter Inhibitoren die Entstehung von Singulett-sauerstoff festgestellt.⁴³ Darauf wurde nachgewiesen, dass BODIPY-gekoppelte Verbindungen im wässrigen Medium bei Bestrahlung Singulett-sauerstoff erzeugen, was zu einer radikalischen Photodegradation der geschützten Verbindung führt³⁵(Artikl siehe Anhang). Daher ist eine Verwendung von BODIPY-Derivaten in der Photodynamischen Therapie denkbar.

1.1.3 Photodynamische Therapie

In Abbildung 2C ist schematisch das Konzept der Photodynamischen Therapie (PDT) dargestellt. Der Wirkstoff, auch Photosensibilisator genannt, wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge vom Grundzustand zum Singulett-Anregungszustand angehoben. Von diesem angeregten Zustand aus entsteht ein Intersystem-Crossing zu einem elektronisch alternativ angeregten Zustand mit niedrigerer Energie, wie dem Triplett-Zustand. In seinem langlebigen Triplett-Zustand reagiert der Photosensibilisator mit der lokalen Umgebung und erzeugt durch Energieübertrag eine hohe Konzentration an reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder freier Radikale.⁴⁴ Eine niedrige Konzentration an ROS ist naturgemäß in lebenden Zellen vorhanden und wird durch zelluläre Mechanismen reguliert. Diese ROS werden hauptsächlich in den Mitochondrien gebildet. Außerdem sind die ROS zelluläre Signalgeber, da sie Thiolgruppen von Proteinen oxidieren und so deren Funktionen verändern.⁴⁵⁻⁴⁷ Eine hohe Konzentration an Sauerstoffspezies, zum Beispiel Singulett-Sauerstoff 1O_2 , führt jedoch zu Zellschäden, besonders an Membranen und Mikrotubuli. Dies kann zu Nekrose oder Apoptose führen.⁴⁸ Mit Hilfe dieser nicht invasiven photodynamischen Methode zur Erzeugung von lokal hohen Konzentrationen an Radikalspezies können gezielt Zellen zerstört werden. Die PDT wird bereits erfolgreich in der Dermatologie, Onkologie, Gynäkologie, Ophthalmologie, Urologie, bei Infektionskrankheiten und bei kosmetischen Behandlungen eingesetzt. Durch den selektiven Einsatz von Licht in Kombination mit Sensitizern ist eine ambulante und nahezu schmerzfreie Anwendung an Patienten möglich.⁴⁹⁻⁵⁷

1.1.4 Optogenetik

Die Optogenetik beschreibt Mechanismen zur Steuerung zellulärer Aktivitäten (besonders von Neuronen) durch Licht und durch genetisch kodierte lichtempfindliche Aktorproteine.^{2,58} Dazu werden zelluläre Systeme wie Rezeptoren und Ionenkanäle gentechnisch so verändert, dass ihre Aktivität mit Licht regulierbar ist.

1.2 Biooptisches Fenster

Die Wahl der Aktivierungswellenlänge hat sich als ein limitierender Faktor für translationale Anwendungen in der Photopharmakologie erwiesen. Neben möglicher Zellschäden bei einem zu niedrigen UV-Bereich (< 300 nm), die zum Zelltod oder DNA-Schäden führen können, erschweren Streuung, Absorption und Reflexion des eingestrahlt Lichts im biologischem Gewebe ein tiefes Eindringen.¹¹⁻¹³ Streuung tritt aufgrund unterschiedlicher Brechungsindexe verschiedener Gewebekomponenten auf, die von Zellmembranen bis hin zu ganzen Zellen reichen.⁵⁹ Dazu kommen noch wellenlängenabhängige optische Absorptionskoeffizienten physiologischer Chromophore, darunter Melanin, Hämoglobin, Proteine und Wasser. So ist nur eine geringe Eindringtiefe von wenigen Mikrometern für Licht im UV-Bereich bis hin zu einigen Millimetern im hohen VIS-Bereich möglich (Abbildung 5). Um möglichst tief ins Gewebe eindringen zu können, sollte der Wellenlängenbereich für eine Aktivierung von außen zwischen 600 und 1300 nm liegen. Dieser Bereich wird auch als biooptisches Fenster bezeichnet^{60,61} (Abbildung 6).

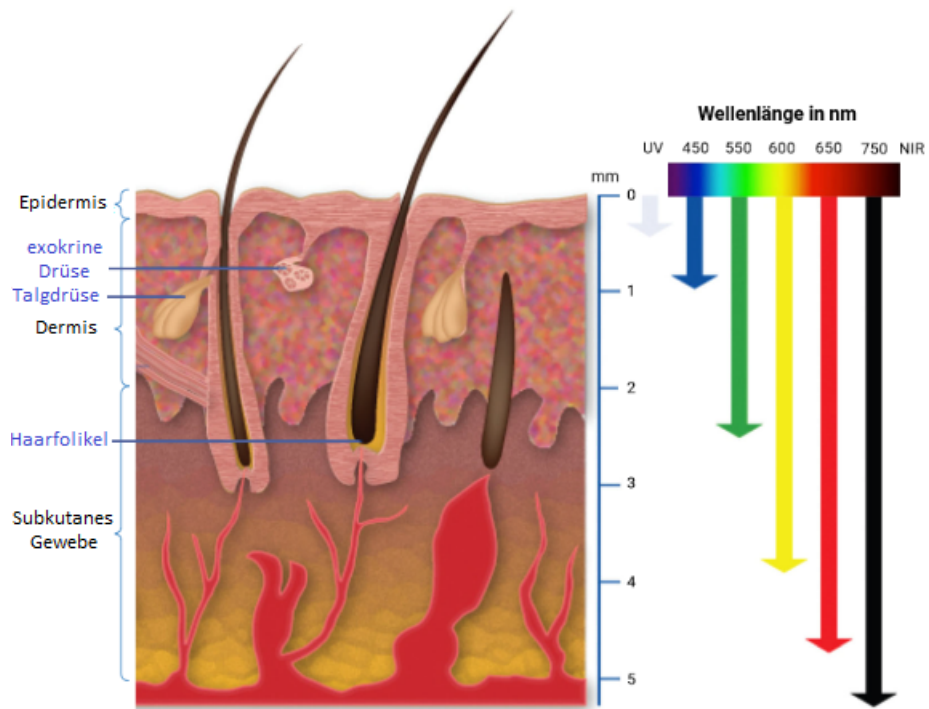


Abbildung 5: Schema der Eindringtiefen von Licht unterschiedlicher Wellenlängen in die Haut nach Clement *et al.*⁶²

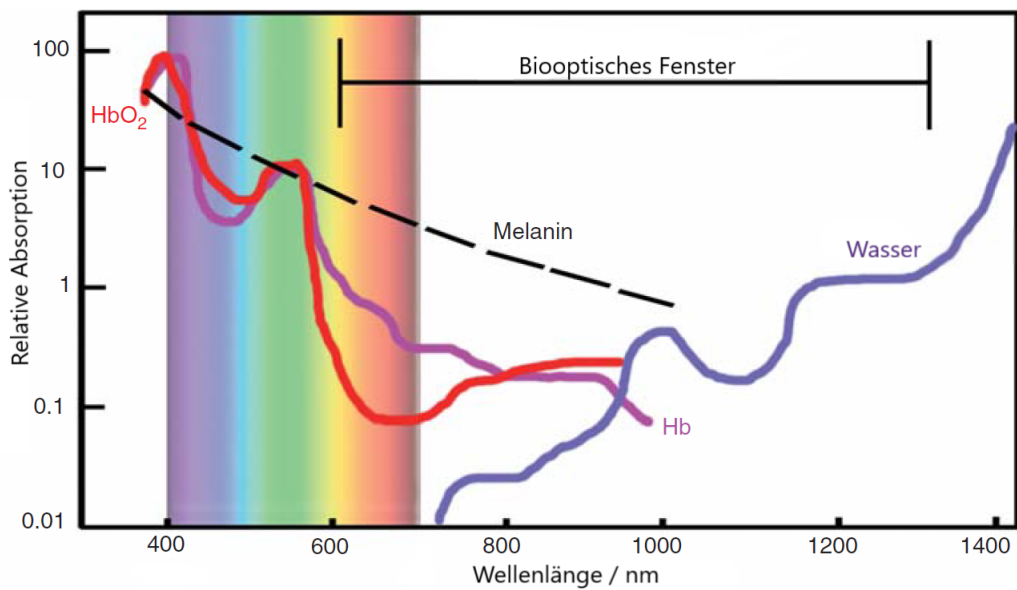


Abbildung 6: Darstellung des biooptischen Fensters in Abhängigkeit von der relativen Absorption von Melanin, Hämoglobin (Oxyhämoglobin HbO_2 und Desoxyhämoglobin Hb) und Wasser zu der Wellenlänge. Der Graph wurde von Lyons *et al.* adaptiert.⁶³

1.3 Strategien zur Überwindung der limitierten Eindringtiefe von Licht im Gewebe

Für eine zielführende Therapie in der Photopharmakologie ist es essentiell, dass die entsprechende Wellenlänge des Lichts an das Zielmolekül im Gewebe gelangen kann. Die meisten Targets von Wirkstoffen liegen jedoch in tiefer gelegenen vaskularisiertem Gewebe. Zudem erfordert es eine sehr spezifische Behandlung, eine kontinuierliche Lichtdosis an potenziell heterogene Wirkstoffe zu bringen.⁴⁴ Die meisten untersuchten Verbindungen besitzen lediglich Aktivierungswellenlängen von ca. 300 - 500 nm und können daher im zellulär-biologischem Zusammenhang nur oberflächlich aktiviert werden. Eine Auswahl dieser publizierten Verbindungen ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Deswegen muss die Anregungswellenlänge zur Aktivierung einer photoresponsiven Verbindung entweder im Bereich des biooptischen Fensters (Kapitel 1.3) liegen oder es muss eine alternative Methode entwickelt werden, um Wirkstoffe tiefer im Gewebe selektiv aktivieren zu können. Bisher wird die limitierte Eindringtiefe mit Hilfe von Lasern, Applikatoren und Lichtleitern überwunden. Bei Laserlicht zum Beispiel kann jede Wellenlänge in dünne optische Fasern mit hoher Intensität fixiert werden, um Licht in schwer zugängliche Behandlungsstellen wie Bauchspeicheldrüsen-, Kopf- oder Halstumore zu leiten.⁴⁴ Bei diesen Methoden ist jedoch immer noch ein invasiver Eingriff nötig.⁶⁴

Ein anderes Vorgehen ist die Zwei-Photonen-Anregung. Hierbei wird zunächst Licht mit der doppelten Wellenlänge eingesetzt.^{65,66} So wird zum Beispiel zur Aktivierung eines caged Prodrugs ein gecagter Prodrug mit einem Absorptionsmaximum von 365 nm Licht von 730 nm verwendet. Bei hohen Lichtintensitäten kommt es zu einem nicht linearen optischen Effekt. Hierzu müssen spezielle Laserlichtquellen wie ein gepulster Titansaphir-Laser verwendet werden. Der Vorteil ist, dass sich die Wahrscheinlichkeit einer Zwei-Photonen-Anregung proportional zum Quadrat der lokalen Intensität verhält. Daher ist es möglich, die Bestrahlungsbedingungen so einzustellen, dass die Anregung nur im Brennpunkt des Laserstrahls erreicht wird.^{2,60} Photoabspaltbare Schutzgruppen, die sich für eine Zwei-Photonen-Anregung eignen, sind jedoch in der Regel aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften für biologische Applikationen ungeeignet und ineffizient, was sie für medizinische Anwendungen bisher ungeeignet macht.⁶⁷ Einen anderen Ansatz dagegen beschreiben Ran *et al.* 2012. Hier wird der Einsatz von Licht durch radioaktive Proben ersetzt. Mit Hilfe von Positronen-Emissions-Tomographie (PET), welches 18-Fluorodesoxyglucose (¹⁸FDG) verwendet, wurde in einem Brustkrebs-Tiermodell, welches Luciferase exprimiert, gecagtes Luciferin eingesetzt. Durch die entstehende Biolumineszenz konnte

ein Uncaging von Luciferin festgestellt werden.⁶⁸ Die Annahme von Ran *et al.* war dabei, dass Tscherenkow-Strahlung entsteht und für die Abspaltung der Schutzgruppe verantwortlich ist.

Beispiel	Wirkstoff	Ziel	Typ der Photoaktivierung	Wellenlänge	Literatur
1	1,2 dithienylethen (DTE) Inhibitor	hCAI	photochemischer Ringwechsel, <i>in vitro</i>	312 /> 434 nm	2008, Vomasta <i>et al.</i> ⁶⁹
2	Caged Rho Kinase Inhibitor	Rho Kinase	Abspaltung, <i>in vivo</i>	365 nm	2012, Morckel <i>et al.</i> ²⁶
3	Caged Imatinib	BCR-ABL Kinase	Abspaltung, <i>in vitro</i>	365 nm	2015, Zindler <i>et al.</i> ⁷⁰
4	Caged RET Inhibitoren	Tyrosinprotein Kinase Rezeptor (RET)	Abspaltung, <i>in vivo</i>	365 nm	2015, Bliman <i>et al.</i> ⁷¹
5	RET-Inhibitor Derivat	RET	Schaltung, <i>in vitro</i>	365 nm	2015, Ferreira <i>et al.</i> ⁷²
6	second messenger lipid diacylglycerol(DAG))	PKC	Schaltung, <i>in vitro</i>	360 nm	2016, Frank <i>et al.</i> ⁷³
7	PKC-Inhibitor Derivat	PKC	Abspaltung, <i>in vitro</i>	490 nm	2017, Wilson <i>et al.</i> ⁷⁴
8	Axitinib	VEGFR2	Schaltung, <i>in vitro</i>	365 / 385 nm	2018, Schmidt <i>et al.</i> ¹⁸
9	Caged Doxycyclin Analoga		Abspaltung	405 nm	2018, Goegan <i>et al.</i> ⁷⁵
10	Verumafenib	BRAFV 600E	Abspaltung, <i>in vitro</i>	365 nm	2019, Hoorens <i>et al.</i> ⁷⁶
11	Lidocain Derivat	K+ Kanal	Schaltung,PCC	400 / 530 nm	2019, Trads <i>et al.</i> ⁷⁷
12	AZD5438	CDK2	Abspaltung, <i>in vitro</i>	365 nm	2021, Krebs <i>et al.</i> ⁷⁸

Tabelle 2: **Beispiele bereits publizierter Photopharmakologischer Konzepte mit Einsatz von *small molecules*.** Die Aktivierung mit Licht bestimmter Wellenlänge findet entweder durch irreversibles Abspalten einer photolabilen Schutzgruppe von einem inaktiven Prodrug (“Abspaltung”) statt oder durch eine photoinduzierte E/Z Isomerisierung, welche reversibel abläuft (“Schaltung”).

1.3.1 Tscherenkow-Strahlung

Die Tscherenkow-Strahlung gehört zu der elektromagnetischen Strahlung und weist ein Emissionsspektrum vom UV- bis in den sichtbaren Bereich von 250 nm bis 600 nm auf. Diese Strahlung wird erzeugt, wenn sich ein geladenes Teilchen in einem dielektrischen Medium, wie zum Beispiel Wasser, schneller als Licht bewegt. Anders als im Vakuum können sich Teilchen in einem Medium schneller als Licht bewegen. Entscheidend ist dabei der Brechungsindex n des jeweiligen Mediums. Im Vakuum beträgt die Lichtgeschwindigkeit 299 792 458 m/s (c) und entspricht v , da der Brechungsindex im Vakuum 1 ist. Bei einem Medium mit $n > 1$, wie zum Beispiel Wasser mit dem Wert 1.318, sinkt die Geschwindigkeit auf $v = 227\,460\,135$ m/s.⁷⁹ Das Teilchen ist hier also etwa um $\frac{1}{4}$ langsamer als in Vakuum (Siehe Gleichung 1). Tabelle 3 zeigt eine Auswahl im menschlichen Körper vorhandener Medien und ihrem jeweiligen Brechungsindex.

$$v > \frac{c}{n} \quad (1)$$

Medium	Brechungsindex	Literatur
Luft	1.0003	Ciddor 1996 ⁸⁰
Wasser	1.3180	Hale and Querry 1973 ⁷⁹
Blut	1.3010	Rowe <i>et al.</i> 2017 ⁸¹
Leber	1,3624	Giannios <i>et al.</i> 2016 ⁸²
Colon	1.3257	Giannios <i>et al.</i> 2016 ⁸²
DNA	1.5800	Inagaki <i>et al.</i> 1974 ⁸³

Tabelle 3: Eine Auswahl verschiedener Medien im menschlichen Körper und ihr jeweiliger Brechnungsindex.

Wenn sich ein geladenes Teilchen in einem dielektrischem Medium bewegt, werden die Moleküle im Medium lokal polarisiert und in einen angeregten Zustand gehoben. Beim Übergang zurück in den Grundzustand wird Energie in Form von Strahlung ausgesendet. Bewegt sich das geladene Teilchen schneller als Licht, entsteht eine asymmetrische Polarisation und es kommt zum sogenannten Kegeleffekt, bei dem sich die entstehenden Energiewellen gegenseitig verstärken (Abbildung 7). Diese Energiewellen nehmen wir als blaues Licht wahr und wird Tscherenkow-Strahlung genannt. Ist das geladene Teilchen zu langsam, kommt es zu einer symmetrischen Polarisation des Mediums und die entstehenden Energiewellen löschen sich gegenseitig aus.

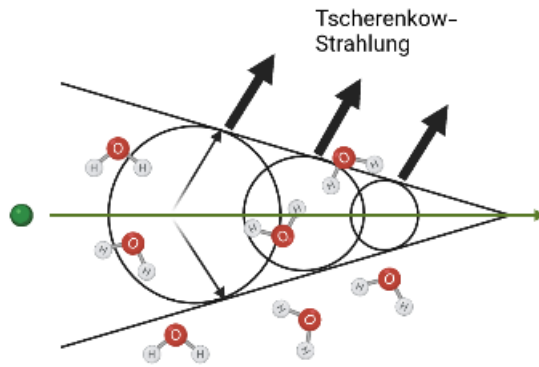


Abbildung 7: Schematische Darstellung der entstehenden Tscherenkow-Strahlung im wässrigen Medium.

Tscherenkow-Strahlung entsteht unter anderem aus der sekundären kosmischen Strahlung. Bekannter ist das blaue Licht jedoch eher aus Abklingbecken von Kernkraftwerken bei Kühlung radioaktiver Betastrahler, da Tscherenkow-Strahlung wie oben beschrieben als eine zweite Form von Strahlung aus ionisierender Strahlung entsteht. Betastrahler werden unter anderem als Radionuklide in der Klinik für Diagnose und Therapie von zahlreichen Krankheiten eingesetzt.

1.4 Radioaktive und therapeutisch eingesetzte Beta-Strahlung

Strahlen sind eine Form von Energie, die sich durch Materie und Raum ausbreitet. Je nach Energieniveau wird sich die Ausbreitung in Form von Teilchen oder Wellen, auch bekannt als Welle-Teilchen-Dualismus erklärt. Dabei überwiegt bei hohen Energien (z. B. Röntgenstrahlung, Gammastrahlung) der Teilchen-, bei niedrigen Energien (z. B. Radiowellen, Mikrowellen) der Wellencharakter. Grob kann Strahlung in ionisierend und nicht ionisierend eingeteilt werden. Zu der nicht ionisierenden Strahlung gehört die elektromagnetische Strahlung, bei der die Energie durch elektromagnetische Wellen bzw. Photonen übertragen wird. Die ionisierende Strahlung kann, meist durch Stoßprozesse eingeleitet, Elektronen oder Positronen aus Atomen entfernen, sodass Ionen entstehen. Dies passiert unter anderen bei radioaktiven Stoffen, was ebenfalls als radioaktive Strahlung bezeichnet wird. Besonders die Betastrahlung spielt medizinisch eine wesentliche Rolle, da diese in der Nuklearmedizin regelmäßig in der Radionuklidtherapie eingesetzt wird. Sie soll außerdem als Nebenprodukt Tscherenkow-Strahlung aussenden. Bei der Betastrahlung unterscheidet sich die β^- und die β^+ Strahlung voneinander, je nachdem, ob der Kern einen Überschuss an Neutronen oder an Protonen besitzt. In Tabelle 4 sind die unterschiedlichen Zerfallsarten dargestellt.

β^- Strahler	β^+ Strahler
${}^1_0n \rightarrow {}^1_1p + e^- + \bar{\nu}_e$	${}^1_1p \rightarrow {}^1_0n + e^+ + \nu_e$

Tabelle 4: **Darstellung des Beta-Zerfalls.** Bei der β^- Strahlung wandelt ein Nuklid mit einem Überschuss an Neutronen n diese in ein Proton p , ein Elektron e^- und ein Elektron-Antineutrino $\bar{\nu}_e$ um. Bei einem Protonen-Überschuss wird ein Proton in ein Neutron, Positron e^+ und ein Elektron-Neutrino ν_e umgewandelt, was β^+ Strahlung genannt wird.

Jedes Positron emittierende Nuklid (β^+) führt immer zu einem Elektroneneinfang (ec). Dies ist eine weitere Form des Betazerfalls, bei der ein Elektron vom Atomkern eingefangen wird. Das entstandene hoch-energetische Elektron beziehungsweise Positron hat eine Reichweite von mehreren Metern mit einem recht großen Durchdringungsvermögen. Es wird z. B. erst durch eine 3 mm dicke Aluminium Schicht abgebremst.

1.4.1 Super-Kamiokande

Die „Super-Kamiokande“ ist ein System, um die Elementarteilchen Neutrinos zu untersuchen. Es besteht aus einem riesigen Edelstahltank, der 50 000 Tonnen ultrareines Wasser fasst und an den Wänden mit 13 000 Photomultipliern (PMT) ausgekleidet ist (Abbildung 8). Sie ist bis heute der weltgrößte Wasser-Tscherenkow-Detektor und befindet sich 1.000 Meter unter der Erde im Kamioka-Bergwerk, Hida-Stadt, Gifu, Japan.

Die in Wasser eintreffenden Neutrinos erzeugen Tscherenkow-Strahlung, welche als elektromagnetische Strahlung aus Photonen besteht. Diese werden von den PMTs erfasst und in ein elektrisches Signal umgewandelt. So können anhand der PMTs Informationen über die Menge des erfassten Lichtes und den Zeitpunkt der Erfassung gemessen werden. Diese Informationen der PMTs bestimmen die Energie, die Richtung, den Interaktionspunkt und die Art der geladenen Teilchen. Bis heute wurden mit der Super-Kamiokande solare Neutrinos, atmosphärische Neutrinos und künstliche Neutrinos untersucht.⁸⁴

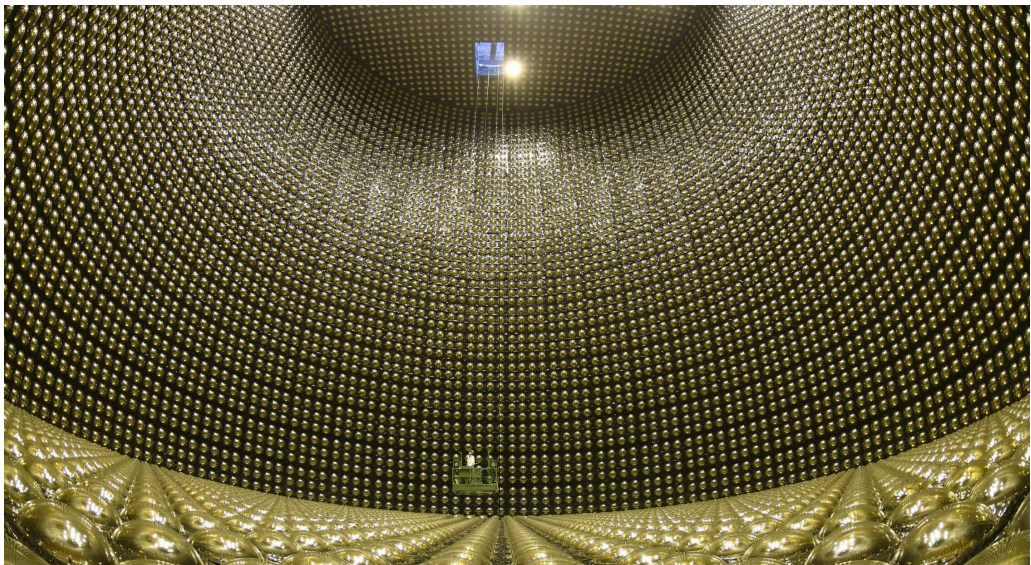


Abbildung 8: Dargestellt ist das Innere des Super-Kamiokanden-Tanks, welcher mit Photomultipliern ausgekleidet ist. Abbildung von der offiziellen Website der Super-Kamiokande.⁸⁴

1.4.2 Kosmische Strahlung

Der Ursprung der primären kosmischen Strahlung ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass diese aus Sternexplosionen, Kerne einer aktiven Galaxie und der Sonne stammen. Trifft diese Strahlung auf unsere Atmosphäre, kommt es zu Wechselwirkungen mit den Gasmolekülen der Luft und es entsteht eine Teilchenkaskade aus elektrisch geladenen Teilchen, die sekundäre kosmische Strahlung genannt wird. Diese besteht hauptsächlich aus Hadronen, Pionen und Kaonen, die direkt in Myonen, Neutrinos und Antineutrinos zerfallen. Myonen sind ebenfalls nicht elementar und zerfallen weiter in Elektronen, Positronen und auch wieder Neutrinos und Antineutrinos (Abbildung 9). Mit 80 % aller geladenen Teilchen machen die Myonen den größten Teil der sekundären kosmischen Strahlung aus. Sie besitzen viele Eigenschaften der Elektronen, haben jedoch eine 207-fache Masse, weswegen diese ein noch höheres Durchdringvermögen von Materie besitzen, und sie zerfallen nach einer mittleren Lebensdauer von $2.2 \mu\text{s}$.^{85,86}

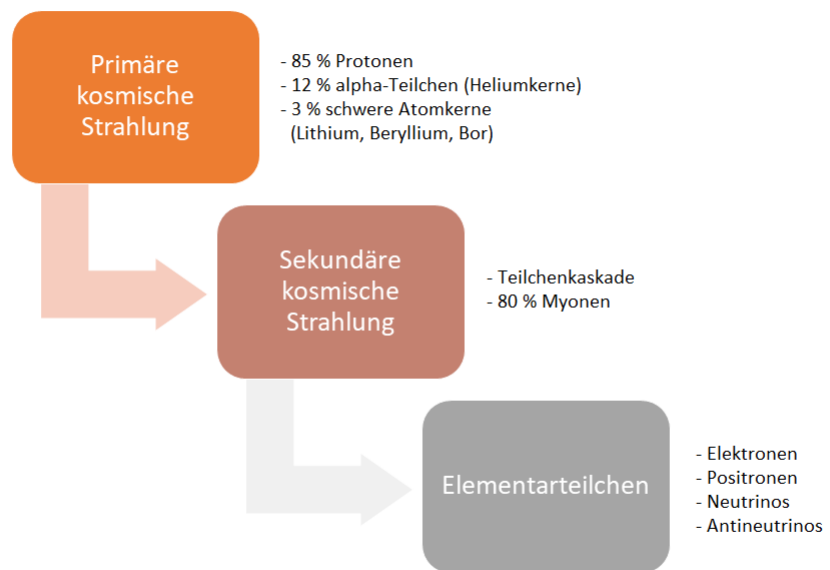


Abbildung 9: Zerfall der primären kosmischen Strahlung bei Auftreffen auf die Erdatmosphäre in den Kaskadenschauer der sekundären kosmischen Strahlung bis hin zu den Elementarpartikeln.

In dieser Arbeit geht es um die aus Beta-Strahlung entstehende Tscherenkow-Strahlung. Sie wird auf die Aktivierung eines photoresponsiven Prodrugs untersucht. Als Modellverbindung wird ein Proteinkinaseinhibitor gewählt, auf dessen biologische Zusammenhänge in den folgenden Kapiteln eingegangen wird.

1.5 Proteinkinasen

Proteinkinasen sind Enzyme, die unter ATP-Verbrauch die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin mit einer Hydroxylgruppe phosphorylieren (Abbildung 10). Daher gehören sie zu den Phosphotransferasen. Die Proteinphosphorylierung reguliert die meisten wichtigen biologischen Prozesse. Dazu gehören die Signalwege und zelluläre Prozesse, die den Stoffwechsel, die Transkription, den Ablauf des Zellzyklus, die Differenzierung und Apoptose, die interzelluläre Kommunikation sowie neuronale und immunologische Funktionen beeinflussen.⁸⁷ Fast 2 % des menschlichen Genoms sind Proteinkinasen. Ein Hauptteil davon sind die Serin-, Threonin- und Tyrosinkinase. Obwohl im menschlichen Kinom 90 Tyrosinkinase, davon 58 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, vorkommen, phosphorylieren die meisten der Proteinkinasen Serin- oder Threoninreste. Darüber hinaus existiert eine kleine Anzahl von Kinasen, die sowohl als Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen fungieren können.⁸⁸

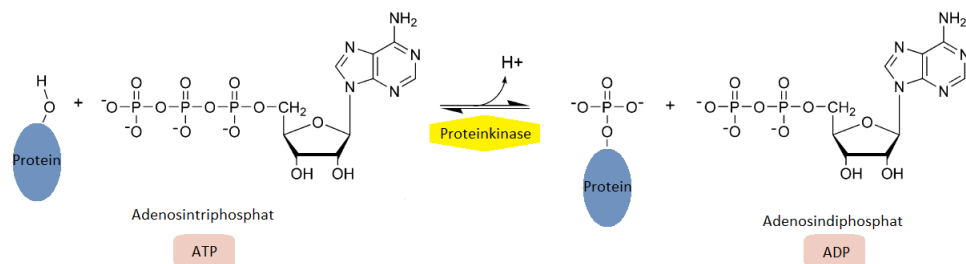


Abbildung 10: Übertragung des endständigen γ -Phosphats von ATP auf die Hydroxylgruppe eines Aminosäurerestes eines Proteins durch Katalyse einer Proteinkinase. Adaptiert von Schwartz *et al.*⁸⁸

Eine fehlerhafte Phosphorylierung kann eine Ursache oder auch Folge von Krankheiten wie zum Beispiel Krebs sein.⁸⁹ Vor 44 Jahren wurde das erste zelluläre Proto-Onkogen identifiziert, das für eine Proteinkinase kodiert, genannt SRC.⁹⁰ Nachfolgende Forschung hat die Schlüsselrolle vieler Mitglieder dieser Enzym-Superfamilie bei der Krebsentstehung und -progression gezeigt und führte zur Entwicklung hochselektiver und effektiver Therapien, die gegen spezifische Proteinkinasen wie BCR-ABL,⁹¹ mutiertes BRAF⁹² und HER2⁹³ gerichtet sind.⁹⁴ Mittlerweile gehören die Rezeptor-Proteinkinasen nach den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zu der zweitwichtigsten Gruppe von Rezeptoren.⁸⁹ Seit den späten 1980er Jahren begannen pharmazeutische Firmen damit, Inhibitoren von Proteinkinasen zu entwickeln.⁸⁹

1.6 Kinaseinhibitoren

1995 wurde der erste niedermolekulare Proteinkinaseinhibitor (smKI), Fasudil, zugelassen. Seitdem folgten immer mehr smKIs. Der große Durchbruch kam 2001 mit Imatinib, welcher für die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) zugelassen ist.⁹⁵ Attwood *et al.* bewiesen dabei, dass kleine Moleküle, die spezifisch auf molekulare Triebkräfte, wie der mutierten BCR-ABL-Kinase bei CML, eine wirksame Therapie bieten können.⁹⁵

Aktuell gibt es 71 von der FDA zugelassene niedermolekulare Proteinkinaseinhibitoren (Abbildung 11).⁹⁵ Die meisten davon betreffen die Onkologie, aber auch Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis können mittlerweile mit smKIs behandelt werden.⁹⁶

Die Inhibitoren werden je nach Bindungseigenschaften in verschiedene Typen unterteilt (Tabelle 5). Nach der ursprünglichen Klassifizierung in 3 Typen von Dar und Shokat 2011⁹⁷ wurden noch weitere Bindungseigenschaften festgestellt und weitere Typen hinzugefügt. Typ I½ vereint dabei Typ I und II und Typ V liegt noch nicht bei den zugelassenen Inhibitoren vor.

Typ I	Der Inhibitor bindet innerhalb und um die Adenintasche einer katalytisch aktiven Proteinkinase. ⁹⁷ (ATP-kompetitiv, aktive DFG-in-Konformation)
Typ I½	Die Bindung erfolgt an einer inaktiven Proteinkinase mit einer DFG-in-Struktur. ⁹⁸ Typ I½ kann genauso wie Typ 2 in die Subtypen A und B unterteilt werden. ⁹⁹
Typ II	Die Inhibitor-Bindung verläuft an einer inaktiven DFG-out-Kinase. Typ A Inhibitoren, die über den Sh2-Gatekeeper-Rest hinaus in den hinteren Spalt reichen. ⁹⁹ Typ B Arzneimittel, die nicht in den hinteren Spalt vordringen und daher eventuell eine kürzere Bindungsdauer vorweisen. ^{99,100} Ein Beispiel hierfür ist Sorafenib vom Typ IIA mit einer Bindungsdauer von über 64 Minuten und Sunitinib vom Typ IIB mit weniger als drei Minuten. ^{99,100}
Typ III	Eine allosterische Bindung innerhalb des tiefen Spaltes, der die aminoterminalen und carboxyterminalen Lappen trennt und an die ATP-Bindungsstelle angrenzt, aber unabhängig von der ATP-Bindungsstelle ist. ¹⁰¹
Typen IV	Wie bei Typ III liegt eine allosterische Bindung vor, jedoch außerhalb des Spaltes. ¹⁰¹
Typ V	Bivalente Bindungen, die sich über zwei verschiedene Regionen der Proteinkinase Domäne umfassen. ^{102,103} Bisher ist noch kein zugelassener Wirkstoff mit dieser Bindungsart verfügbar.
Typ VI	Bildung kovalenter Bindung mit Zielenzym. ⁹⁹

Tabelle 5: Einteilung der smKIs in verschiedene Bindungstypen.

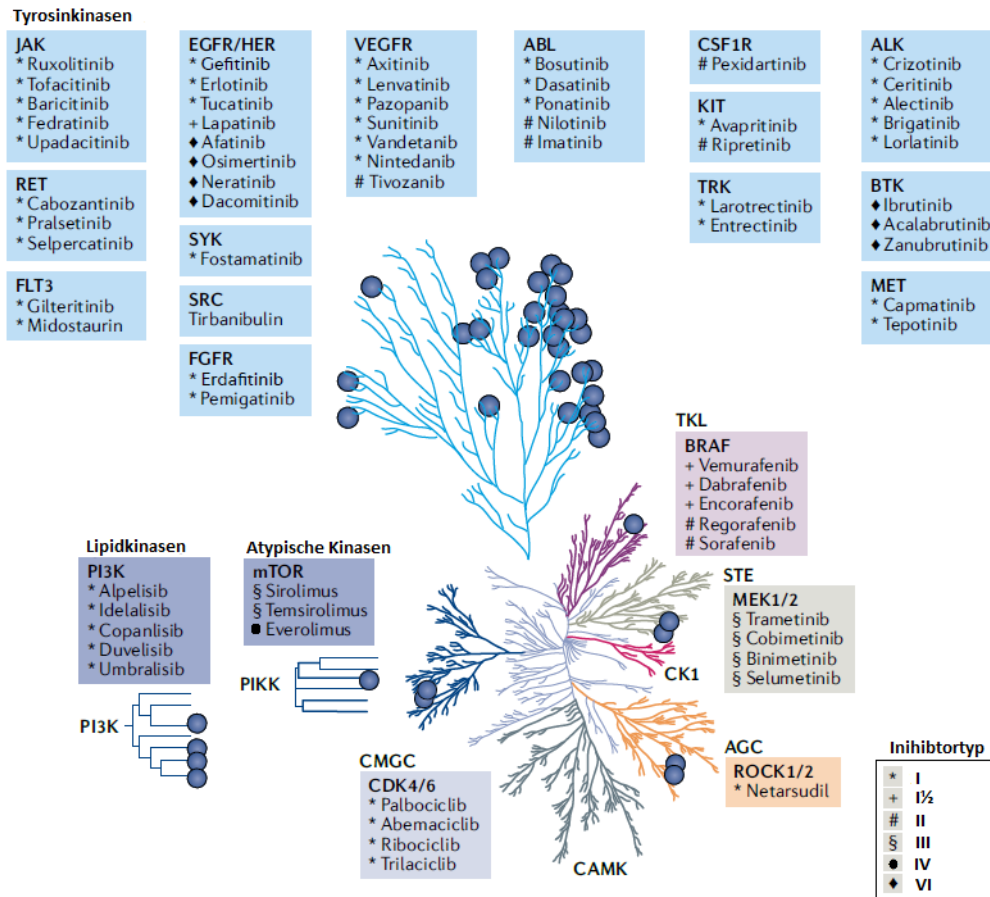


Abbildung 11: Bisher zugelassenen smKIs auf einer phylogenetischen Darstellung des menschlichen Kinoms. Einteilung der Inhibitoren nach ihren Hauptangriffskinasen und Markierung je nach Inhibitorstyp. Graph von Attwood *et al.* adaptiert.⁹⁵

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist, zu untersuchen, ob mit Hilfe von Tscherenkow-Strahlung, welche durch β -Radionuklide als Nebenprodukt entstehen soll, ein photopharmakologisches Prodrug-Konzept aktiviert werden kann. Als Modellverbindung wird hierfür der potente Kinaseinhibitor AZD5438 verwendet, der durch die kovalent gebundene 4,5-Dimethoxy-2-Nitrobenzyl-Schutzgruppe (DMNB) biologisch inaktiv gemacht wird und bei einer Wellenlänge von 365 nm wieder freigesetzt werden kann (Abbildung 12).⁷⁸ Zusätzlich sind auch der experimentelle Beweis und die Quantifizierung von entstehender Tscherenkow-Strahlung an einer Auswahl medizinisch relevanter Nuklide Teil dieser Arbeit.

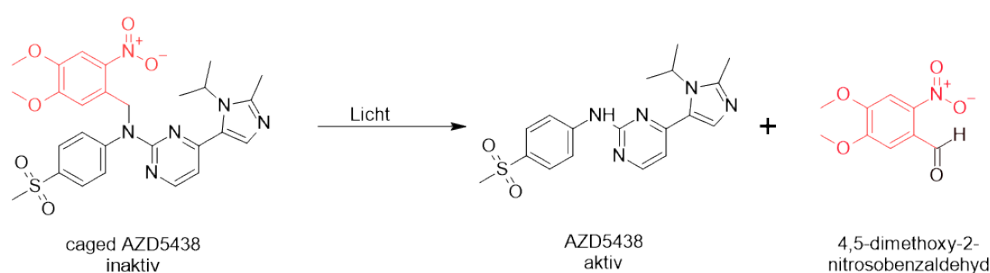


Abbildung 12: **Erwartete Photolysereaktion des Kinaseinhibitors AZD5438.** Der Inhibitor (schwarz) wird mit der Schutzgruppe 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB) (rot) direkt an der pharmakophoren Einheit des zyklischen Guanidins inaktiviert (caged AZD5438). Mit Hilfe von Licht wird diese Schutzgruppe wieder abgespalten und es entsteht das aktive AZD5438 und die abgetrennte Schutzgruppe 4,5-dimethoxy-2-nitrosobenzaldehyd nach Klán *et al.*⁹

Die Photopharmakologie ist ein Forschungsbereich, der die Spezifität von Wirkstoffen erhöht, indem deren biologische Wirksamkeit mit Hilfe von Licht kontrolliert wird. Die meisten bisher untersuchten Wirkstoffe, sowohl in der Photoschaltung als auch bei der Photoaktivierung durch Abspalten einer Schutzgruppe, benötigen eine Aktivierungswellenlänge von 300-500 nm (Tabelle 2), welche nicht dem biooptischen Fenster entspricht und bei Bestrahlung mit Licht nur wenige Millimeter in das menschliche Gewebe gelangen kann. Um das Problem der geringen Eindringtiefe zu überwinden, wird in dieser Arbeit als mögliche Strahlungsquelle die Tscherenkow-Strahlung untersucht. Diese Art an Strahlung ist eine elektromagnetische Strahlung, die ein Emissionsspektrum im nahen UV-Bereich (250-600 nm) aufweist, welches teilweise dem gesuchten Wellenlängenbereich entspricht. Sie wird unter anderem als Nebenprodukt beim Zerfall von Radionukliden ausgestrahlt. In den letzten Jahren wurde vermehrt die durch Radionuklide verursachte Tscherenkow-Strahlung in Zusammenhang

mit photopharmakologischen Anwendungen untersucht.

Nakumara *et al.* zum Beispiel untersuchten *in vivo* anhand von Biolumineszenz-Bildgebung die durch ^{18}F -FDG in Tumoren erzeugte Tscherenkow-Strahlung zur Einleitung einer Photoimmuntherapie, um die limitierte Eindringtiefe der Nahinfrarot-Photoimmuntherapie (NIR-PIT) zu umgehen. Die NIR-PIT ist eine neue Krebstherapie, die die Spezifität von Antikörpern zur gezielten Bekämpfung von Tumoren mit der durch Photoabsorbern nach Bestrahlung mit NIR-Licht hervorgerufenen Toxizität kombiniert.¹⁰⁴ Auch in der molekular-optischen Bildgebung mit Lumineszenz wird die Tscherenkow-Strahlung in Zusammenhang mit radioaktiven Nukliden wie ^{131}I , ^{18}F -FDG und ^{90}Y in Tieren und in Menschen untersucht.^{105–108} Des Weiteren werden besonders in der Photodynamischen Therapie immer mehr Versuche mit Tscherenkow-Strahlung durchgeführt.^{109–111} Dazu gehören Ran *et al.* mit ^{18}F und Kotagiri *et al.* *in vivo* zur Aktivierung eines sauerstoffunabhängigen Nanophotosensibilisators, Transferrin-beschichtetes Titandioxid (TiO_2).^{68,112} Im November 2022 veröffentlichten Hübinger *et al.* Untersuchungen einer Photoaktivierung von Psoralen durch Re-188 erzeugte Tscherenkow-Strahlung.¹¹³

In Tabelle 6 ist eine Auswahl klinisch relevanter Nuklide mit einigen wichtigen Parametern und deren Einsatzbereich dargestellt. Aus der Vielzahl dieser möglichen Radionuklide wurden in dieser Arbeit die therapeutisch und diagnostisch genutzten betastrahlenden Radionuklide ^{18}F , ^{68}Ga und ^{90}Y als eine repräsentative Auswahl von Betastrahlern näher untersucht. Als ein wesentliches Argument für diese Radionuklide waren die vergleichsweise kurzen Halbwertszeiten (Tabelle 6), um ausreichend Wiederholungen der Experimente innerhalb eines angemessenen Zeitraums zu ermöglichen. Dazu sollte neben β^+ -Strahler auch β^- -Strahler untersucht werden, da diese hauptsächlich in der Therapie verwendet werden. Zusätzlich ist die Zerfallsenergie des jeweiligen Radionuklids ein wichtiger Faktor. Laut Elrick *et al.* ist für die Erzeugung von Tscherenkow-Strahlung in einer wässrigen Lösung ein Schwellenwert von 0.26 mV nötig.¹¹⁴ Diese Energie ist jedoch nicht konstant, sondern es entsteht ein Kontinuumsspektrum, in dem die maximal emittierte Energie (E_{max}) und die mittlere Energie (E_{mean}) wesentliche Parameter sind.^{115,116} In Abbildung 13 sind die Kontinuumsspektren der Nuklide ^{18}F , ^{68}Ga und ^{90}Y dargestellt. Die Energieniveaus, die hauptsächlich erzeugt werden, entsprechen E_{mean} und betragen 0.25 MeV für ^{18}F , 0.84 MeV für ^{68}Ga und 0.93 MeV für ^{90}Y . Es ist auch möglich, das maximale hohe Energieniveau von ^{18}F mit $E_{max} = 0.63$ MeV, ^{68}Ga mit 1.90 MeV und ^{90}Y mit einem $E_{max} = 2.28$ MeV zu bestimmen. Daher wurde für weitere Untersuchungen auch das Nuklid ^{18}F ausgewählt, obwohl die hauptsächlich ausgesendete Energie nur bei 0.25 mV liegt.

Nuklide	$t_{\frac{1}{2}}$	E_{max} MeV	E_{mean} MeV	Strahlungstyp	Indikation
^{68}Ga	67.71 min	2.91	0.84 (87.72 %)	ec β^+ (100 %)	Diagnose, PET/CT ¹¹⁷
^{18}F	109.77 min	1.66	0.25 (96.73 %)	ec β^+ (100 %)	Diagnose, PET/CT ¹¹⁸
^{153}Sm	46.28 h	0.81	0.23 (49.40 %)	β^- (100 %)	Knochenmetastasen ¹¹⁹
^{90}Y	64.00 h	2.28	0.93 (99.99 %)	β^- (100 %)	Neuroendokrine Tumore, Pleura- und Peritonealkarzinose, hepatozelluläres und cholangiozelluläres Karzinom, Lebermetastasen, rheumatoide Arthritis, aktivierte Arthrose, maligne B-Zell-Lymphome ^{119, 120}
^{186}Re	3.72 d	1.07	0.36 (70.99 %)	β^- (92.33 %)	Lebermetastasen, rheumatoide Arthritis, aktivierte Arthrose ¹²⁰
^{177}Lu	6.64 d	0.50	0.15 (79.44 %)	β^- (100 %)	Neuroendokrine Tumore, ¹²¹ Knochenschmerzen, ¹²² metastasierender kastrationsresistenter Prostatakrebs ¹²³
^{131}I	8.03 d	0.97	0.19 (89.60 %)	β^- (100 %)	Neuroendokrine Tumore, Pleura- und Peritonealkarzinose, ¹¹⁹ Schilddrüsenautonomie, Morbus Basedow, Kropf, Schilddrüsenkrebs, Phäochromozytom, Lebermetastasen, Leberzell- und cholangiozelluläres Karzinom ¹²⁰
^{169}Er	9.39 d	0.35	0.10 (55,50 %)	β^- (100 %)	Rheumatoide Arthritis ¹²⁴
^{32}P	14.27 d	1.71	0.70 (100,00 %)	β^- (100 %)	Polycythemia vera, ^{119, 120} essentielle Thrombozythämie ¹²⁰

Tabelle 6: **Klinisch relevante Parameter ausgewählter Radionuklide mit klinischer Bedeutung.**¹²⁵ Neben der Halbwertszeit ($t_{\frac{1}{2}}$) sind noch die maximal mögliche Energie, die frei wird (E_{max}) und die Energie, die primär frei wird (E_{mean}), angegeben.

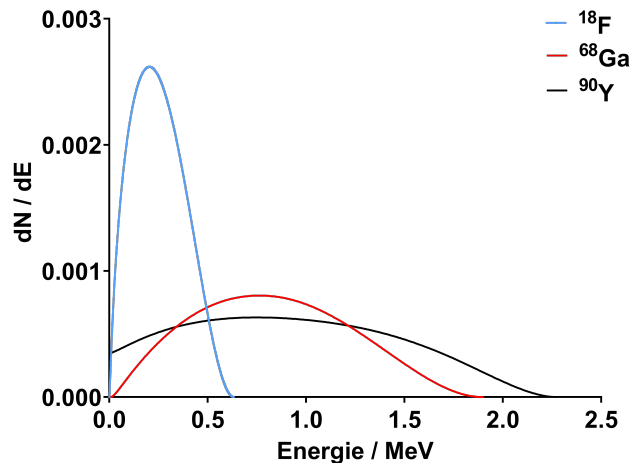


Abbildung 13: **Betaspektren der ausgewählten Nuklide ^{90}Y , ^{68}Ga und ^{18}F .** Aus den Spektren können die emittierenden Energien der jeweiligen Nuklide bestimmt werden. Alle Daten wurden mit Betashape ermittelt.^{126,127}

Um die mögliche photoresponsive Prodrug-Aktivierung durch Tscherenkow-Strahlung zu untersuchen, wurde als Modellsystem der hochpotente, jedoch unspezifische CDK-abhängige Kinasinhibitor AZD5438 eingesetzt und mit DMNB gecagt.^{9,67,128,129} Proteinkinasen spielen eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion und im Fall einer Fehlfunktion kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum oder reduzierter Apoptose führen.^{88,130} Der oral verfügbare und sehr effektive Wirkstoff AZD5438, mit den IC_{50} Werten von CDK1 von 16 nM, CDK2 von 6 nM und CDK9 von 20 nM, ist in den klinischen Studien aufgrund zu toxischer Nebenwirkungen durchgefallen.¹³¹ Daher ist der pharmakologisch aktive Wirkstoff AZD5438 und sein inaktiver Prodrug caged AZD5438 gut für die Untersuchung einer selektiven Anwendung geeignet, bei der durch zeitliche und räumliche Kontrolle der Wirkstoffaktivierung die Nebenwirkungen stark reduziert werden können.

Dies könnte zu einer neuen Kombination an photopharmakologischen Therapieansätzen führen. Zum Beispiel ist bei dem Einsatz der Radiotherapie kombiniert mit einer Chemotherapie ein additiver Effekt in der therapeutischen Wirkung bei verringerter Nebenwirkung denkbar. Darüber hinaus wäre eine Verringerung der radioaktiven Dosis möglich, wodurch neben den positiven Effekten beim Patienten eine deutlich bessere Handhabung für das klinische Personal mit weniger Sicherheitsvorkehrungen und geringerem Gefahrenpotenzial und letztendlich geringeren Kosten für die Anwendung resultieren würde.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Nachweis der Tscherenkow-Strahlung

Für den Nachweis entstehender Tscherenkow-Strahlung durch den Zerfall von Radionukliden wird häufig ein Tscherenkow-Zähler verwendet.¹³² Dieser gilt für biochemische Assays als eine typische Auslesetechnik, die resultierende Tscherenkow-Strahlung durch den Zerfall von Radionukliden (z. B. ^{32}P) registriert.¹³² Derartige konventionellen Nachweisverfahren konnten jedoch in dieser Arbeit für die durchgeführten Experimente nicht eingesetzt werden aufgrund des häufig langsamen Zerfalls der verwendeten Radionuklide und den damit einhergehenden langen Kontaminationszeiten. Als Alternative wurde daher die Kamiokanne verwendet. Diese wird z.B. in Bildungseinrichtungen genutzt, um sekundäre kosmische Strahlung zu untersuchen, dessen Myonen Tscherenkow-Strahlung erzeugen (Kapitel 6.5.1).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung die beiden β^+ -Strahler ^{18}F und ^{68}Ga und als β^- -Strahler ^{90}Y ausgewählt. Um zu überprüfen, ob eingehende Signale im Experiment mit Radionukliden tatsächlich auf der Tscherenkow-Strahlung zurückzuführen sind und nicht durch die Betastrahlung selbst entstehen, wurde in einem Kontrollexperiment eine dünne Schicht Aluminiumfolie (20 μm) um den PMT der Kamiokanne gelegt. Im Gegensatz zur Betastrahlung sind die Photonen der Tscherenkow-Strahlung nicht in der Lage, die Aluminiumfolie zu durchdringen. Dass bei diesem Experiment keine Signale festgestellt werden konnten, lässt sich schlussfolgern, dass das PMT-Auslesesignal durch die Betastrahlung nicht verändert wird.

Um den Anforderungen an mögliche translationale Zwecke dieses Konzeptes gerecht zu werden, wurden zum einen die Radionuklide in Energiebereichen getestet, die ihren jeweiligen klinischen Anwendungen entsprechen. Weiterhin wurden möglichst auch die gleichen Energiebereiche gewählt, um eventuelle Vergleiche bezüglich der Radionuklide untereinander ziehen zu können. Daher liegen die gewählten Aktivitätsbereiche für ^{68}Ga von 1.163 bis 0.256 GBq, für ^{18}F von 2.317 GBq bis 0.117 GBq und für ^{90}Y von 0.510 bis 0.071 GBq.^{133,134} Abbildung 14 fasst die Ergebnisse der Experimente zusammen. Basierend auf dem Zerfall konnte für alle ausgewählten Nuklide eine Erzeugung von Tscherenkow-Strahlung bestimmt werden. Sowohl für ^{68}Ga als auch für ^{90}Y wurde ein aktivitätsabhängiger signifikanter Anstieg für Tscherenkow-Strahlung-Signale beobachtet. Entsprechend ihrer jeweiligen Zerfallsenergie ist für ^{68}Ga im Vergleich zu ^{90}Y mehr Aktivität erforderlich, um ein vergleichbares Tscherenkow-Strahlung-Signalniveau zu erreichen. Im Gegensatz dazu konnte für ^{18}F nur Tscherenkow-Strahlung knapp über dem Nullwert bestimmt werden.

Selbst bei sehr hoher Aktivität von über 2 GBq steigt die Signalstärke der Tscherenkow-Strahlung beim Zerfall von ^{18}F kaum an. Dies könnte daran liegen, dass aufgrund des geringen mittleren Energielevels E_{mean} von 0.25 MeV ein Großteil der Photonen den Schwellenwert nach Elrick *et al.* von 0.26 MeV für die Bildung Tscherenkow-Strahlung nicht erreicht.¹¹⁴

Abschließend konnte bei ^{68}Ga und ^{90}Y ein starker Anstieg von Tscherenkow-Strahlung bei Einsatz höherer Aktivitäten detektiert werden. Daher sind diese beiden Nuklide für neuartige photopharmakologische Anwendungen möglicherweise geeignet. ^{18}F erzeugt ebenfalls Tscherenkow-Strahlung, allerdings in einem viel geringeren Ausmaß, das gegebenenfalls nicht zur Aktivierung photopharmakologischer Konzepte ausreichen könnte.

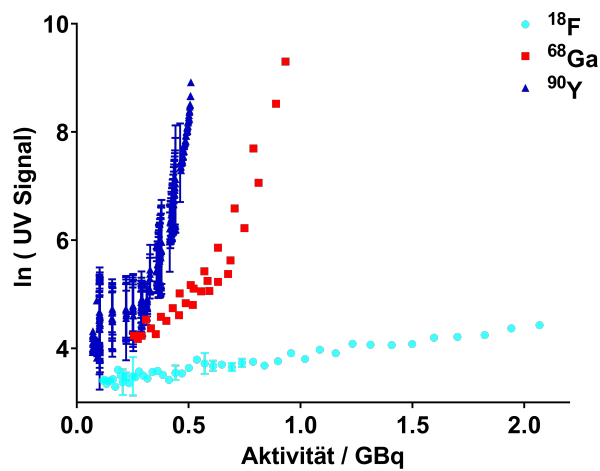


Abbildung 14: **Aktivitätsabhängige Erzeugung von Tscherenkow-Strahlung in den Kamiokande-Experimenten.** Die Aktivitäten der drei Radionuklide ^{18}F , ^{68}Ga und ^{90}Y sind einzeln für jedes Experiment in Korrelation zur resultierenden Tscherenkow-Signalstärke (UV-Signal) dargestellt. Die Signalstärke entspricht der Anzahl der Signale in 10-Minuten-Intervallen. Die Signale der kosmischen Strahlung wurden zur Bestimmung der Basislinie verwendet. Jedes der Radionuklide wurde in drei unabhängigen Experimenten getestet, die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar.

3.2 Untersuchung einer Aktivierung des Modellsystems caged AZD5438

Für die mögliche Aktivierung eines photopharmakologischen Systems wurde als Modellsystem das mit DMNB gecagte AZD5438 verwendet. Die DMNB-Gruppe ist bereits im Arbeitskreis von Prof. Dr. Peifer im Zusammenhang mit dem zentralen Pharmakophor N-Phenylpyrimidin-2-amin, einem Gerüst vieler Kinaseinhibitoren einschließlich dem des AZD5438, untersucht worden.¹³⁵ Hierbei wurde eine kleine Gruppe von para-phenyl-substituierten Derivaten mit unterschiedlichen I/M-Effekten entwickelt, synthetisiert und die Parameter der jeweiligen Photolyse bestimmt. Photokinetische Messungen und die Korrelation mit Hammett-Konstanten zeigten, dass elektronenspendende +M Substituenten invers mit dem Ausmaß der Photolyse korrelieren. Andererseits konnten Substituenten mit elektronenziehenden -M Effekten keinen signifikanten Einfluss auf die Photolyse nehmen. Ein Grund könnte der nivellierende Effekt des bereits elektronenarmen Pyrimidinringes sein. Hier ist das freie Elektronenpaar des DMNB-gebundenen Stickstoffs bereits im zyklischen Guanidinrest delokalisiert, was zu einer schwachen Elektronendichte sowohl am Stickstoffatom als auch am benzylichen Kohlenstoff führt (Artikel siehe Anhang).

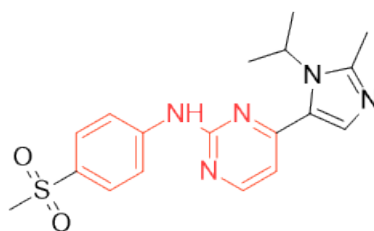


Abbildung 15: **Abbildung des Inhibitors AZD5438.** Das Pharmakophor N-Phenylpyrimidin-2-amin ist rot markiert.

3.2.1 Modelling

Das Modelling von AZD5438 wurde in CDK2 mit Cyclin E1 (pdb 4FKO) durchgeführt. Durch die Wasserstoffbrückenbindungen des zyklischen Guanidinsystems des Imdidazolringes zu der hinge-Region der ATP Bindetasche des Proteins Leu83 ist erkennbar, dass sich hier ein geeigneter Ort für das Einsetzen der Schutzgruppe befindet (Abbildung 16). Durch die kovalente Bindung der Schutzgruppe an das exocyclische NH des Guanidins wird die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen verhindert und der Inhibitor inaktiv, da er aufgrund sterischer Konflikte nicht mehr in die Bindetasche passt. Abbildung 17 zeigt dementsprechend, dass im Modelling mit dem gecagten Inhibitor kein plausibler Bindungsmodus ermittelt werden konnte.

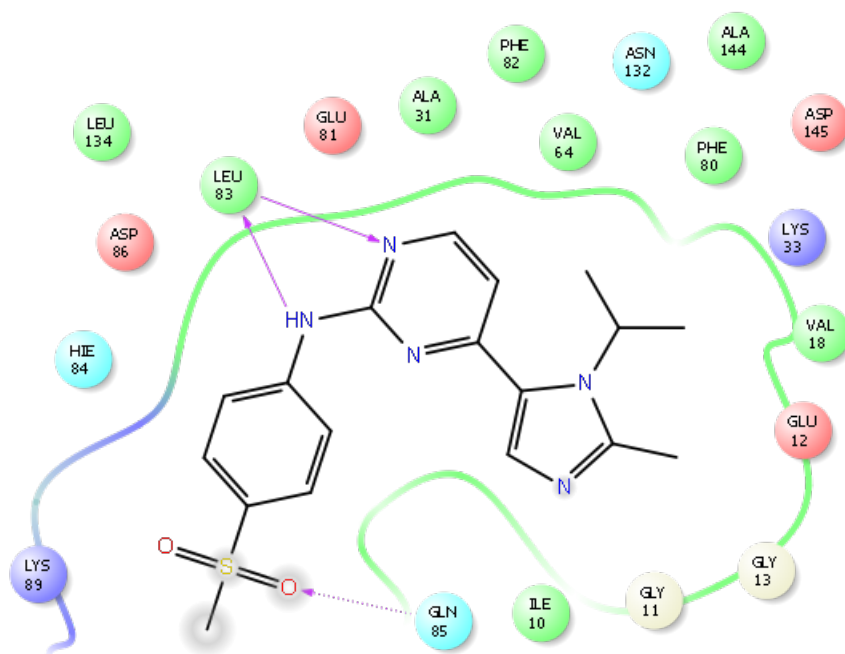


Abbildung 16: **2D-Liganden-Interaktionsdiagramm von AZD5438 in der ATP-Bindetasche von CDK2/Cyclin E1.** Die Wasserstoffbrückenbindungen vom Liganden zum Protein (Hinge Region Leu83) sind in violett dargestellt. Der Graph wurde von Theo Rodat erstellt.

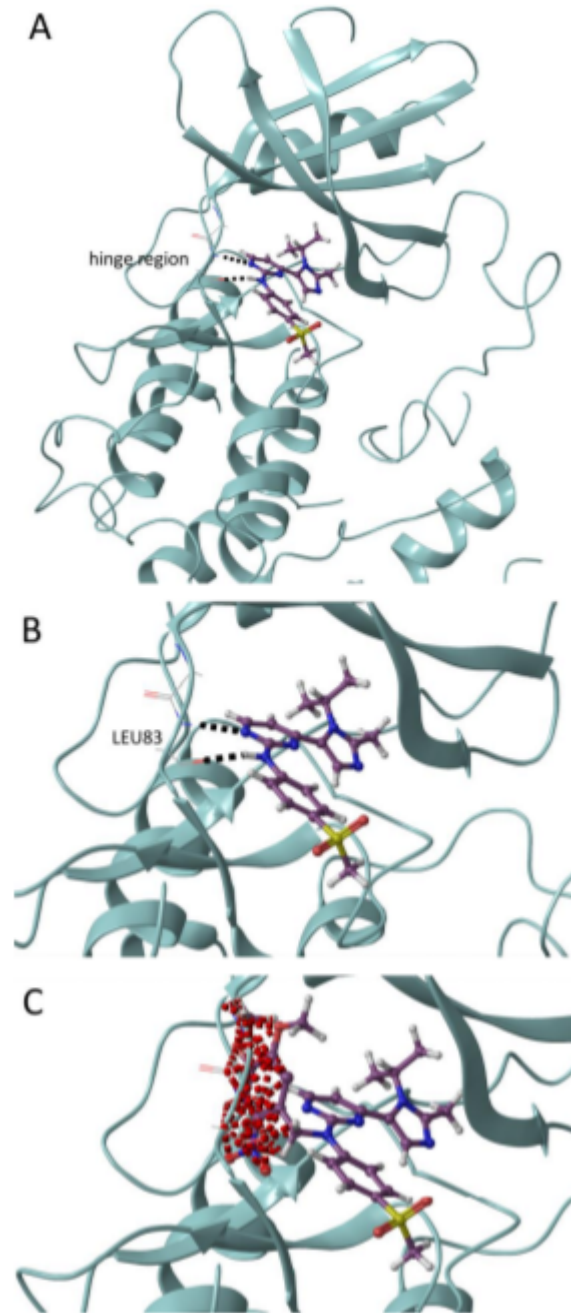


Abbildung 17: **3D-Bindungsmodus des Inhibitors AZD5438 in der ATP-Bindetasche von CDK2 in 3 Darstellungen.** **A)** Die Bindetasche mit der *hinge region* wird dargestellt. H-Bindungen sind zwischen dem Liganden und dem Protein ausgebildet (schwarz gepunktet). **B)** Vergrößerte Ansicht der Bindetasche mit Leucin 83 als zentrales duales H-Brücken Motiv in der Hinge Region. **C)** Überlagertes DMNB-AZD5438 in der ATP-Bindungstasche. Rote gestrichelte Linien stellen sterische Hindernisse zwischen der Schutzgruppe und dem Protein dar. Die Graphen wurden von Alexander Döbber erstellt.

3.2.2 Synthese

Caged AZD5438 wurde anhand des allgemeinen Verfahrens von N-Phenylpyrimidin-2-aminen mit Benzylbromiden unter Argonatmosphäre synthetisiert.¹²⁶ In einer nukleophilen Substitution zweiter Ordnung (S_N2) wird die benzyliche Brom-Methylgruppe des 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylbromids von dem deprotonierten Amin des Inhibitors, welches als Nukleophil agiert, angegriffen. Unter Abspaltung von Hydrogenbromid entsteht das DMNB- caged AZD5438.

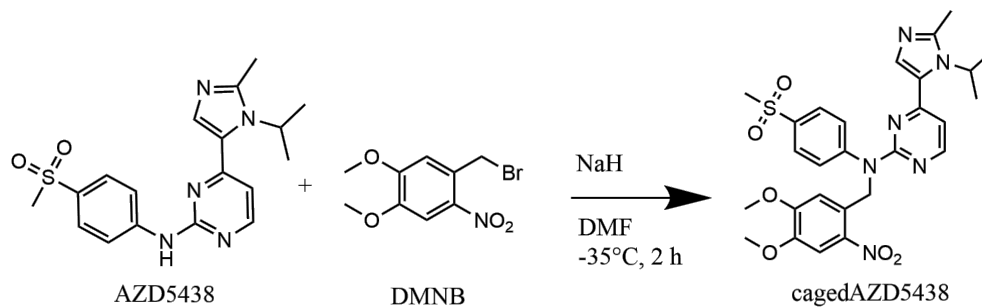


Abbildung 18: **Synthese des mit DMNB caged AZD5438.** Im Arbeitskreis erstmals von Alexander Döbber synthetisiert.

3.2.3 Photochemische Charakterisierung

UV/Vis-Spektrum

Anhand eines UV/Vis-Spektrums sowohl von dem freien Inhibitor als auch caged mit DMNB ist ersichtlich, dass beide Verbindungen ihre Absorptionsbanden im Bereich von 250 nm bis 360 nm aufweisen. Das Absorptionsmaximum liegt dabei bei 296 nm. Der caged Inhibitor absorbiert darüber hinaus noch bis 450 nm, sodass in diesem höheren Wellenlängenbereich eine gezielte Anregung und Aktivierung möglich ist. Daher wurde zum Uncaging die Abspaltungswellenlänge von 365 nm gewählt (Abbildung 19). Durch die Überlagerung des Emissionsspektrums der Tscherenkow-Strahlung ist erkennbar, dass dieses im Absorptionsbereich des Inhibitors liegt und daher für die Aktivierung des DMNB-AZD5438 gut geeignet sein sollte.

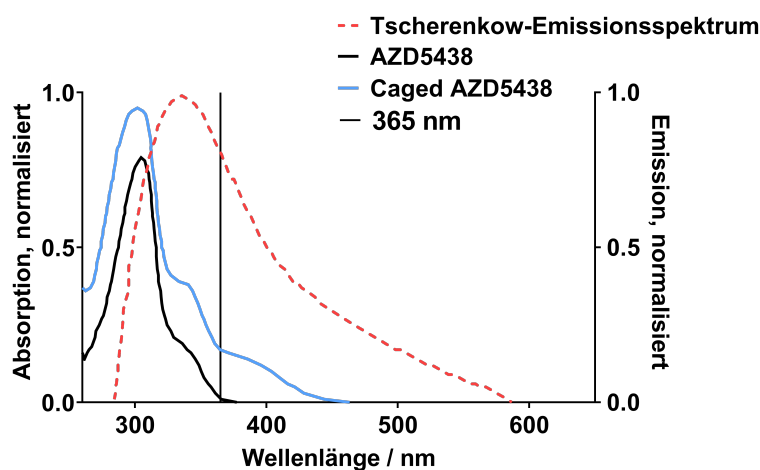


Abbildung 19: UV/Vis Spektrum vom AZD5438 und dem mit DMNB caged Inhibitor. Das Absorptionsspektrum des freien Inhibitors AZD5438 wird als schwarze Linie dargestellt und die des DMNB-caged AZD5438 als blaue Linie. Die in den uncaging Experimenten verwendete Wellenlänge 365 nm wird zur Verdeutlichung mit einem grauen Strich markiert. Das Emissionsspektrum der Tscherenkow-Strahlung liegt als rote gestrichelte Linie vor.

Photolyse/Uncaging

Zur Photolyse-Untersuchung wurden die wässrigen Proben der jeweiligen Verbindungen mit 365 nm bestrahlt und der Reaktionsverlauf anschließend mittels HPLC analysiert. Der Inhibitor AZD5438 selbst erwies sich während der UV-Bestrahlung als stabil (Abbildung 20a). Im Gegensatz dazu wurde bei der Bestrahlung des geschützten Inhibitors nach 100 s Bestrahlung nur 75 % AZD5438 freigesetzt, was sich auch nach längerer oder intensiverer Bestrahlung nicht veränderte (Abbildung 20b). In den HPLC-Spektren konnten bei der Detektionswellenlänge von 296 nm keine Nebenprodukte nachgewiesen werden.

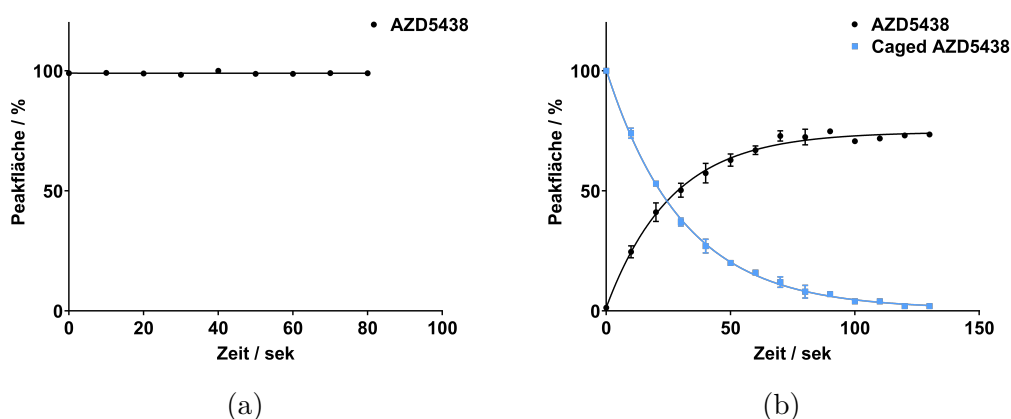


Abbildung 20: **Photoaktivierung durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 365 nm.** (a) von AZD5438 (schwarz) (b) von caged AZD5438 (blau). Die wässrige Probe, die 50 μ M Versuchslösung und 20 % DMSO enthält, wurde bei 365 nm, 37.5 mW, alle 10 s bestrahlt und anschließend mittels HPLC analysiert. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten.

Zur Erklärung der nicht-quantitativen uncaging Reaktion liegt nahe, dass die Entstehung eines radikalischen Prozesses einen Teil des geschützten Inhibitors zersetzt und ein Produktgemisch erzeugt wird, das mit der verwendeten HPLC Methode nicht detektiert wird. Zur Überprüfung wurden Experimente mit Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) durchgeführt.

Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Mit Hilfe von Untersuchungen der ESR konnte bestätigt werden, dass bei der UV-Bestrahlung einer Lösung von caged AZD5438 Radikale erzeugt werden (Abbildung 21b). Da beim freien Inhibitor kein radikalischer Prozess beobachtet werden konnte (Abbildung 21a), wird bei der Photolyse nur der geschützte Inhibitor durch entstehende Radikale zersetzt. Dabei entsteht anscheinend ein Gemisch aus Produkten, die bei der HPLC-Analyse bei der gemessenen Detektionswellenlänge von 296 nm nicht nachgewiesen werden konnten.

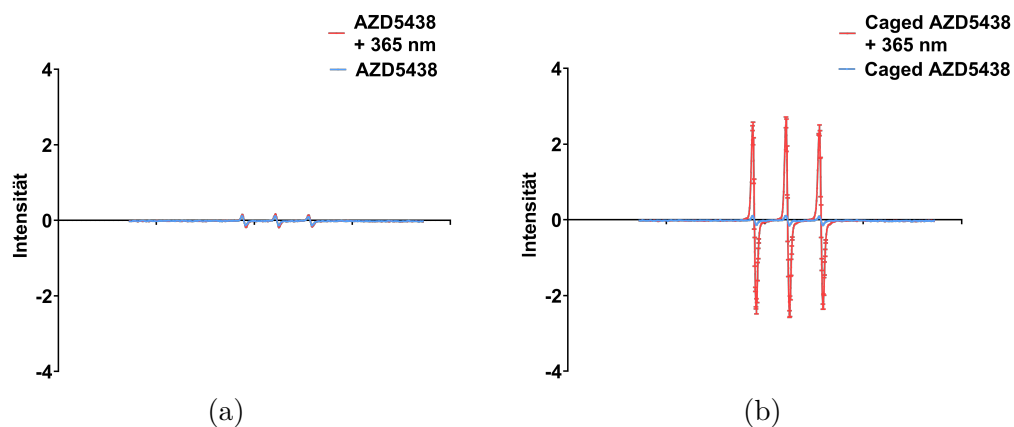


Abbildung 21: **Elektronenspinresonanz-Spektren (ESR)** der verschiedenen Proben mit (rot) und ohne (blau) Bestrahlung mit Licht (365 nm, 100 s, 37.5 mW pro Well) (a) von AZD5438 (b) von DMNB-AZD5438. Die Graphen zeigen den Mittelwert dreier Versuche inklusive Standardabweichung an.

Quencher-Experimente

Um die Konzentrationsabnahme bzw. radikalische Zersetzung von caged AZD5438 aufgrund der entstehenden Radikale zu verringern und Wirkstoff zurückgewinnen zu können, wurde die Photolyse unter Zugabe von Quenchern (Antioxidanzien) untersucht. 2012 testeten Blois *et al.* die Wirksamkeit von Quenchern zur Verringerung der Radiolyse von ^{111}In - oder ^{177}Lu -markierten Methionin-haltigen regulatorischen Peptiden.¹³⁶ Liu *et al.* untersuchten 2001 die Stabilisierung des ^{90}Y -markierten DOTA-Peptid-Konjugats (RP697) durch Gentisinsäure und Ascorbinsäure.¹³⁷ In diesen Studien wiesen Ascorbinsäure und Gentisinsäure gute Stabilisierungseigenschaften auf, daher wurden sie bei diesem Modellsystem verwendet.

Es zeigte sich, dass Ascorbinsäure sowohl in niedrigen Konzentrationsbereichen als auch in hohen keinerlei Einfluss auf die Photolyse von caged AZD5438 ausübt (Abbildung 22a). Gentisinsäure dagegen verhindert die Photolyse umso mehr, je höher die eingesetzte Konzentration ist (Abbildung 22b-d). Leider bewirkte der Zusatz an Gentisinsäure keine vermehrte Freisetzung von AZD5438, sondern lediglich ein vermindertes Uncaging. Beide Antioxidanzien blieben bei Bestrahlung bei 365 nm stabil und auch der freie Inhibitor AZD5438 alleine wurde nicht von den Quenchern beeinflusst.

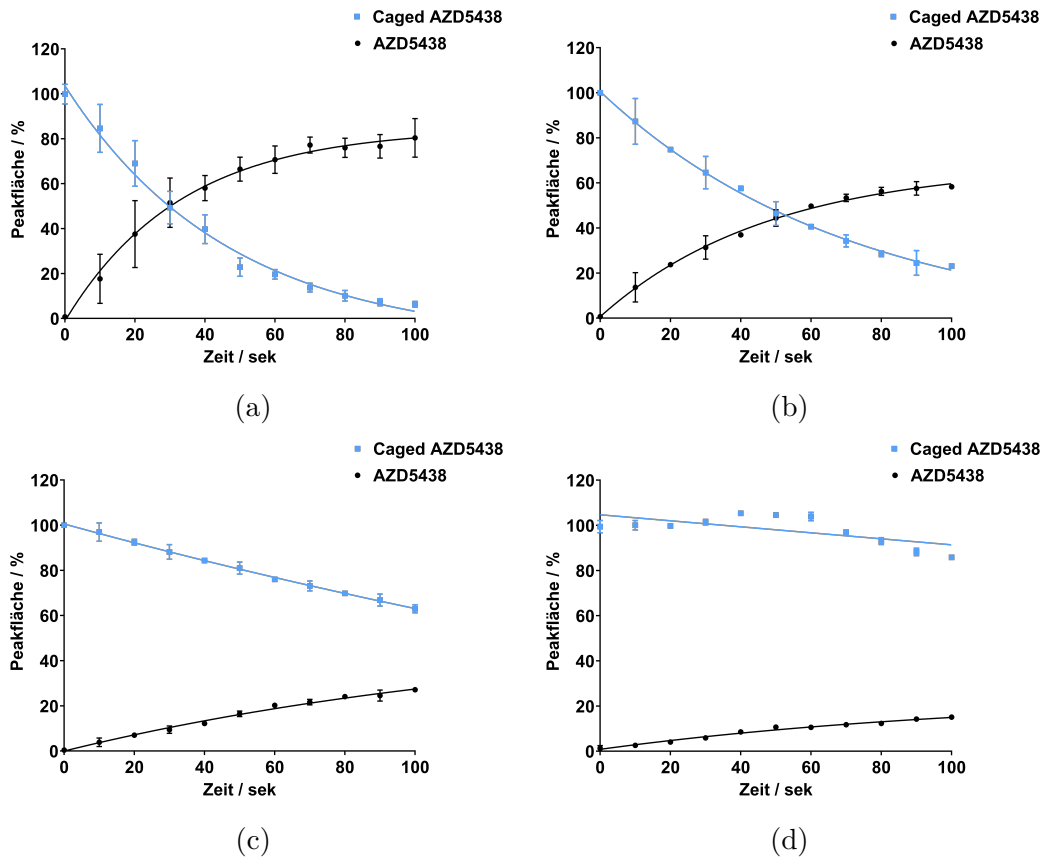


Abbildung 22: **Photolyse vom caged AZD5438 mit Quenchern (a) mit 0.1 %, 1 %, 5 % und 10 % Ascorbinsäure (b) - (d) 0.1 %, 0.5 % und 1 % Gentsinsäure.** Die Graphen stellen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten inklusive Standardabweichung dar.

3.3 Biologische Evaluation

Um die Photolysereaktion von caged AZD5438 und deren Prodrugaktivierung *in vitro* zu testen, wurde die CDK2-Kinaseaktivität über den ATP-Verbrauch der Kinasereaktion gemessen.¹³⁸ In dem enzymatischen CDK2/Cyclin E1 Assay (Biolumineszenzassay) zeigte AZD5438 mit einem IC_{50} -Wert von 2.8 nM eine hohe Aktivität, was mit den Referenzdaten ($IC_{50} = 6$ nM) übereinstimmt.¹³¹ Im Vergleich dazu wurde bei caged AZD5438 ohne Bestrahlung eine deutlich geringere Aktivität festgestellt ($IC_{50} = 4798$ nM). Bei Bestrahlung des Assays mit dem gecagtem AZD5438 mit der Wellenlänge von 365 nm konnte die biologische Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von 5.6 nM auf CDK2 wiederhergestellt werden (Abbildung 23). Der photopharmakologische Faktor zwischen dem freien und dem geschützten Arzneistoff liegt dabei bei 850.

Des Weiteren wurden AZD5438 und DMNB-AZD5438 *in vitro* im Zellproliferationsassay untersucht. Hierfür wurde die Pankreaskarzinomzelllinie Panc89 mit Resazurin als Indikator verwendet. Mit einem IC_{50} -Wert von >10 μ M (Abbildung 23b) kann caged AZD5438 in diesem zellulären Testmodell als biologisch inaktiv angesehen werden. Nach der Bestrahlung mit 365 nm konnte die biologische Wirksamkeit von AZD5438 mit einem IC_{50} -Wert von 0.5 μ M (Referenz AZD5438 $IC_{50} = 0.8$ μ M)¹³¹ vollständig wiederhergestellt werden. Insgesamt konnte sowohl im Kinase- als auch im Zelltest eine klare photoresponsive Wirkung für caged AZD5438 nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass diese Verbindung ein geeignetes Modellsystem für weitere Experimente mit den Radionukliden ^{18}F , ^{68}Ga und ^{90}Y darstellt.

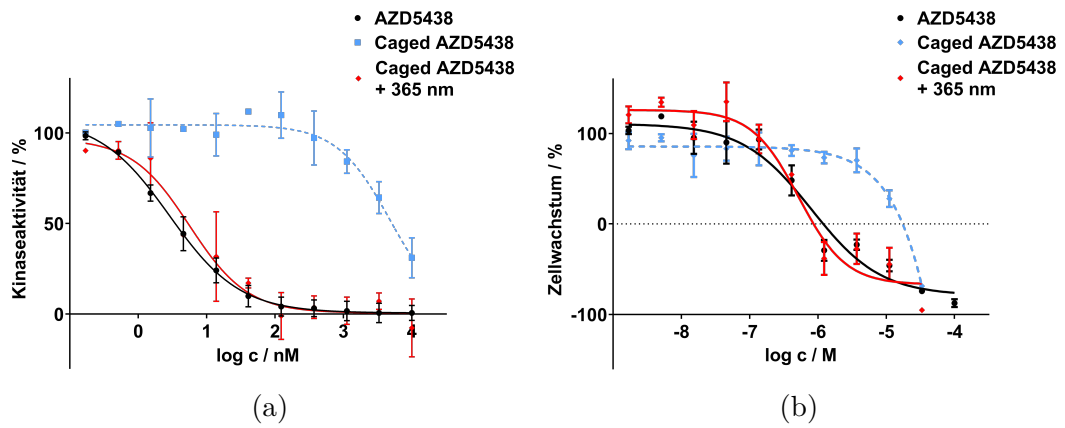


Abbildung 23: **Biologische Testungen des Modellsystems** (a) Kinasetest von AZD5438 mit und ohne der DMNB-Schutzgruppe unter Verwendung des Zielkinasetests CDK2/Cyclin E1 mit und ohne UV-Bestrahlung zur Bestimmung der Kinaseaktivität. (b) Zellproliferationstest mit dem Inhibitor AZD5438 und caged AZD5438 mit und ohne UV-Bestrahlung mit Panc89-Zellen. In der Zellproliferation bedeutet ein positiver Prozentsatz Wachstum (bis 100 %) und ein negativer bis - 100 % den Zelltod. Die Daten stellen den Mittelwert von je drei unabhängigen Experimenten inklusive der Standardabweichung dar. Die biologische Testung wurde von Theo Rodat durchgeführt.

3.4 Photoresponsive Prodrug-Aktivierung durch Radionuklide

Nach der photochemischen Charakterisierung und den biologischen Testungen mit den Modellverbindungen wurde nun untersucht, ob eine Abspaltung der Schutzgruppe von DMNB-AZD5438 anhand der entstehenden Tscherenkow-Strahlung von den Radionukliden ^{18}F , ^{68}Ga und ^{90}Y möglich ist, sodass der Proteinkinaseinhibitor AZD5438 wieder freigesetzt werden kann.

Stabilitätstests

Zuerst wurde geprüft, ob das freie AZD5438 in Kombination mit den Nukliden stabil ist. Wie in Abbildung 24 dargestellt, zeigte sich, dass der Wirkstoff bei der Inkubation mit allen drei Nukliden in der am höchsten verwendeten Radioaktivität stabil bleibt.

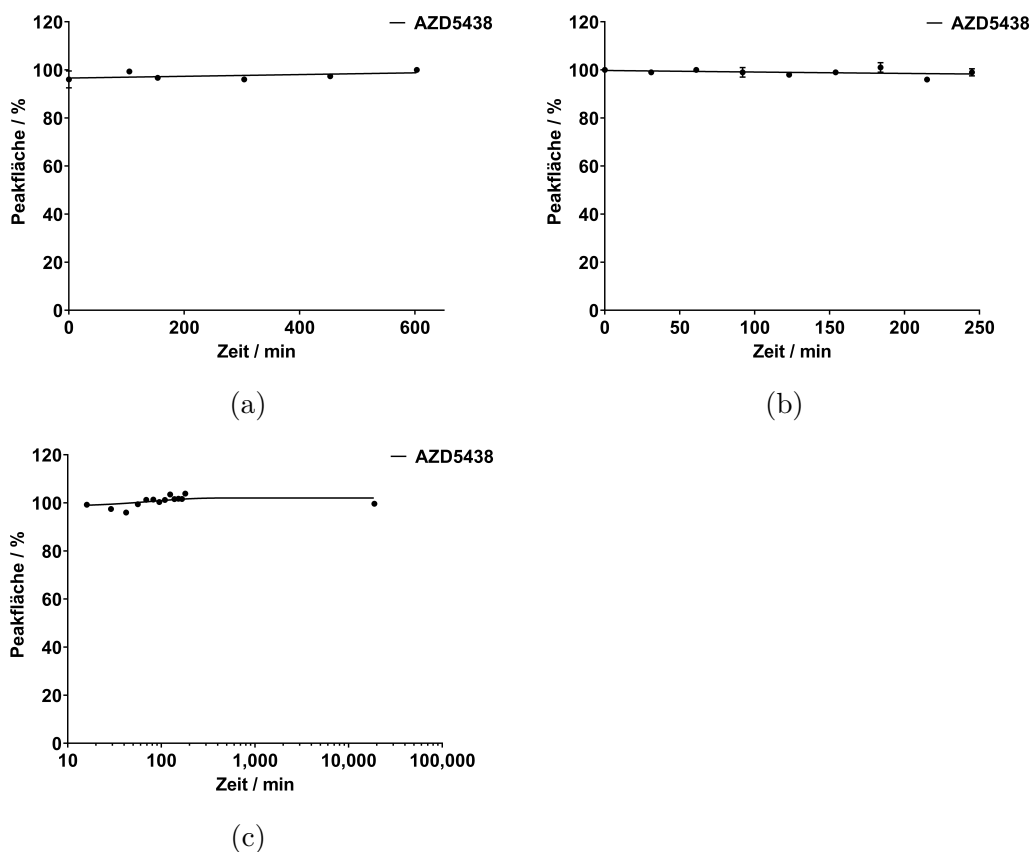


Abbildung 24: **Stabilitätstests von AZD5438 mit den Radionukliden** (a) 200 MBq ^{18}F (b) 900 MBq ^{68}Ga (c) 419 MBq ^{90}Y . Die Werte zeigen die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente inklusive Standardabweichung an.

3.4.1 ^{18}F Fluor

Im Gegensatz zu den Nukliden ^{68}Ga und ^{90}Y lagen die durch den Zerfall von ^{18}F erzeugten Tscherenkow-Strahlung-Signale in den Kamiokannenexperimenten aus Kapitel 3.1 auf dem Ausgangsniveau der Signale der kosmischen Strahlung. Konzeptionell stellt der Zerfall von ^{18}F mit 96.7 % Positronenemission einen Grenzfall mit einer maximalen Zerfallsenergie von 0.63 MeV und einer mittleren Energie von 0.25 MeV dar.^{114,125} Aufgrund der bereits veröffentlichten Experimente wie der Aktivierung mittels ^{18}F bei photoresponsiven Verbindungen in einem photodynamischen Therapieansatz¹¹² und einer *Proof-of-Concept*-Studie eines caged Derivates von Luciferin durch ^{18}F FDG in einem Maus-Brustkrebs Modell,⁶⁸ wurde auch in dieser Arbeit das AZD5438 Modellsystem bezüglich der Photoaktivierung mit ^{18}F Fluor untersucht.

In den eingesetzten Aktivitätskonzentrationen von 20-300 MBq/mL, die denen in der Radiotherapie verwendeten entspricht, konnte in keiner der angesetzten Proben (Tabelle 9, Kapitel 6.5.2) eine Freisetzung von AZD5438 während der Inkubation mit dem Betastrahler ^{18}F für bis zu 12 Stunden festgestellt werden.¹³³ Alle Versuche wurden in Abbildung 25 zusammengefasst. Für den direkten Vergleich wurde das UV Signal der von ^{18}F erzeugten Tscherenkow-Strahlung hinzugefügt. So wird gezeigt, dass die gemessene elektromagnetische Strahlung keinen Einfluss auf den geschützten Inhibitor hatte. Um Kontrollversuche nach der zwölfstündigen Inkubationszeit durchführen zu können, wurden die ^{18}F -Proben, die caged AZD5438 enthielten, mit UV-Licht von 365 nm bestrahlt. Hier konnte wieder eine Photoaktivierung des Arzneistoffs nachgewiesen werden, was zeigt, dass die durch den Zerfall von ^{18}F erzeugte Tscherenkow-Strahlung für die Aktivierung des geschützten Inhibitors nicht ausreichend ist.

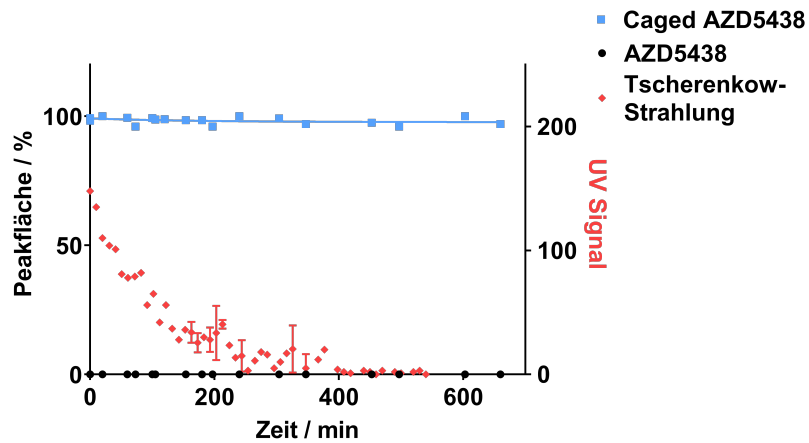


Abbildung 25: **Aktivierung des Modellsystems mit Tscherenkow-Strahlung aus ^{18}F .** Die Tscherenkow-Strahlung (rote Punkte) aus Kapitel 3.1 ist in Zusammenhang mit der Photolysereaktion von caged AZD5438 (blaue Linie), um AZD5438 (schwarz) zu erhalten, dargestellt. Alle Kurven enthalten die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche aller durchgeführten Experimente mit ^{18}F inklusiver Standardabweichung.

3.4.2 ⁶⁸Gallium

Wie ¹⁸F ist auch ⁶⁸Ga ein β^+ Strahler, der zu 87.7 % Positronen emittiert. Allerdings erzeugt der Zerfall von ⁶⁸Ga eine wesentlich höhere maximale Zerfallenergie von 1.9 MeV und eine mittlere von 0.84 MeV, die deutlich über dem Schwellenwert von 0.26 MeV für die Erzeugung von Tscherenkow-Strahlung liegt. Daher wurden frisch hergestellte ⁶⁸Ga-Proben im Bereich von 300 bis 900 MBq, was die maximal erreichbare Aktivität aus dem Gallium-Generator entsprach, untersucht. Die Konzentration an caged AZD5438 sank in allen Proben (Tabelle 10, Kapitel 6.5.2) bei der HPLC Analyse innerhalb von 148.8 Minuten auf etwa 75 % ab und erreichte darauf ein Plateau (Abbildung 26). Bei dem freien AZD5438 stieg sie jedoch nicht signifikant an (4 %). Vielmehr ergab die HPLC-Analyse ein recht komplexes Produktgemisch, was auf eine alternative Abbaureaktion durch entweder starke Tscherenkow-Bestrahlung, durch emittierte Positronen, durch radikalische Prozesse oder durch eine Kombination dieser Ursachen hindeutet. Da der freie Wirkstoff AZD5438 unter Einsatz von ⁶⁸Ga stabil blieb (Abbildung 24b), scheint sich nur caged AZD5438 teilweise zu zersetzen. Dadurch dass die Signalstärke der Tscherenkow-Strahlung auch in dem vergleichbaren Untersuchungszeitraum auf ein Minimum sinkt, also mit der Konzentrationsabnahme von caged AZD5438 korreliert, wird vermutet, dass die entstehende Tscherenkow-Strahlung für den Abbau von caged AZD5438 zuständig ist. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass zu Beginn der Experimente im Vergleich zu dem anderen β^+ Strahler ¹⁸F deutlich mehr Tscherenkow-Strahlung freigesetzt wird (148 Signale bei ¹⁸F und 10957 Signale bei ⁶⁸Ga, Abbildungen 25 und 26).

In ESR-Experimenten bei der Photolyse von caged AZD5438 konnte bereits ein radikalischer Reaktions-Prozess festgestellt werden (Kapitel 3.2.3, Abbildung 21). Um die teilweise Zersetzung des geschützten Inhibitors näher zu untersuchen, wurden weitere ESR-Experimente mit einem veränderten pH-Wert durchgeführt, da ⁶⁸Ga in 1 M HCl-Lösung eluiert wird und dementsprechend die Versuchsproben im sauren Medium vorlagen. Direkte ESR-Versuche unter Verwendung von ⁶⁸Ga konnten aufgrund der besonderen Anforderungen an die Handhabung der radioaktiven Proben nicht durchgeführt werden. Interessanterweise konnte im stark sauren Milieu sowohl beim freien als auch beim geschützten Inhibitor kein radikalischer Prozess festgestellt werden (Abbildung 27). Dies lässt vermuten, dass das im sauren Milieu vorliegende protonierte Molekül des caged AZD5438 gegenüber UV-Strahlung stabiler ist. Da dennoch eine Zersetzung in der HPLC zu sehen war, wird vermutet, dass diese direkt durch die emittierenden Positronen entsteht. Die Tscherenkow-Strahlung ist als

eine vergleichsweise schwache UV-Strahlung mit geringer Photonenausbeute bekannt und wird daher höchstwahrscheinlich nicht diese Zersetzung herbeiführen.¹¹⁴ Daher wurde als nächstes ein β^- -Strahler, das ^{90}Y , untersucht, um diese Hypothese näher zu untersuchen.

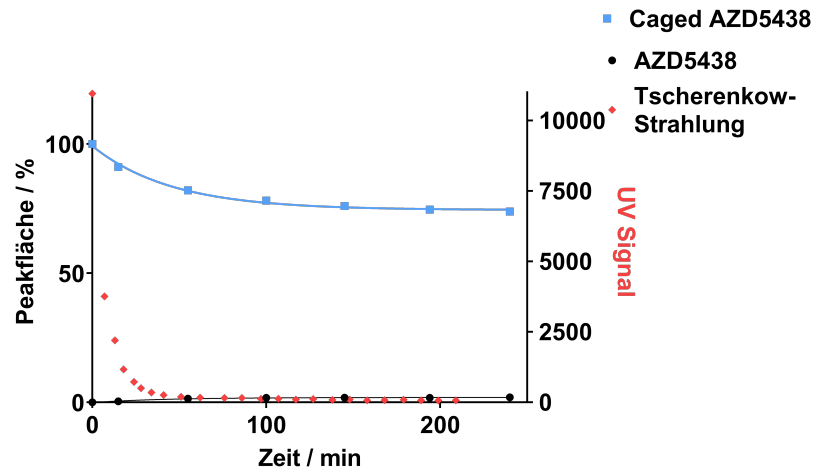


Abbildung 26: **Aktivierung des Modellsystems mit Tscherenkow-Strahlung aus ^{68}Ga .** Die Tscherenkow-Strahlung (rote Punkte) von Kapitel 3.1 ist in Zusammenhang mit der Photolysereaktion von caged AZD5438 (blaue Linie), um AZD5438 (schwarz) zu erhalten, dargestellt. Alle Kurven enthalten die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche aller durchgeführten Experimente mit ^{68}Ga inklusiver Standardabweichung.

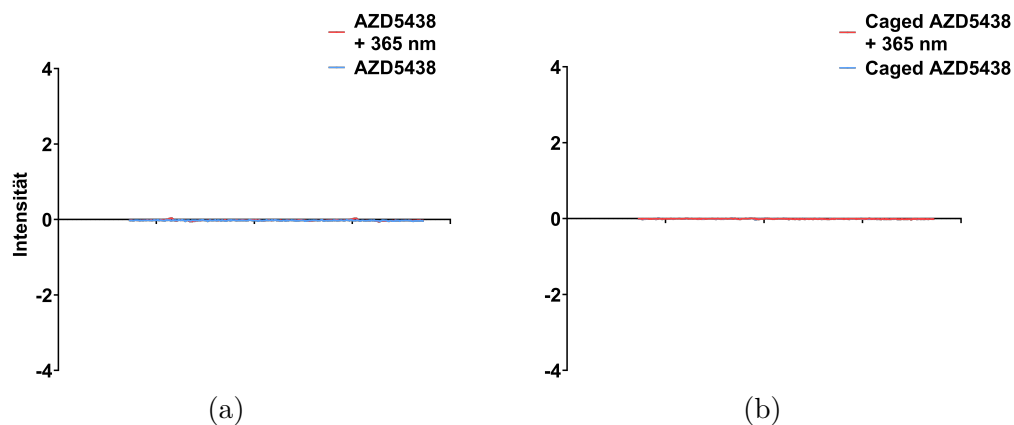


Abbildung 27: **Elektronenspinresonanz-Spektren (ESR)** der verschiedenen Proben mit (rot) und ohne (blau) Bestrahlung mit Licht (365 nm, 100 s, 37.5mW pro Well) **(a)** von AZD5438 in 1 M HCl **(b)** von caged AZD5438 in 1 M HCl. Als Positivprobe wurde der Photosensibilisator 1,4-Naphthoquinon eingesetzt.¹³⁹ Im Gegensatz zu der Positivprobe konnte weder bei AZD5438 noch bei caged AZD5438 mit und ohne Bestrahlung im stark sauren Milieu ein Vorhandensein ungepaarter Elektronen nachgewiesen werden. Die Graphen zeigen den Mittelwert dreier Versuche inklusive Standardabweichung an.

3.4.3 ⁹⁰Yttrium

Im Gegensatz zu ¹⁸F und ⁶⁸Ga, die als Positronenstrahler in der radiopharmazeutischen Diagnostik verwendet werden, wird ⁹⁰Y in der Strahlentherapie eingesetzt (Tabelle 6, Kapitel 2). Das Radionuklid ⁹⁰Y ist ein reiner β^- -Strahler mit einer mittleren Zerfallsenergie von 2.28 MeV und einer Halbwertszeit von 64 Stunden. Um einen direkten Vergleich mit den Experimenten mit ⁶⁸Gallium herstellen zu können, wurde die Aktivität von 419 MBq gewählt. Diese wurde aus dem Kernzerfall der Nuklide berechnet, sodass innerhalb eines gewählten Zeitraumes von 3 Stunden gleich viele Kerne zerfallen, was in der Produktion von Tscherenkow-Strahlung resultiert (Rechnung siehe Anhang, Aktivitätsrechnung, Kapitel 7.1). Außerdem entspricht diese verwendete Aktivität der des therapeutischen Einsatzes.¹³⁴

Die Proben von caged AZD5438, die mit ⁹⁰Y für 14 Tage inkubiert wurden, zeigten auch hier einen signifikanten Abbau der geschützten Verbindung DMNB-AZD5438 von insgesamt 63 %. Jedoch wurde erstmals eine deutliche Freisetzung von AZD5438 festgestellt. Innerhalb von 7 Tagen wurde 21 % aktiver Wirkstoff detektiert und dessen Konzentration blieb daraufhin konstant (Abbildung 28). 16 % des eingesetzten caged AZD5438 wurde weder umgesetzt noch zerstört. Diese Zersetzung von 63 % des geschützten Inhibitors lässt sich nicht durch die elektromagnetische Tscherenkow-Strahlung erklären. In den ESR-Experimenten im sauren Milieu aufgrund der 0.04 molaren HCL-Elutionslösung von ⁹⁰Y konnten wieder keine freien Radikale gezeigt werden (Abbildung 29). Somit könnten analog zu der vorherigen Hypothese im Kontext von ⁶⁸Gallium die Positronen die Elektronen für eine teilweise Zersetzung des geschützten Inhibitors verantwortlich sein. Beim Zerfall von ⁹⁰Y war die freiwerdende Energie noch größer als beim ⁶⁸Ga (E_{max} 2.28 statt 1.9 MeV), sodass vielleicht durch diese Energie caged AZD5438 teilweise bei den beiden Strahlern zersetzt wird. Interessant wären weitere Versuche mit β^- -Nukliden mit einem niedrigeren E_{max} als Yttrium, wie zum Beispiel ³²P. Jedoch ist dies praktisch kaum möglich, wegen dessen langer Halbwertszeit von über 14 Tagen. Zusätzlich ist auch nicht ganz auszuschließen, dass nicht doch die Tscherenkow-Strahlung diese Zersetzung verursacht.

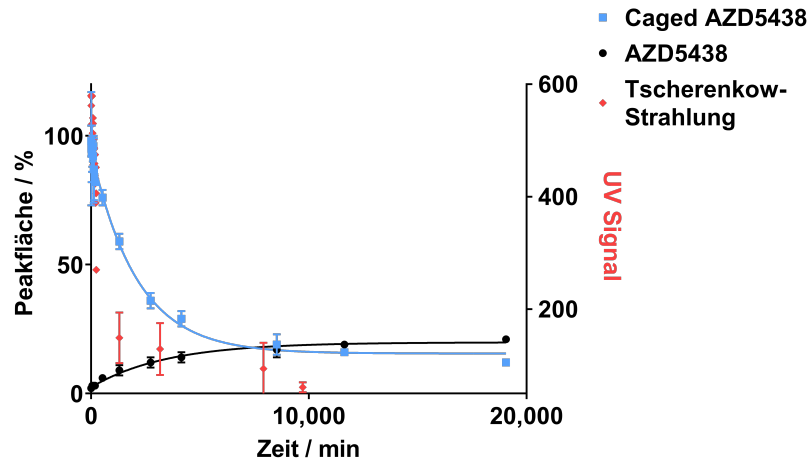


Abbildung 28: **Aktivierung des Modellsystems mit Tscherenkow-Strahlung aus ^{90}Y .** Die Tscherenkow-Strahlung (rote Punkte) von Kapitel 3.1 ist in Zusammenhang mit der Photolysereaktion von caged AZD5438 (blaue Linie), um AZD5438 (schwarz) zu erhalten, dargestellt. Alle Kurven enthalten die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche aller durchgeführten Experimente mit ^{90}Y inklusiver Standardabweichung.

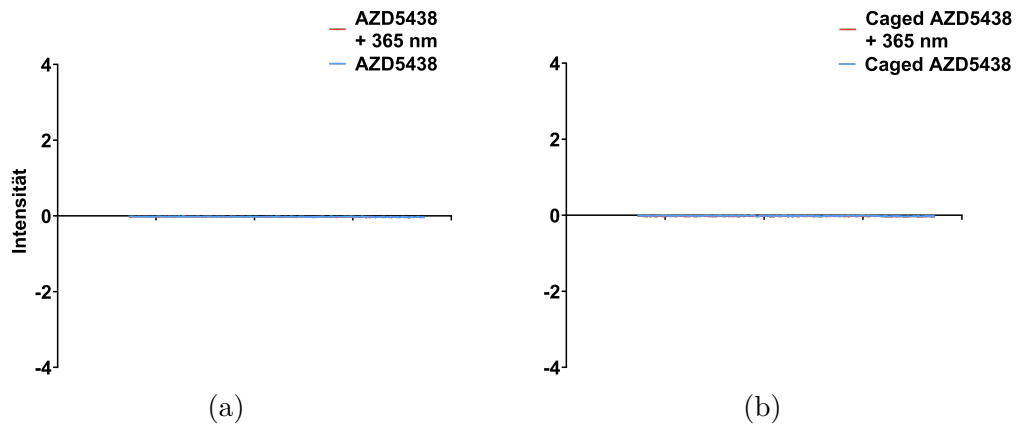


Abbildung 29: **Elektronenspinresonanz-Spektren (ESR)** der verschiedenen Proben mit (rot) und ohne (blau) Bestrahlung mit Licht (365 nm, 100 s, 37.5 mW pro Well) **(a)** von AZD5438 in 0.04 M HCl **(b)** von caged AZD5438 in 0.04 M HCl. Als Positivprobe wurde der Photosensibilisator 1,4-Naphthoquinon eingesetzt.¹³⁹ Im Gegensatz zu der Positivprobe konnte weder bei AZD5438 noch bei caged AZD5438 mit und ohne Bestrahlung im schwach sauren Milieu ein Vorhandensein ungepaarter Elektronen nachgewiesen werden. Die Graphen zeigen je den Mittelwert dreier Versuche inklusive Standardabweichung an.

4 Zusammenfassung und Fazit

Photopharmakologische Konzepte stellen vielversprechende Möglichkeiten zu gezielten Therapieanwendungen dar. Durch einen anhand von Licht kontrollierten selektiven Einsatz können systemische Nebenwirkungen und auch mögliche Resistenzbildungen verhindert werden. Um den limitierten Einsatz von Licht bestimmter Wellenlängen und den damit eingeschränkten Wirkungsgrad zu überwinden, bedarf es an weiterführender Forschungsarbeit. Da die meisten photopharmakologischen Wirkstoffe im Wellenlängenbereich von 300-550 nm aktiviert werden und diese Wellenlänge nicht tief in den menschlichen Körper penetrieren kann, können derartige Arzneimittel nicht ohne invasivem Eingriff in das tiefere Gewebe eingesetzt werden.

In dieser Arbeit wurde daher zum einen der mögliche Einsatz von Tscherenkow-Strahlung als Lichtquelle untersucht. Diese ist eine elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 250-600 nm, die häufig als Nebenprodukt beim Zerfall radioaktiver Nuklide freigesetzt wird.

Radioaktive Nuklide werden häufig in der Radiotherapie eingesetzt. Neben der äußerlichen Bestrahlung gibt es auch bereits Therapien für eine lokale Bestrahlung im Körper. Ein Beispiel ist die Radiosynoviorthese, die bei entzündlichen Gelenkerkrankungen eingesetzt wird. Hier wird das Radionuklid mit Hilfe einer Kanüle direkt in den betroffenen Gelenkraum gespritzt. So können die entzündeten Schleimhautbereiche bestrahlt werden. Das umliegende Gewebe wird dabei nicht beschädigt, da die verwendeten Betastrahler eine maximale Reichweite von wenigen Millimetern aufweisen.¹⁴⁰ Ein anderes Beispiel ist die selektive interne Strahlentherapie (SIRT) bei Lebertumoren. Hier werden kleine radioaktive Mikrosphären mit enthaltenem ^{90}Y über einen Katheter in der Leberarterie in das Tumorgewebe der Leber geführt. Die Mikrosphären werden mit dem Blutstrom direkt in das gut durchblutete Tumorgewebe weitertransportiert, wo das ^{90}Y eine β^- -Strahlung mit bis zu 11 Millimeter Reichweite mit hoher lokaler Strahlenwirkung aussendet.¹⁴¹

Eine Aktivierung photopharmakologischer Systeme anhand der Radionuklide, die Tscherenkow-Strahlung aussenden, könnte neue, vielseitige Therapien ermöglichen. Aufgrund der zeitlich und räumlich kontrollierten Anwendung könnte das Nebenwirkungs- und Resistenzrisiko verringert und die Dosisgabe des Arzneistoffes für eine besonders effektive Therapie erhöht werden. Zusätzlich kann ein additiver Wirkungseffekt durch eine Kombination der Strahlentherapie mit der Pharmakotherapie erreicht werden. So könnte bei einem Einsatz von Radionukliden zum einen die Betastrahlung die jeweilige Krankheit bekämpfen und zum anderen den bereits in dem Gewebe vorliegenden inaktiven Wirkstoff

des pharmakologischen Konzeptes lokal aktivieren. Diese Anwendung könnte es ermöglichen, die benötigte Dosis an Strahlung bei gleichem Effekt zu verringern, sodass neben dem Nebenwirkungsprofil auch die notwendigen Sicherheitsvorkehrungen für Patient und klinischem Personal reduzierbar werden. Zusätzlich könnten auch die Kosten der Sicherheits- und Materialvorkehrungen bei Einsatz entsprechender Therapien eingespart werden.

Für den Nachweis entstehender Tscherenkow-Strahlung aus dem Kernzerfall von Radionukliden wurden in dieser Arbeit die für diagnostische Zwecke verwendeten β^+ -Strahler ^{18}F und ^{68}Ga und das ^{90}Y als therapeutischer β^- -Strahler untersucht. Es konnte bei dem Zerfall dieser Radionuklide in therapeutisch relevanten Konzentrationsbereichen Tscherenkow-Strahlung experimentell nachgewiesen werden, jedoch bei ^{18}F kaum mehr als durch sekundäre kosmische Strahlung auf der Erde bereits vorhanden ist. Bei ^{68}Ga und ^{90}Y konnte unterdessen eine deutliche Tscherenkow-Signalstärke, welche beim weiteren Kernzerfall stetig abnimmt, detektiert werden. Diese Unterschiede in der Signalstärke hängen mit der Kernzerfallsenergie der Nuklide zusammen. ^{18}F hat dabei mit 0.25 MeV eine deutlich niedrigere mittlere Zerfallsenergie als ^{68}Ga mit 0.84 MeV und ^{90}Y mit 0.93 MeV.

Zur Überprüfung, ob die Tscherenkow-Strahlung in der Lage ist, ein photo-pharmakologisches Prodrug-Konzept zu aktivieren, wurde der photoresponsive CDK2-Inhibitor DMNB-AZD5438 als Modellsystem in Zusammenhang mit den Radionukliden ^{18}F , ^{68}Ga und ^{90}Y untersucht. Die Modellversuche wurden im möglichst wässrigen Medium durchgeführt. Wie in Tabelle 3 in Kapitel 1.3.1 aufgeführt ist, unterscheiden sich die Brechungsindices der meisten Körpermedien nicht wesentlich voneinander, sodass die Ergebnisse gut übertragen werden können.

In Korrelation zu der geringen Tscherenkow-Strahlung, die durch den β^+ -Emitter ^{18}F entsteht, konnte für DMNB-AZD5438 hier keine Freisetzung des Inhibitors AZD5438 festgestellt werden. Die Inkubation von DMNB-AZD5438 mit dem β^+ -Emitter ^{68}Ga führte zu einer sehr geringen Freisetzung des Arzneistoffes von 4 %. Dem gegenüber wurden 21 % DMNB-AZD5438 wurde zu einem Produktgemisch zersetzt. Bei Zugabe von ^{90}Y zum caged AZD5438 konnte 21 % an AZD5438 ermittelt werden und 63 % an caged AZD5438 wurde zersetzt. Da bereits bei der Photoaktivierung des Modellsystems mit UV-Bestrahlung bei 365 nm ein radikalischer Abbau an caged AZD5438 von 25 % festgestellt werden konnte, wurden ESR-Experimente zur Untersuchung auf vorliegende freie Radikale durchgeführt. Im Gegensatz zu AZD5438 konnte bei Bestrahlung von Lösungen bei DMNB-AZD5438 tatsächlich radikalische Reaktionen ermittelt werden. Nachfolgende Versuche mit den Quenchern Ascorbinsäure und Gentsin-

säure zeigten, dass Ascorbinsäure die Photoaktivierung sowie den radikalischen Abbau nicht verhindert. Zusätzlich verlangsamte Gentsinsäure konzentrationsabhängig die Photoaktivierung. Dadurch dass die ESR-Experimente nicht mit den enthaltenen radioaktiven Komponenten durchgeführt werden konnten, wurden nur dessen saure Medien in Zusammenhang mit dem Wirkstoff und dessen geschützter Verbindung untersucht. Hier konnte in 1 M HCl von ^{68}Ga und in 0.04 M HCl von ^{90}Y keine Radikale mehr detektiert werden. Schlussfolgernd ist caged AZD5438 im sauren Medium gegenüber UV-Betastrahlung stabiler und dessen Abbau, der bei den Experimenten mit ^{68}Ga und ^{90}Y festgestellt wurde, erfolgt voraussichtlich durch die vorliegenden Positronen beziehungsweise Elektronen.

Auf Grundlage dieser Modell-Studie sollte in weiteren Untersuchungen ein optimierteres Design von photoresponsiven Verbindungen, welche stabil gegenüber der Betastrahlung ist, geprüft werden. Dann könnte die durch therapeutische Radiopharmaka induzierte Tscherenkow-Strahlung eine Möglichkeit für eine synergetische Kombination von Strahlentherapie und gezielter Photopharmakologie in zukünftigen Anwendungen bieten.

5 Ausblick

Zur Fortsetzung dieses Projektes gibt es verschiedene Ansätze. Als erstes stellt sich wegen der teils geglückten Freisetzung von AZD5438 mit dem Radionuklid ^{90}Y die Frage, ob anhand von Zellversuchen eine Inhibition gezeigt werden kann. Diese biologischen Testungen sollen untersuchen, ob in der Kombination geschützter Arzneistoff und ^{90}Y eine stärkere Inhibition von Zellen erreicht werden als nur mit ^{90}Y oder dem freien Arzneistoff beziehungsweise mit dem geschützten Arzneistoff nach UV-Bestrahlung.

Zudem können noch weitere Quencher untersucht werden, um das Modellsystem zu stabilisieren. Diese sollten den radikalischen Mechanismus des AZD5438 verhindern, ohne das photochemisch vermittelte Uncaging negativ zu beeinflussen. Blois *et al.* untersuchten 2012 verschiedene Quencher, um die Radiolyse von ^{111}In und ^{177}Lu zu reduzieren. Demnach bietet sich besonders die Kombination von Ascorbinsäure, Gentisinsäure und Se-Methionin oder Melatonin, Histidin und Methionin an. Auch Tocopherole, oder K-Vitamine wie Menadion (K3), Menachinon (K2) und Phyllochinon (K1) besitzen gute Quenchereigenschaften, sind jedoch kaum im wässrigen Medium löslich. Nach Blois *et al.* entstehen außerdem bereits durch die Radiolyse Radikale von Wassermolekülen eines wässrigen Mediums, weswegen ohnehin eine Stabilisierung der geschützten Verbindung von Vorteil ist.¹³⁶

Darüber hinaus kann es sinnvoll sein, andere Modellsysteme zu untersuchen. Photochemische Untersuchungen zu caged AZD5438 zeigte bereits in den Vorversuchen radikalisches Verhalten und eine damit zusammenhängende teilweise Zersetzung des geschützten Arzneistoffes. Vielleicht sind andere Modellsysteme stabiler und können somit ohne Nebenprodukte selektiver mit Tscherenkow-Strahlung aktiviert werden. Hier könnten auch Photoschalter untersucht werden. Die Photostatine beispielsweise scheinen sehr erfolgversprechend. Sie hemmen Mikrotubuli und sind damit entscheidend für die zellbiologische Forschung und die Krebstherapie.¹⁴² Borowiak *et al.* veröffentlichten 2015 Ergebnisse mit Analoga zu Combretastatin A-4(CA4) wie das PST-1 (Abbildung 30), welche bis zu 250 mal aktiver im blauen Licht waren. Ihre Aktivierungswellenlänge liegt mit 390-430 nm genau im Bereich der Tscherenkow-Strahlung. Außerdem sind CA4 - Derivate wie das Fosbretabulin und das Ombrabulin bereits in der Phase III der klinischen Studien.¹⁴²

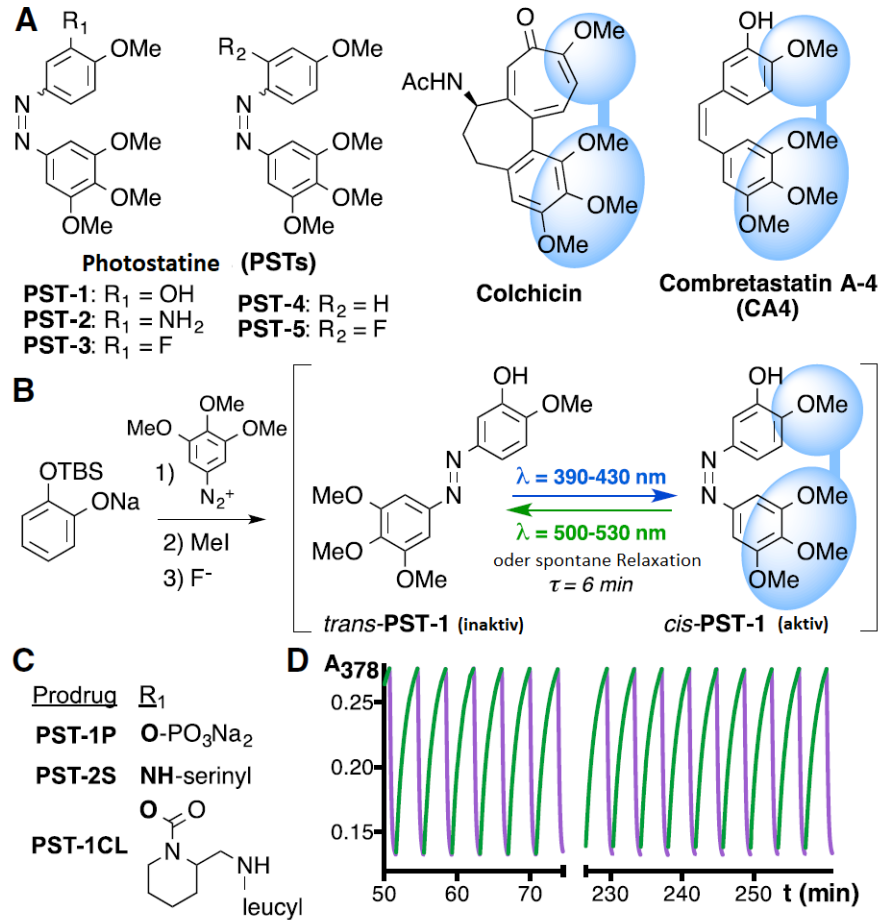


Abbildung 30: Darstellung der entwickelten Photostatine von Borowiak *et al.* 2015.¹⁴² Das Photostatin (PST)-1 zeigt bei Photoschaltung durch Licht bei 390-430 nm und die damit verbundene Aktivierung eine 250 mal höhere Aktivität. Außerdem weist es eine sehr gute Photostabilität und eine schnelle reversible Photoschaltung auf.

Der Arzneistoff AZD5438 kann auch mit anderen Schutzgruppen untersucht werden. Zum Beispiel ist die BODIPY-Schutzgruppe (*meso*-methyl-bor-dipyrrromethenyl und *meso*-phenyl-bor-dipyrrromethenyl) bereits sehr häufig in Zusammenhang mit einer Photoaktivierung untersucht worden. Abbildung 31 zeigt das AZD5438 mit einer der BODIPY-Schutzgruppen. Da diese jedoch seine Aktivierungswellenlänge bei höheren Wellenlängen von 525/550 nm besitzt, um das biooptische Fenster zu umgehen, liegt diese kaum noch im Bereich der Tscherenkow-Strahlung. Daher ist es fraglich, ob die Tscherenkow-Strahlung für eine Abspaltung dieser Schutzgruppe ausreichen würde.

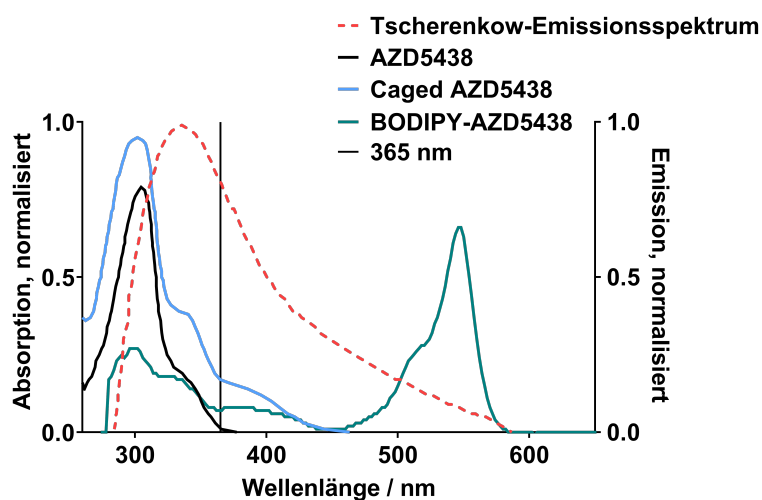


Abbildung 31: **UV-Spektren** der photoaktiven Verbindungen, AZD5438 (schwarz), caged AZD5438 (blau) und BODIPY-AZD5438 (grün) im Vergleich zu dem Emissionsspektrum der Tscherenkow-Strahlung (rot gestrichelt). Die Aktivierungswellenlänge 365 nm von caged AZD5438 ist als schwarze Linie ebenfalls dargestellt.

6 Experimentaltteil

6.1 *Molecular Modelling*

Das molekulare Modelling wurde auf einem Dell-System mit einem Intel Xeon E5620 mit 2.40 GHz, 24 GB RAM und einem 64-Bit Windows 7 Enterprise mit der Software Schrödinger Maestro 11.0, LLC, New York, USA, generiert. Die Struktur (pdb: 4FKO), eine kristalline Struktur von CDK2 mit dem Inhibitor Thiazolpyrimidin, wurde aus der *RCSB Protein Data Bank* importiert und mit dem Protein Preparation Wizard bearbeitet. Mit dem *Prime*-Programm, Version 4.6 von Schrödinger, wurden fehlende Seitenketten oder Schleifen hinzugefügt. Wassermoleküle ohne feste Bindungen und andere Moleküle abgesehen von dem Liganden wurden entfernt. Die Struktur wurde vorprozessiert und mit PROPKA bei einem pH-Wert von 7.0 optimiert und daraufhin anhand von dem OPLS3-Kraftfeld minimiert.

Mit Hilfe der Rezeptor *Grid Generation* wird der ursprünglich in dem Protein liegende Ligand entfernt und der Van der Waals-Radius auf Faktor 1.0 skaliert, um eine Bewegung des Rezeptors und des Liganden zu modellieren, da *Glide* außer den optionalen Hydroxyl- und Thiol-Rotationen keine Rezeptorflexibilität beim Docking zulässt. Der zu untersuchende Ligand, AZD5438 beziehungsweise DMNB-AZD5438, wurden mit LigPrep Version 4.0015 von Schrödinger bearbeitet und eingefügt. Für die Ligandenminimierung wurde das OPLS3-Kraftfeld, Epik Version 3.8015, genutzt. Zur Visualisierung wurde das Superpositions-Tool verwendet, um die Struktur von des Arzneistoffes auszurichten.

6.2 Reagenzien und Ausgangsstoffe

Nuklide

^{90}Y wurde von der Firma f-con Eckert & Ziegler (Strahlen- und Medizintechnik AG, Berlin) erworben und ^{18}F von Life Radiopharma f-Con GmbH. Diese Substanzen wurden direkt ohne weitere Reinigung verwendet. ^{68}Ga wurde direkt in der Nuklearmedizin im UKSH Kiel mit Hilfe eines ^{68}Ga -Gallium Generators generiert. Die Ausgangssubstanzen hierfür wurden ebenfalls bei der Firma Eckert & Ziegler gekauft.

AZD5438

Der Inhibitor AZD5438 ist bei MedChem-Express USA — MedChemExpress LLC 1 Deer Park Dr, Suite Q, Monmouth Junction, NJ 08852, USA erhältlich. Vor weiterer Verwendung wurde der Compound mit Hilfe von RP Flash Chromatographie (Wasser/Methanol, mit Gradient) gereinigt und charakterisiert (100 % HPLC-Reinheit).

Weitere

Alle anderen Reagenzien und Ausgangsstoffe wurden von folgenden Herstellern erworben: abcr GmbH, Carl Roth GmbH, Fluka und Sidma-Aldrich Chemie GmbH, Merck Millipore, TCI Deutschland GmbH, ThermoFisher Scientific und VWR International GmbH.

6.3 Synthese

Caged AZD5438

N-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)-4-(1-isopropyl-2-methyl-1H-imidazol-5-yl)-N-(4-(methylsulfonyl) phenyl)pyrimidin-2-amin

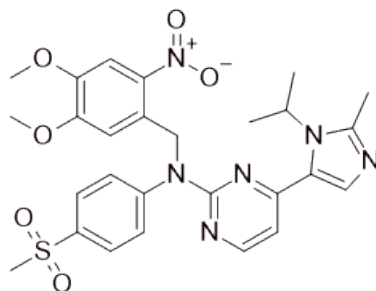


Abbildung 32: Molekülstruktur des caged AZD5438.

Caged AZD5438 (Abbildung 32) wurde nach dem allgemeinen Verfahren für das Caging von N-Phenylpyrimidin-2-aminen mit Benzylbromiden aus AZD5438 (100 mg, 0.27 mmol) und 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylbromid (82 mg, 0.30 mmol) synthetisiert. Natriumhydrid (1.2 Äquiv.) wurde in 5 ml trockenem DMF unter Argonatmosphäre gelöst. Nach Abkühlung auf 0°C wurde das entsprechende N-Phenylpyrimidin-2-amin (1.0 Äquiv.) in 3 ml trockenem DMF gelöst und tropfenweise zur Reaktion hinzugefügt. Nach 1 h wurde die Reaktion auf -35°C abgekühlt und das entsprechende Benzylbromid (1.1 Äquiv.), gelöst in 3 ml trockenem DMF, tropfenweise zugegeben. Nach dem Rühren bei -35°C für 1 h wurde die Reaktion durch langsame Zugabe von H₂O gequenchet. Nach 1 h wurde die Reaktion filtriert. Die Reinigung erfolgte durch RP-Flash-Chromatographie mit einem Gradienten aus Methanol und Wasser, um N-(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)-4-(1-isopropyl-2-methyl-1H-imidazol-5-yl)-N-(4-(methylsulfonyl)phenyl)pyrimidin-2-amin als hellgelben Feststoff zu erhalten (100 % HPLC-Reinheit).

Ausbeute: 84 mg (0.15 mmol, 50 %)

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆): d = 1,05 (d, 3JHH = 7,1 Hz, 6H), 2,39 (s, 3H), 3,21 (s, 3H), 3,66 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 5,32 (sept, 3JHH = 7,0 Hz, 1H), 5,65 (s, 2H), 6,93 (s, 1H), 7,20 (d, 3JHH = 5.3 Hz, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,73 (d, 3JHH = 8.8 Hz, 2H), 7,73 (s, 1H), 7,91 (d, 3JHH = 8.8 Hz, 2H), 8,38 (d, 3JHH = 5.3 Hz, 1H) ppm.

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-d₆): d = 16.1, 20.6, 43.5, 46.9, 51.4, 56.0, 56.1, 108.6, 109.8, 109.8, 126.6, 127.9, 128.6, 128.8, 133.0, 136.9, 139.8, 147.4, 148.4, 148.8, 153.3, 157.8, 157.9, 160.7 ppm.

HRMS (ESI): m/z = 567.20204 [M+H]⁺ (calc. m/z = 567.20203)

6.4 Analytik

Bestrahlung

Für die Bestrahlung der Proben wurde als LED-Quelle die 16x Nichia NC-SU276A U365 von Sahlmann Photochemical Solutions verwendet. Es wurde die Wellenlänge 365 nm eingesetzt und eine Intensität von 5 % gewählt, was bei den 96er Wellplatten 37.5 mW pro Well entspricht.

HPLC

Zur Analyse radioaktiver Proben mit ¹⁸F und ⁶⁸Ga, wurde ein Agilent 1100 Series Instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) mit einem DAD Detektor und Säulentemperierung bei 25°C hinter einer Abschirmung verwendet. Als Säule wurde die Chromolith® SemiPrep RP18 (100 · 4.6 mm, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) eingesetzt. Für die Proben mit ⁹⁰Y wurde ein Beckmann System Gold 126 mit quaternärer Pumpe, UV-Detektor Gold 166 und als Säule eine Chromolith HR 4.6 x 100 mm benutzt. Das Injektionsvolumen betrug je 5 µl und das Fließmittel war ein Gradient von Acetonitril und Wasser mit je 0.1 % (v/v) Ameisensäure und einer Flußrate von 1.5 ml/min. Zur Analyse wurde die UV-Detektion bei 296 nm verwendet.

Die Versuche ohne Radioaktivität wurden ebenfalls an einem Agilent 1100 Series Gerät mit einer Chromolith® SemiPrep RP18 (100 · 4.6 mm) Säule und Säulentemperierung auf 25°C, einem Injektionsvolumen von 5 µl und UV-Dektion bei 296 nm durchgeführt. Jedoch wurde als Fließmittel ein Kaliumhydrogenphosphat-Puffer (0.01 M, pH = 2.3)/ Acetonitril-Gemisch eingesetzt.

NMR

Für NMR-Spektren wurde das Gerät Bruker Avance III 300, eingestellt auf 298 Kelvin, verwendet. Die ^1H -Messungen wurden bei 300 MHz und die ^{13}C -Messungen bei einer Auflösung von 75 MHz durchgeführt. Für die jeweilige Kalibrierung und als interner Standard wurde das deuterierte Lösungsmittel DMSO- d_6 genutzt. Dessen Signale liegen im ^1H -Spektrum bei 2.50 ppm und beim ^{13}C -Spektrum bei 39.52 ppm.

MS

Für Untersuchungen an der Massenspektrometrie wurde die HR-MS (High-resolution mass spectrometry) von Thermo Fischer Q Exactive Plus MS, Hybrid Quadrupol-Orbitrap mit Elektronenspryionisation (ESI) eingesetzt.

ESR

Bei der Elektronenspinresonanz (ESR) kann das Vorhandensein ungepaarter Elektronen untersucht werden. Hierbei befindet sich die Probe in einem Magnetfeld und wird mit einer Hochfrequenz von etwa 50 MHz untersucht. Durch das Magnetfeld werden die Energieniveaus der Elektronen aufgespalten und es kommt zu einer Wechselwirkung zwischen der Hochfrequenzschwingung und dem Elektronenspin der Probe. Es entsteht ein Messsignal, welches die absorbierte Energie der Hochfrequenz anzeigt.

Die Proben wurden im wässrigen Medium mit 20 % DMSO und einer 50 μM Konzentration gemessen. Für die Experimente wird EDTA-Wasser versetzt mit 2.5 mM TMT-H (1-Hydroxy-4-isobutyramido-2,2,6,6-tetramethylpiperidin) verwendet, um eventuell in wässriger Lösungen enthaltene Ionen zu komplexieren, damit diese die Messung nicht stören können. Des Weiteren wurde der Photosensibilisator 1,4-Naphthoquinon als Positivprobe verwendet.¹³⁹

Da bei den Versuchen mit den Radionukliden unterschiedlich stark saure Lösungen vorlagen, wurden auch hier dementsprechende saure Medien gewählt, damit die Moleküle gleich protoniert wurden und ein direkter Vergleich möglich war. $^{68}\text{Gallium}$ wurde aus einer 1 molaren HCl Lösung generiert und $^{90}\text{Yttrium}$ aus einer 0.04 molaren. Die Proben wurden mit Licht von 365 nm 100 Sekunden lang (37.5 mW pro Well) bestrahlt. Es wurden je drei Wiederholungen der Experimente durchgeführt.

Quencher-Experimente

Als Quencher wurden Ascorbinsäure und Gentisinsäure im Messkonzentrationsbereich nach Blois *et al.* (10, 35, 50 mM) verwendet (Tabelle 7).¹³⁶ Zusätzlich enthielten die untersuchten Proben wieder 50 μ M caged AZD5438 beziehungsweise AZD5438 und 20 % DMSO. Die Proben wurden nach Bestrahlung mit HPLC ausgewertet.

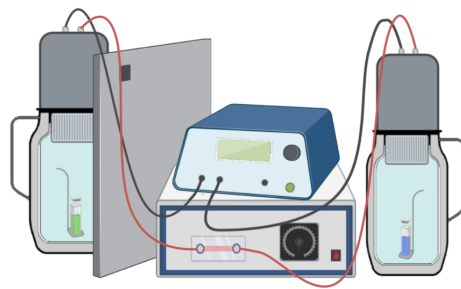
Ascorbinsäure		Gentisinsäure	
%	mM	%	mM
0.1	5.7	0.1	6.5
1.0	56.8	0.5	32.4
5.0	283.9	1.0	64.9
10.0	567.8		

Tabelle 7: Verwendete Konzentrationsbereiche an den Quenchern Ascorbinsäure und Gentisinsäure.

6.5 Nuklidexperimente

6.5.1 Kamiokanne

Die Kamiokanne ist eine vereinfachte, stark verkleinerte Form der Super-Kamiokande. Sie wurde an der Universität von Mainz entwickelt und in einem Astropartikelprojekt von "Netzwerk Teilchenwelt" von der Universität von Göttingen und der "Deutschen Elektronen-Synchrotron" DESY weiter spezifiziert, um Myonen aus der sekundären kosmischen Strahlung mit Hilfe der von ihnen erzeugten Tscherenkow-Strahlung untersuchen zu können.^{143,144} Sie besteht aus zwei herkömmlichen Thermoskannen mit aufgesetzten Photomultiplier-Röhren (PMT) und einer internen Hochleistungsspannung. Myonen, die sich im wässrigen Medium schneller als Licht bewegen, senden bei Auftreffen auf die Wassermoleküle Photonen aus, die von den verspiegelten Thermoskannenwänden reflektieren und auf den aufgeschraubten PMT treffen. In dem PMT befindet sich die Photokathode, in der das Photon seine Energie auf ein Elektron überträgt. Durch diesen Photoeffekt wird das Lichtsignal in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches gemessen werden kann.¹⁴⁴ Die Kamiokanne wird in Bildungseinrichtungen zum Nachweis sekundärer kosmischer Strahlung eingesetzt. Wenn die Kamiokanne Tscherenkow-Strahlung von Myonen nachweisen kann, sollte sie dementsprechend Tscherenkow-Strahlung, die von Radionukliden erzeugt wird, detektieren. Für die Experimente dieser Arbeit wurde ein durch die erforderliche Aktivität definiertes Volumen der radioaktiven Probe in eine Quarzküvette gefüllt und mit destilliertem Wasser auf 3 ml aufgefüllt. Die gut geschlossene Küvette wurde daraufhin in eine mit Wasser gefüllte Thermoskanne gegeben und mit dem PMT verschlossen, sodass kein Licht die Messung stören konnte. In die andere Thermoskanne wurde als Nullmessung, um eingehende Signale der sekundären kosmischen Strahlung von den eigenen Werten abziehen zu können, eine nur mit Wasser gefüllte Küvette gegeben. Die Kamiokanne befand sich dabei aus Sicherheitsgründen hinter einer Bleiabschirmung. Es wurden Quarzküvetten verwendet, damit die erwartete Tscherenkowstrahlung im Wellenlängenbereich von 250-600 nm nicht vom Material absorbiert wird. Vor der Messung wurde die Sensitivität der Signaldetektion des Blindwertes so eingestellt, dass gerade noch Signale der eingehenden Myonen ermittelt werden konnten. Dieser Schwellenwert betrug zwischen 2.60 und 3.50 mV. Bei den Tscherenkow-Strahlungs-Messungen wurden die eingehenden Signale in zehn minütigen Intervallen aufgenommen. Der angepasste Aufbau der Kamiokanne im Labor ist schematisch in Abbildung 33a dargestellt.



(a)



(b)

Abbildung 33: **Kamiokanne** (a) Schematische Darstellung. Die komplett mit Wasser gefüllten Thermoskannen enthalten je einen Halter mit geschlossener Quarzküvette. Die grüne Probe stellt die radioaktive Lösung dar und befindet sich daher hinter einer Bleiwand. Die Kanne mit enthaltener blauer Lösung ist die Negativkontrolle. Auf den Kannen befinden sich die Photomultiplier, welche an einer internen Hochleistungsspannung angeschlossen sind. Das Schema wurde mit BioRender.com erstellt. (b) Kamiokanneaufbau als Foto.

6.5.2 Aktivierung

¹⁸F Fluor

Caged AZD5438 wurde mit ¹⁸F und ¹⁸FDG mit den Aktivitäten von 20-300 MBq/ml, welche denen der Radiotherapie entsprechen, versetzt.¹³³ Da caged AZD5438 eine geringe Löslichkeit in Wasser aufweist, wurde Dimethylsulfoxid oder auch Methanol als Lösungsmittel verwendet. Daraufhin wurde die jeweilige Probe in 15-minütigen Abständen bis zu 12 Stunden mittels HPLC-Analyse untersucht (Tabelle 8). Nach Abklingen der Radioaktivität wurden die Proben als Positivproben mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm mit einer Intensität von 5 % bestrahlt wodurch der Wirkstoff AZD5438 freigesetzt wurde.

Versuch	Radioaktivität MBq	Lösungsmittel	Volumen ml	Wirkstoffkonzentration µM
1	20	10 % DMSO in Wasser	1.0	50
2	200	10 % DMSO in Wasser	1.0	50
3	150	10 % DMSO in Wasser	1.0	50
4	107	50 % MeOH in Wasser	0.4	125
5	120	50 % MeOH in Wasser	0.4	125

Tabelle 8: **Versuche aus Aktivierungsversuchen mit caged AZD5438 unter Verwendung von ¹⁸F und ¹⁸FDG.** Als Lösungsvermittler wurde entweder DMSO oder MeOH zugesetzt. Jede Probe wurde in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Diese Versuche wurden von Alexander Döbber durchgeführt.

⁶⁸Gallium

Angesichts seiner kurzen Halbwertszeit wurde ⁶⁸Ga vor Ort im Labor erzeugt und konnte direkt aus seinem Ausgangsisotop ⁶⁸Germanium mit 1 M HCl (⁶⁸Gallium-Generator) eluiert werden. 900 MBq war dabei die höchste mögliche Aktivität, die eluiert werden konnte. In den Versuchen 1-6 (Tabelle 9) wurde jeweils 50 µM geschützte Verbindung und 20 % DMSO als Lösungsvermittler eingesetzt. Aufgrund der durch das Eluieren bedingten sauren Lösung wurden Versuche mit einem Puffer für das Erreichen eines physiologischen pH-Wertes hinzugefügt (Versuch 3 mit Ammoniumacetat und Versuch 4 mit HEPES-Lösung). In Versuch 5 wurde das Volumen verdoppelt, damit die durch die β-Strahlung ausgehenden Teilchen im wässrigen Medium eine höhere Chance zur Entwicklung der Tscherenkow-Strahlung haben. Versuch 6 wurde als Negativprobe mit ⁶⁹Ga durchgeführt, welches nicht radioaktiv ist. Da alle 6 Versuche das gleiche Ergebnis zeigten, wurden diese in Abbildung 26 in Kapitel 3.4.2 zusammengefasst.

Versuch	Radioaktivität MBq	Lösungsmittel	Volumen ml	Wirkstoff- konzentration µM
1	300	20 % DMSO in 1 M HCl	1.25	50
2	900	20 % DMSO in 1 M HCl	1.25	50
3	900	20 % DMSO 1 M HCl mit 2 M NH ₄ Ac	1.25	50
4	900	20 % DMSO 1 M HCl mit 5 M HEPES	1.25	50
5	900	20 % DMSO 1 M HCl	3.00	50
6	/	20 % DMSO 1 M HCl und ⁶⁹ Ga	1.25	50

Tabelle 9: **Inkubation von caged AZD5438 mit dem β⁺Strahler ⁶⁸Ga unter verschiedenen Bedingungen.** In den Proben 1 und 2 wurden unterschiedliche Aktivitäten untersucht. Aufgrund des sauren Milieus wurde in Probe 3 und 4 der saure pH-Wert mit Ammoniumacetat und HEPES gepuffert. Bei Probe 5 wurde das Probenvolumen verdoppelt. Als Negativkontrolle wurde eine Lösung des nicht-radioaktiven ⁶⁹Ga verwendet (Probe 6). Jede Probe wurde drei mal analysiert. Als Positivkontrollen wurden die Proben 1-6 nach der Inkubation mit ⁶⁸Ga mit UV-Licht bestrahlt, was eine Freisetzung von AZD5438 verursachte.

⁹⁰Yttrium

Für die Versuche mit ⁹⁰Y wurde 419 MBq bei ansonsten gleichen Parametern wie bei den vorherigen Nuklid-Experimenten eingesetzt (Tabelle 10). Der therapeutische Einsatz liegt bei 150 - 370 MBq/ml.¹³⁴ Auch hier wurde in 15-minütigen Abständen bis zu 14 Tage lang gemessen. Davon ausgenommen waren die Nächte und das Wochenende.

Versuch	Radioaktivität MBq	Lösungsmittel	Volumen ml	Wirkstoff- konzentration µM
1	419	20 % DMSO in 0.04 M HCl	1.25	50
2	/	20 % DMSO in 0.04 M HCl	1.25	50

Tabelle 10: **Aktivierung von caged AZD5438 nach Inkubation mit dem β^- -Strahler ⁹⁰Y.** Es wurden je drei unabhängige Versuche durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden die Proben wieder nachträglich mit UV-Licht bestrahlt und als Negativprobe wurde stets zeitgleich caged AZD5438 ohne Radioaktivität (Probe 2) gemessen.

6.6 Biologische Evaluation

Für die biologischen Versuche wurde an einer Sterilbank *Napflow* von Napco und mit einem Inkubator *function line* von Hareus gearbeitet. Die verwendeten Substanzen wurden von Life Technologies erworben. In der Durchführung wurden weiße 96er Wellplatten verwendet. Theo Rodat führte diese Versuche durch.

6.6.1 Kinaseassay

CDK2-Cyclin-E1-Assays wurden mit dem auf Lumineszenz basierten ADP-Glo™ Assay (Promega) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt.¹³⁸ Proportional zum ATP-Verbrauch der Kinasereaktion findet dabei die Luciferasereaktion statt, wo die freigesetzte Menge an ADP über ein Lumineszenzsignal bestimmt werden kann. Bei einem kleinen Biolumineszenzsignal liegt dementsprechend eine geringe Aktivität der Kinase vor. Durch die ermittelten Dosis-Wirkungskurven können die IC₅₀-Werte und die Kinaseaktivität bestimmt werden. Die zu untersuchenden Substanzen wurden dabei in DMSO gelöst und nach einer 1:3 Verdünnung auf die mit 50 µl Kinasepuffer gefüllten Mikrotiterplatten gegeben, sodass sie in einer Konzentration von 10 µM vorlagen. Nach Bestrahlung (365 nm, 10 min, 6.5 mW/cm²) wurde erst die Kinase (0.4 ng/µl CDK2/Cyclin E1) zugegeben, um dessen Denaturieren zu verhindern. Nach weiteren 10 min Inkubierens wurde 10 µM ATP und 0.1 µg/µl Histon H1 hinzugefügt und weitere 30 min inkubiert. Nach Zugabe des *Detection Reagents* wurde erneut 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend mit Fluostar Omega von BMG Labtech im Intervall von 0.2 Gain von 3600 die Biolumineszenzsignale detektiert. Hier befand sich in den Probelösungen am Ende 10 µM ATP, 0.1 µg/µl Histon H1 (Substrat) und 1 % DMSO. Die Auswertung erfolgte anhand von GraphPad Prism, Version 7, GraphPad Software. Die IC₅₀ Werte wurden dabei mit der Sigmoidal-Anpassung (*log(Inhibitor) vs. Reaktion - variable Steigung*) ermittelt (Gleichung 2).

$$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{(LogIC_{50} - X) \cdot HillSlope}) \quad (2)$$

Ausreißer wurden mit *D'Agostino-Pearson omnibus normality test* berechnet. Versuche ohne Probesubstanzen mit Kinase in 1 % DMDO dienten als 100 % Kontrolle und Substanzen ohne Kinase als 0 % Kontrolle. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen je als Doppelbestimmungen von Theo Rodat durchgeführt.

6.6.2 Zellproliferationsassay

Da CDK2 besonders bei der Onkogenese relevant ist, wurden die Inhibitoren an der Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zelllinie Panc89 getestet.^{145,146} Panc89, auch bekannt als T3M4, wurde von Christian Röder, Institut für Experimentelle Krebsforschung, CAU Kiel, Deutschland, bezogen. Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und in einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert. Panc89 wurde mit Dulbecco's MEM (Lifetech) versetzt, das mit 10 % fetalem Kälberserum (Lifetech) und 1 mM Pyruvat (Lifetech) angereichert war. Für den Zellproliferationstest wurden die Zellen mit dem Cell Scepter (Merck Millipore) gezählt und bis zu einer endgültigen Anzahl von 5.000 - 15.000 Zellen/ml in weiße 96-Well-Platten (PerkinElmer) ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die in DMSO gelösten Proben, welche vorher wieder in 1:3 Schritten auf eine maximale Konzentration von 10 µM verdünnt wurden, mit 365 nm LED, 5 Minuten, 37.5 mW/Well bestrahlt. Eine Tag-Null-Platte wurde mit Resazurin inkubiert, um die Zellproliferation bei Behandlung mit dem Wirkstoff zu bestimmen. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation und nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen zwei Stunden lang mit 2 mg/ml Resazurin bebrütet.³⁷ Mitochondrien in Eukaryoten reduzieren Resazurin (blau) zu Resorufin (violett), welches mittels Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden kann.¹⁴⁷ Dieses Fluoreszenzsignal von Resorufin wurde mit Fluostar Omega detektiert. Für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurde wieder GraphPad Prism 7 verwendet. Die Kurven der Inhibitoren wurden mit Rechnung (2) berechnet, wobei die DMSO-Behandlung als 100 % Kontrolle und das Medium allein als - 100 % Kontrolle diente. Ausreißer wurden wieder mit dem D'Agostino-Pearson Omnibus-Normalitätstest ermittelt. Der Assay wurde mit drei Replikaten durchgeführt.

7 Anhang

7.1 Aktivitätsrechnung

$$\text{Zerfallsgesetz:} \quad N = N_0 \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^{\frac{t}{T_{\frac{1}{2}}}} \quad (3)$$

$$\text{Aktivität:} \quad A = A_0 \cdot \epsilon^{-\lambda \cdot t} \quad (4)$$

$$A = \frac{\Delta N}{\Delta t} \quad (5)$$

$$\text{Nuklid a} \quad \epsilon N_a = \frac{A_{0a}}{\lambda_a} [1 - \epsilon^{-\lambda_a \cdot t}] \quad (6)$$

$$\text{Nuklid b} \quad \epsilon N_b = \frac{A_{0b}}{\lambda_b} [1 - \epsilon^{-\lambda_b \cdot t}] \quad (7)$$

$$\text{Gleichsetzung:} \quad \epsilon N_a = \epsilon N_b \quad (8)$$

$$\frac{A_{01}}{\lambda_1} [1 - \epsilon^{-\lambda_1 \cdot t}] = \frac{A_{02}}{\lambda_2} [1 - \epsilon^{-\lambda_2 \cdot t}] \quad (9)$$

$$A_{02} = \frac{A_{01} [1 - \epsilon^{-\lambda_1 \cdot t}] \cdot \lambda_2}{[1 - \epsilon^{-\lambda_2 \cdot t}] \cdot \lambda_1} \quad (10)$$

A = Aktivität (in Bq)

A₀ = Aktivität zum Zeitpunkt t = 0

N = Anzahl der noch nicht zerfallenen Atomkerne

N₀ = Anzahl der zum Zeitpunkt t = 0 vorhandenen nicht zerfallenen Atomkerne

ΔN = Anzahl an Kernen, welche Zerfallen sind

t = Zeit

T_½ = Halbwertszeit

Δt = Zeit nach der die Kerne Zerfallen sind (in s)

λ = Zerfallskonstante

a = Parameter zugehörig zu Nuklid a

b = Parameter zugehörig zu Nuklid b

7.2 Abkürzungs- und Fremdwörterverzeichnis

CML = chronisch myeloische Leukämie

ESR = Elektronenspinresonanzspektroskopie

¹⁸FDG = 18-Fluordesoxyglucose, wird in der Klinik für die PET verwendet

HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

MS = Massenspektrometrie (engl. mass spectrometry)

HR-MS = Hochauflösende Massenspektrometrie (engl. High-resolution mass spectrometry)

NMR = Kernspinresonanzspektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance)

s = Singulett

d = Duplett

sept = Septett

PDT = Photodynamische Therapie (engl. photo dynamic therapy)

PET = Positronen-Emissions-Tomographie

PMT = Photomultiplier (engl. photomultiplier tube)

PSS = photostationäre Zustand (engl. photostationary state)

ROS = Reaktive Sauerstoffspezies

SIRT = selektive interne Strahlentherapie

Well = voneinander getrennte Näpfe in Mikrotiterplatten

7.3 Veröffentlichte Arbeiten

Teile der Promotionsarbeit wurden bereits veröffentlicht. Folgend ist aufgelistet, an welchen Anteilen ich, Melanie Busse, geb. Krebs, beigetragen habe.

1) Melanie Krebs, Alexander Döbber, Theo Rodat, Ulf Lützen, Yi Zhao, Maaz Zuharya, and Christian Peifer. Photopharmacological applications for Cherenkov radiation generated by clinically used radionuclides. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 9010. <https://doi.org/10.3390/ijms22169010>.

Eigenanteil: Mitarbeit an der Konzeptionierung, Planung und Durchführung der Radionuklid- und photochemischer Labor- Experimente, Erstellung der Abbildungen und Mitarbeit beim Erstellen des Manuskriptes.

2) Theo Rodat, Melanie Krebs, Alexander Döbber, Björn Jansen, Anja Steffen-Heins, Karin Schwarz and Christian Peifer. Restricted suitability of BODIPY for caging in biological applications based on singlet oxygen generation. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2020, DOI: 10.1039/D0PP00097C.

Eigenanteil: Planung und Durchführung photochemischer Labor-Experimente, Mitarbeit bei der Erstellung der Abbildungen und des Manuskriptes.

3) Stefan Kirschner, Alexander Döbber, Melanie Krebs, Christopher Witt, Bernd Hartke and Christian Peifer. The Impact of electronic effects on photolysis: a model study on the 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl caged N-phenylpyrimidine-2-amine scaffold. *ChemPhotoChem* 2020, 4, 1-7. doi.org/10.1002/cptc.201900285.

Eigenanteil: Planung und Durchführung photochemischer Labor-Experimente, Mitarbeit bei der Erstellung der Abbildungen und des Manuskriptes.



Article

Photopharmacological Applications for Cherenkov Radiation Generated by Clinically Used Radionuclides

Melanie Krebs ¹, Alexander Döbber ¹, Theo Rodat ¹, Ulf Lützen ², Yi Zhao ², Maaz Zuhayra ² and Christian Peifer ^{1,*}

¹ Institute of Pharmacy, Christian-Albrechts-University of Kiel, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany; mkrebs@pharmazie.uni-kiel.de (M.K.); adoebber@pharmazie.uni-kiel.de (A.D.); trodat@pharmazie.uni-kiel.de (T.R.)

² Clinic for Nuclear Medicine, Molecular Image Diagnostics and Therapy, Arnold-Heller-Straße, 24105 Kiel, Germany; Ulf.Luetzen@uksh.de (U.L.); Yi.Zhao@uksh.de (Y.Z.); mzuhayra@nuc-med.uni-kiel.de (M.Z.)

* Correspondence: cpeifer@pharmazie.uni-kiel.de

Abstract: Translational photopharmacological applications are limited through irradiation by light showing wavelengths within the bio-optical window. To achieve sufficient tissue penetration, using wavelengths >500 nm is mandatory. Nevertheless, the majority of photopharmacological compounds respond to irradiation with more energetic UV light, which shows only a minor depth of tissue penetration in the μm range. Thus, we became interested in UV light containing Cherenkov radiation (CR) induced as a by-product by clinically employed radionuclides labeling specific tissues. Therefore, CR may be applicable in novel photopharmacological approaches. To provide evidence for the hypothesis, we verified the clinically established radionuclides ^{68}Ga and ^{90}Y but not ^{18}F in clinically used activities to be capable of generating CR in aqueous solutions. We then investigated whether the generated CR was able to photoactivate the caged kinase inhibitor cagedAZD5438 as a photoreponsive model system. Herein, 21% uncaging of the model system cagedAZD5438 occurred by incubation with ^{90}Y , along with a non-specific compound decomposition for ^{68}Ga and partly for ^{90}Y . The findings suggest that the combination of a clinically employed radionuclide with an optimized photoresponsive agent could be beneficial for highly focused photopharmacological therapies.

Keywords: Cherenkov radiation; kinase inhibitor; photopharmacology; CDK2; bio-optical window; radionuclides



Citation: Krebs, M.; Döbber, A.; Rodat, T.; Lützen, U.; Zhao, Y.; Zuhayra, M.; Peifer, C. Photopharmacological Applications for Cherenkov Radiation Generated by Clinically Used Radionuclides. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9010. <https://doi.org/10.3390/ijms22169010>

Academic Editors: Xavier Rovira Algans, Amadeu Llebaria and Xavier Gomez-Santacana

Received: 3 June 2021

Accepted: 17 August 2021

Published: 20 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

A recent strategy to overcome specificity issues of pharmacologically active compounds includes photopharmacological approaches, in which the biological activity of a compound can be regulated by the irradiation of light [1]. Using light-responsive molecules, temporal and spatial control and thus high precision in a therapeutic treatment could be achieved [2–4]. In line with this notion, Table S1 lists a selection of experimental photopharmacological applications that have been studied recently.

However, the majority of photoresponsive compounds react most effectively to irradiation with light showing wavelengths < 500 nm, typically showing a limiting penetration depth of only micrometers into biological tissue. Moreover, highly energetic UV light can cause harm to cells, resulting, among others, in apoptosis or DNA damage [5–7]. On the other hand, the light absorption of hemoglobin and water reaches a minimum between 650 and 900 nm, thus allowing for decent tissue penetration for relevant wavelengths and, as a consequence, for a sufficient translational bioavailability of irradiation. This wavelength range between 650 and 900 nm is commonly referred to as the bio-optical window, and photopharmacological research aims to develop compounds to be activated by irradiation within that range [8,9]. For therapeutically effective applications, the used wavelength

of the irradiation should be adjusted ideally within the bio-optical window, and thus, a compound should be photoresponsive within this window, too. However, until today (as shown in Table S1), most photopharmacological approaches use lower wavelengths within the UV range [10–20]. Therefore, an alternative would be highly beneficial to circumvent this limited penetration depth of UV light for successful activation of photoresponsive compounds at deeper tissue levels.

In this context, we became interested in the usage of Cherenkov radiation (CR), which exhibits an emission spectrum in the near-UV range (250–600 nm) and hence covers the wavelength range of most of the photoresponsive compounds published so far (Table S1) [21,22]. Ran et al. already investigated the possibility of activation based on CR generated by ^{18}F , and Nakamura et al. reported on CR by ^{18}F -FDG for photoimmunotherapy [23]. Furthermore, CR has already been investigated more closely in the field of photodynamic therapy, for example, by Hart et al. for ^{90}Y -induced CR [24–27].

CR can occur as a second form of radiation in addition to ionizing radiation generated from high-energy beta emitters, including clinically established radiopharmaceuticals. These are radiolabeled molecules designed to deliver therapeutic doses of ionizing radiation to specific tumor tissue areas within the body. At specific dose rates, they are used for diagnostics and radiotherapy, thus potentially offering highly interesting combinations for novel photopharmacological applications. CR is commonly known as the emergence of blue light emitted from high-energy radiation sources stored in water in a nuclear power plant. Furthermore, CR is the basic detection principle of a Cherenkov counter, which is a technique for the determination of beta emitting radionuclides used in biochemical assays (e.g., isotope ^{32}P) [28,29]. In general, CR can be induced when a charged particle travels faster than light in a dielectric medium (e.g., water). The charged particle locally polarizes the medium molecules, generating excited electronic states. During their return to the ground state, the resulting energy is emitted by the system as CR. This CR typically occurs in an asymmetrical polarization event, the so-called “cone effect”, in which the resulting radiation waves can constructively superimpose each other. If the charged particles in the polarizable medium travel slower than the respective speed of light within the same medium, the resulting radiation waves cancel each other. Therefore, the threshold condition for the induction of CR depends on the refractive index of the polarizable medium as well as on the energy level of the charged particles [30]. The velocity in the respective medium v can be calculated using the following equation, where n is the refractive index of the medium and c is the speed of light in vacuum.

$$v = c/n \quad (1)$$

In radiopharmaceutical therapies, especially radionuclides that decay by beta-particle emission are commonly used. Beta decay of the nuclides results in the emission of high-energy electrons or positrons from the nucleus. These locally generated high-energy particles impact the surrounding tumor tissue to consequently kill tumor cells. Accordingly, we focused on the question of whether radiotherapeutical applications generating CR could be useful to activate photoresponsive compounds. Besides beta-emitting radionuclides, external beam radiation commonly used in the clinic for radiation tumor therapy is able to induce CR as well [31], whereby charged particles such as electrons are strongly accelerated in a linear particle accelerator for targeting tumor tissues. The resulting energy is also released in the form of photons, which can induce CR due to Compton scattering. In detail, a photon is scattered by a charged particle such as an electron, which leads to a transfer of energy to the rebounding particle. This energetic recoiling particle is able to induce CR [32–35].

In the present study, we investigated whether CR, generated by radionuclides or by external irradiation (see SI Section 2.8), could be useful to activate photoresponsive prodrug compounds. Thus, a locally and temporally controlled photopharmacological therapy without the need for external irradiation could be possible. Furthermore, a combination of photoresponsive chemotherapy and radiotherapy could achieve additive effects [10].

Additionally, the amount of necessary radiopharmaceutical activity could be reduced by such a combination, so that both patients and clinical staff would benefit from the concept as the medical applications would possibly be easier to manage. In the present study, from nuclides relevant for diagnostic and therapeutic purposes (Table 1), we took a selection, namely ^{18}F , ^{68}Ga , and ^{90}Y , and aimed to verify whether these radioisotopes were able to produce quantifiable CR in an aqueous medium.

Table 1. Parameters of selected radionuclides with clinical significance [36]. Every positron-emitting (β^+) nuclide results in electron capture (ec). This is another mode of beta decay in which an electron is captured by the atomic nucleus [37]. $I\beta(\text{abs})$: absolute β^- or β^+ intensity in %.

Nuclide	$t_{1/2}$	$E_{\text{max}}/\text{MeV}$	$E_{\text{mean}}/\text{MeV}$ $I\beta(\text{abs})^*$	Type of Radiation (Branching Ratio)	Indication
^{68}Ga	67.71 min	1.9	0.84 (87.72%)	ec β^+ (100%)	Diagnostics, PET/CT [38]
^{18}F	109.77 min	0.63	0.25 (96.73%)	ec β^+ (100%)	Diagnostics, PET/CT [39]
^{153}Sm	46.28 h	0.81	0.23 (49.40%)	β^- (100%)	Bone metastases [40]
^{90}Y	64.00 h	2.28	0.93 (99.99%)	β^- (100%)	Neuroendocrine tumors, pleural and peritoneal carcinosis, hepatocellular and cholangiocellular carcinoma, liver metastases, rheumatoid arthritis and activated arthrosis, malignant lymphomas of B cells [40,41]
^{186}Re	3.72 d	1.07	0.36 (70.99%)	β^- (92.33%)	Bone metastases, rheumatoid arthritis, activated arthrosis [41]
^{177}Lu	6.64 d	0.50	0.15 (79.44%)	β^- (100%)	Neuroendocrine tumors [42], bone pain palliation [43], metastatic castration-resistant prostate cancer [44]
^{131}I	8.03 d	0.61	0.19 (89.60%)	β^- (100%)	Neuroendocrine tumors, pleural and peritoneal carcinosis [40], thyroid autonomy, Graves' disease, goiter, thyroid cancer, pheochromocytoma, liver metastases, liver cell and cholangiocellular carcinoma [41]
^{169}Er	9.39 d	0.35	0.10 (55.50%)	β^- (100%)	Rheumatoid arthritis [45]
^{32}P	14.27 d	1.71	0.70 (100.00%)	β^- (100%)	Polycythemia vera [40,41], essential thrombocythemia [41]

Additionally, we aimed to investigate the potential photocleavage of a caged compound as a photoresponsive model system, both for the selection of the nuclides and for photons and electrons from a clinically used linear particle accelerator (see SI Section 2.8). As the model compound, we chose the highly effective but somewhat unspecific protein kinase inhibitor AZD5438 caged with the well-established photoremovable protecting group 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB) [3,46–48] (Figure 1) to obtain a bioinactive prodrug. Protein kinases play an essential role in signal transduction and, in the case of their malfunction, lead to uncontrolled cell growth or reduced apoptosis. This often results in the development of cancer [49,50]. Cyclin-dependent kinases (CDKs) are especially fundamental for a functioning cell cycle and transcription regulation and are investigated as drug targets [51–53]. In line with this notion, AZD5438 has been developed as a potent inhibitor of CDKs with the following IC_{50} values: CDK1, 16 nM; CDK2, 6 nM; CDK9, 20 nM [54]. Furthermore, it is an orally bioavailable inhibitor which advanced into clinical studies but failed because of toxic side effects. Hence, the pharmacologically active com-

compound AZD5438 and its inactive caged prodrug cagedAZD5438 may be suitable for highly specific photopharmacological applications, in that the temporal and spatial control of the drug's activation can greatly decimate the proportion of toxic side effects.

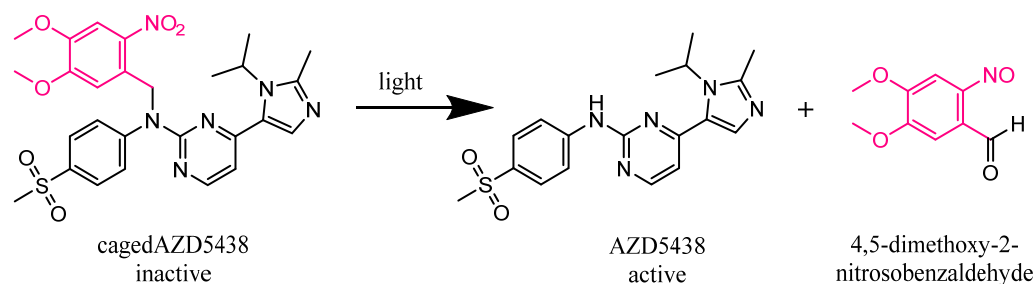


Figure 1. Expected photolysis reaction of the inactive kinase inhibitor AZD5438 caged with the photoremovable protecting group 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB) (cagedAZD5438) to the active AZD5438 and the separated protection group according to Klán et al. [3].

2. Results and Discussion

2.1. Verification of CR Generated by the Decay of Nuclides in an Aqueous Solution

First, it was important to provide evidence for the generation of CR by the decay of the above-mentioned radionuclides in aqueous solutions. Among the typical read-out techniques for biochemical assays is a Cherenkov counter, which exploits exactly the principle of the resulting CR by the decay of radionuclides (e.g., ^{32}P) [28]. However, such conventional detection methods could not be established for this study because of the obvious difficulties in handling the radioisotopes, including the long contamination times based on their slow decay. Therefore, when looking for alternative methods for the direct detection of CR, we came across a device called “kamiokanne” (KK). The KK is a simplified system based on the method of the “super-kamiokande” (SKK), which is located in Kamioka, Japan [55]. In fact, the SKK is being used to investigate secondary cosmic radiation. The simplified KK is composed of common thermos flasks with attached photomultiplier tubes (PMTs) and internal high-voltage supplies [56]. The KK is able to measure muons from secondary cosmic radiation, thus generating CR as electromagnetic radiation. The PMTs are able to detect this CR, and consequently, an electrical signal is generated as the read-out. Thus, we decided to test the KK for the detection of CR in our experiments (further details can be found in the SI). The adapted set-up of the KK in our lab is shown schematically in Figure 2a. Here, we investigated whether CR generated by the decay of radionuclides was detectable by the KK. From the multitude of possible radionuclides, the therapeutically and diagnostically used beta-emitting radionuclides ^{18}F , ^{68}Ga , and ^{90}Y were chosen as a representative selection of beta emitters showing clinical significance (Table 1). As the key rationale for the selection of these radionuclides, it was important to focus on meaningful half-life values to allow sufficient repetitions of experiments within a reasonable period. Additionally, the decay energy of the respective radionuclides plays an important role. This energy is not constant, but a continuum spectrum is created in which the maximum emitted energy (E_{max}) and the average energy (E_{mean}) are key parameters (Figure S8) [57–60].

A critical energy threshold value of 0.26 MeV was determined by Elrick et al. regarding the generation of CR in an aqueous solution [22]. In order to meet the requirements for potential translational purposes of this concept, we tested the radionuclides in energy ranges corresponding to their respective clinical applications. Thus, we performed the experiments in the activity range for ^{68}Ga from 1.163 to 0.256 GBq, for ^{18}F from 2.317 to 0.117 GBq, and for ^{90}Y from 0.510 to 0.071 GBq. Figure 2b summarizes the results of the experiments. Based on the decay of these nuclides, activity-dependent generation of CR could be determined for all chosen nuclides. A significant increase in CR signals was observed for ^{68}Ga and ^{90}Y . For ^{68}Ga , more activity was required compared to ^{90}Y to achieve a comparable CR signal according to their respective decay energies. In contrast,

only CR slightly above the blank value (negative control, CR from the secondary cosmic radiation) could be determined for ^{18}F , although we used activities up to more than 2 GBq. The results were not unexpected, as the E_{mean} emitted by ^{18}F was 0.25 MeV and thus did not reach the threshold value for the formation of CR (Table 1) [22]. Taken together, we could establish a strong correlation between the nuclear decay of the selected nuclides and the resulting CR, suggesting ^{68}Ga and ^{90}Y to be suitable for photopharmacological applications. ^{18}F produced CR as well, but to a much lesser extent, which might not be enough to photoactivate our model system cagedAZD5438.

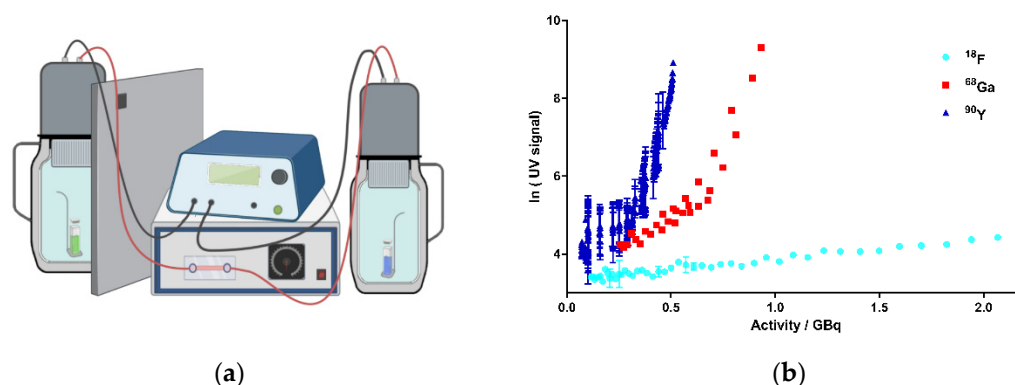


Figure 2. Activity-dependent generation of CR by the decay of ^{18}F , ^{68}Ga , and ^{90}Y in kamiokanne (KK) experiments. (a) Schematic test setup of KK experiments. Two thermos flasks separated by a lead wall were filled with water together with a holder for a sealed quartz cuvette containing the samples. The flasks were equipped with photomultiplier tubes (PMTs) and electronic devices to detect CR. The green cuvette represents a solution of the radionuclide sample, and the blue sample illustrates the negative control containing the solvent without radionuclides. On top of the thermos flasks, PMTs were attached to high-voltage supplies (figure created with BioRender.com). (b) Results from the KK experiments. The activities of the three radionuclides, ^{18}F , ^{68}Ga , and ^{90}Y , are presented individually for each experiment in correlation to the resulting Cherenkov signal intensity (UV signal). The signal strength corresponds to the number of signals at 10-min intervals. Signals of cosmic radiation were used to determine the baseline (blank value). Each radionuclide was tested in three independent experiments; data represent mean \pm SD.

2.2. Activation of a Caged Photoresponsive Compound by Cherenkov Radiation as Model System

Having demonstrated the generation of CR by the radionuclides ^{18}F , ^{68}Ga , and ^{90}Y as a side-product, we next investigated whether this process could activate a photoresponsive compound. We selected the 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB) caged AZD5438 (cagedAZD5438) as a novel model compound based on the emission spectrum of the CR and the strong absorption of cagedAZD5438 within the range of 300–400 nm (Figure 3b). The DMNB group was already investigated by our group in connection with the central pharmacophore *N*-phenylpyrimidine-2-amine, a scaffold of many kinase inhibitors, including AZD5438 [61]. Molecular modeling of the X-ray-defined ligand complex of AZD5438 in CDK2 with cyclin E1 (pdb 4FKO) suggested the NH function to be suitable for caging. Herein, due to steric conflicts of the caging moiety, no plausible binding mode for cagedAZD5438 in CDK2 could be determined (see Figure S1) [62].

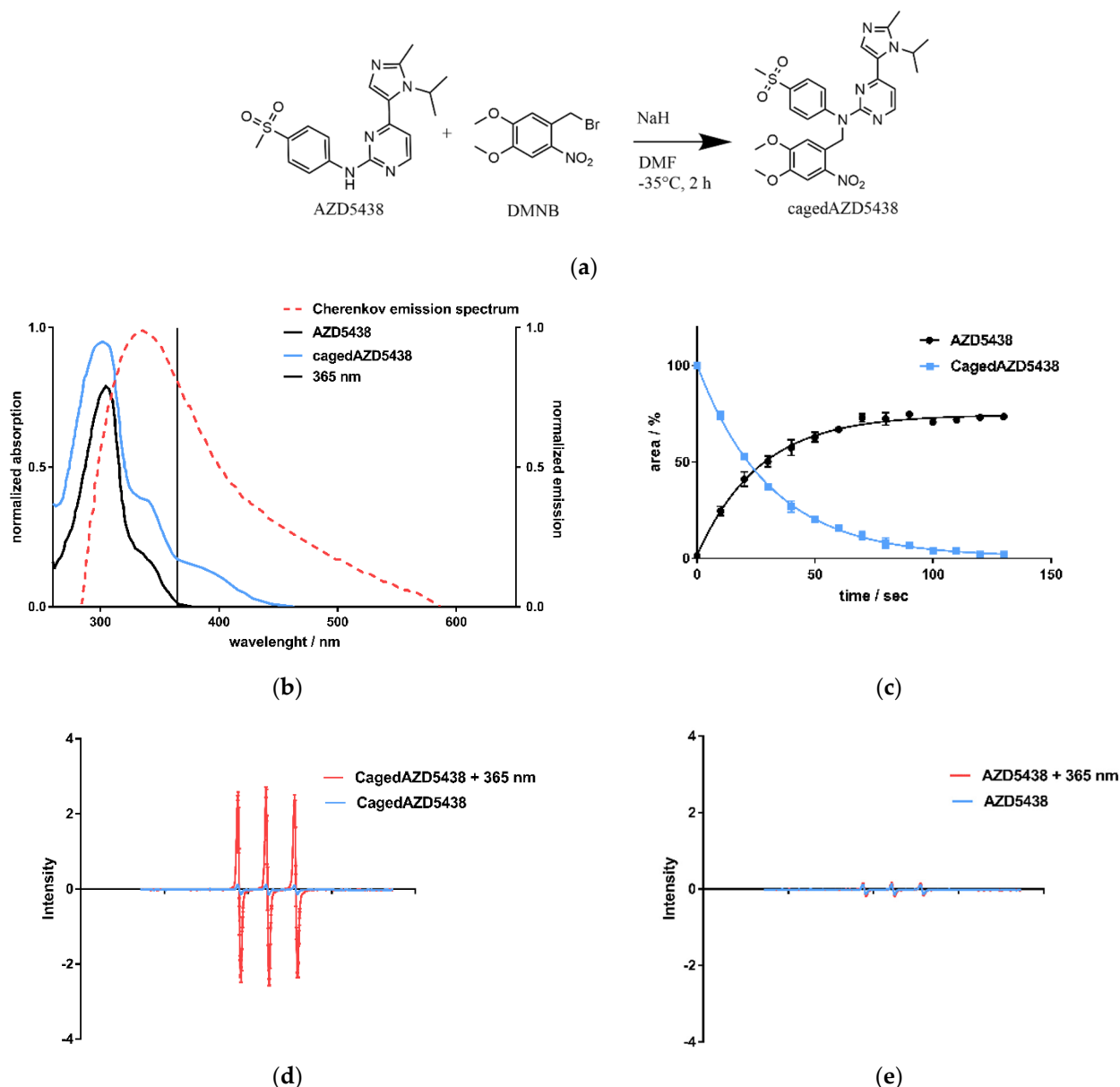


Figure 3. (a) CagedAZD5438 was synthesized according to the general procedure for caging of *N*-phenylpyrimidin-2-amines with benzyl bromides [59]. In an S_N2 reaction, benzyl bromide in dry DMF is added dropwise to AZD5438 at -35°C under argon atmosphere (yield 55.6%, further details in SI). (b) UV/Vis spectra of AZD5438 and cagedAZD5438 with DMNB in aqueous medium with 20% DMSO as solubilizer. An overlay of the Cherenkov emission spectrum (dotted line) illustrates the potential usage for photoactivation, indicating 365 nm as a suitable wavelength for control experiments. Other UV/Vis spectra with different solutions are shown in the SI, Figure S7. (c) Photoactivation of cagedAZD5438 by irradiation with UV light at 365 nm; an aqueous compound solution containing $50\ \mu\text{M}$ prodrug cagedAZD5438 (blue line) and 20% DMSO was irradiated at 365 nm, 37.5 mW, every 10 s and then analyzed by HPLC. Repeated experiments with the free inhibitor AZD5438 (Figure S9d) as a control were carried out. Each value is the mean \pm SD of four independent experiments. (d) Electron spin resonance (ESR) spectra of the spin probe TMTH (1-hydroxy-4-isobutyramido-2,2,6,6-tetramethylpiperidine) incubated with cagedAZD5438 in DMSO without and with irradiation (365 nm, 100 s, 37.5 mW per well). (e) ESR spectra of a solution of AZD5438 with and without irradiation (365 nm, 100 s, 37.5 mW per well). As a positive control, the photosensitizer 1,4-naphthoquinone [63] in DMSO was tested under the same conditions. The sample solutions contained the spin probe TMTH (2.5 mM) and $50\ \mu\text{M}$ cagedAZD5438 in 20% DMSO. Error bars indicate SD with $N = 3$.

We achieved the synthesis of cagedAZD5438 by the established general procedure for caging of *N*-phenylpyrimidin-2-amines with benzyl bromides under argon atmosphere and

under light protection [59] (Figure 3a). First, we performed preliminary tests to determine the stability of cagedAZD5438 under different conditions (see SI Figures S4 and S5). For the photochemical characterization of cagedAZD5438, we tested the uncaging process upon irradiation. An aqueous solution of 50 μM cagedAZD5438 with 20% DMSO (to avoid solubility issues) was irradiated with light at 365 nm with 37.5 mW, and the samples were subsequently analyzed by HPLC (Figure 3c; for details of the photolysis experiments, see Figure S6). The inhibitor AZD5438 itself proved to be stable during UV irradiation (Figure S9d). In contrast, upon irradiation, cagedAZD5438 was uncaged to produce 75% AZD5438 after 100 s of irradiation. Using electron spin resonance spectroscopy (ESR) investigations, we could confirm that radicals were generated during UV irradiation of a solution of AZD5438. Consequently, a portion of AZD5438 was radically destroyed and thus not detected by the HPLC analysis (Figure 3c–e), in which a mixture of unidentified products occurred.

Next, we aimed to test the uncaging of cagedAZD5438 *in vitro*. For this purpose, we initially tested cagedAZD5438 in an enzymatic CDK2/cyclin E1 assay and in a cell proliferation assay under controlled light conditions. In the enzymatic CDK2/cyclin E1 assay, we determined AZD5438 to be highly active with an IC_{50} value of 2.8 nM, which is in the same range as the reference data ($\text{IC}_{50} = 6 \text{ nM}$) [54]. In contrast, cagedAZD5438 proved to be much less active without irradiation ($\text{IC}_{50} = 4798 \text{ nM}$). When irradiating the assay containing cagedAZD5438 with 365 nm, the biological activity on CDK2 could be restored, resulting in an IC_{50} value of 5.6 nM (Figure 4a) and achieving a photopharmacological factor of 850 (unirradiated vs. irradiated). Similar results were obtained in the cell proliferation assay using Panc89 cells with resazurin as a read-out. Here, cagedAZD5438 was determined to be biologically inactive with an IC_{50} value $>10 \mu\text{M}$ (Figure 4b). Again, after irradiation with 365 nm, the biological potency of AZD5438 was fully restored, resulting in an IC_{50} value of 0.5 μM (reference AZD5438 $\text{IC}_{50} = 0.8 \mu\text{M}$). Taken together, in both the kinase and the cell assay, we could demonstrate a clear photoresponsive effect for cagedAZD5438, suggesting this compound to be a suitable model system for further experiments involving the radionuclides ^{18}F , ^{68}Ga , and ^{90}Y and for particle accelerator assays (see SI Section 2.8).

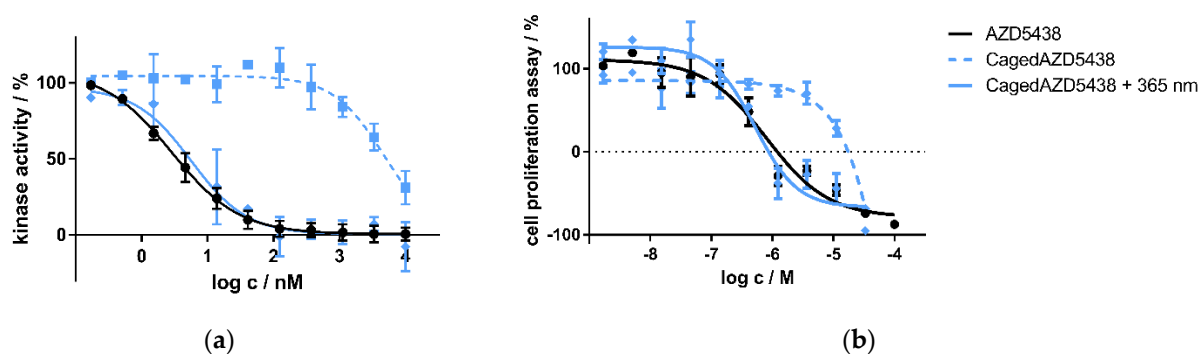


Figure 4. (a) Kinase assay of caged and uncaged AZD5438 using the target kinase assay CDK2/cyclin E1 with and without UV irradiation. CDK2 in complex with cyclin E1 was incubated with the inhibitor AZD5438 as well as its caged prodrug cagedAZD5438 to determine kinase activity. In a second setup, 10 min after compound addition both assays were irradiated with UV light for two minutes (365 nm, 37.5 mW). Data represent mean \pm SD from two independent experiments, each performed in triplicate. (b) Cell proliferation assay of the inhibitor AZD5438 and cagedAZD5438 with and without UV irradiation using Panc89 cells. UV irradiation was performed for 2 min, 365 nm, 37.5 mW. Cell proliferation was determined after 48 h of drug treatment. Data represent mean \pm SEM from three independent experiments, each performed in quadruplicate.

2.3. ^{18}F Fluor

As discussed above, and in contrast to the other tested nuclides ^{68}Ga and ^{90}Y , in our settings, the CR signals generated by the decay of ^{18}F were at the baseline level of cosmic ray signals in the KK experiments. However, ^{18}F was already reported to be used

for activating photoresponsive compounds in a photodynamic therapy approach using sensitizers to be activated by CR produced by ^{18}F [24]. Furthermore, in 2012, Ran et al. showed that CR induced by ^{18}F mediates uncaging. The authors demonstrated in a proof-of-concept study that a caged derivative of luciferin was uncaged by ^{18}F Fluorodeoxyglucose (^{18}F FDG, used for positron emission tomography (PET) in the clinic) in a mouse breast cancer model [23]. Conceptually, the decay of ^{18}F showing 96.7% positron emission represents a borderline case with a maximum decay energy of 0.63 MeV and a mean energy of 0.25 MeV, which is very close to the threshold value of 0.26 MeV for the generation of CR [22,36]. However, we incubated cagedAZD5438 with ^{18}F and ^{18}F FDG (20–300 MBq/mL) [12,13,61] for 24 h each, and both the caged and the uncaged species were quantified by HPLC analysis at intervals of 15 min (Table 2). Since cagedAZD5438 has a low solubility in water, we decided to use either DMSO or MeOH as the solvent. In line with the KK results showing no significant generation of CR, under the applied conditions, we observed no uncaging of cagedAZD5438 during incubation with the beta emitter ^{18}F for up to 12 h (Figure 5a). In negative controls, the free inhibitor proved to be stable during irradiation (Figure S9a). In order to provide control experiments following the 24-h incubation time, we irradiated the ^{18}F samples containing cagedAZD5438 with UV light of 365 nm. Here, strong photoactivation of cagedAZD5438 was demonstrated, suggesting the CR produced by the decay of ^{18}F is not sufficient for the uncaging process.

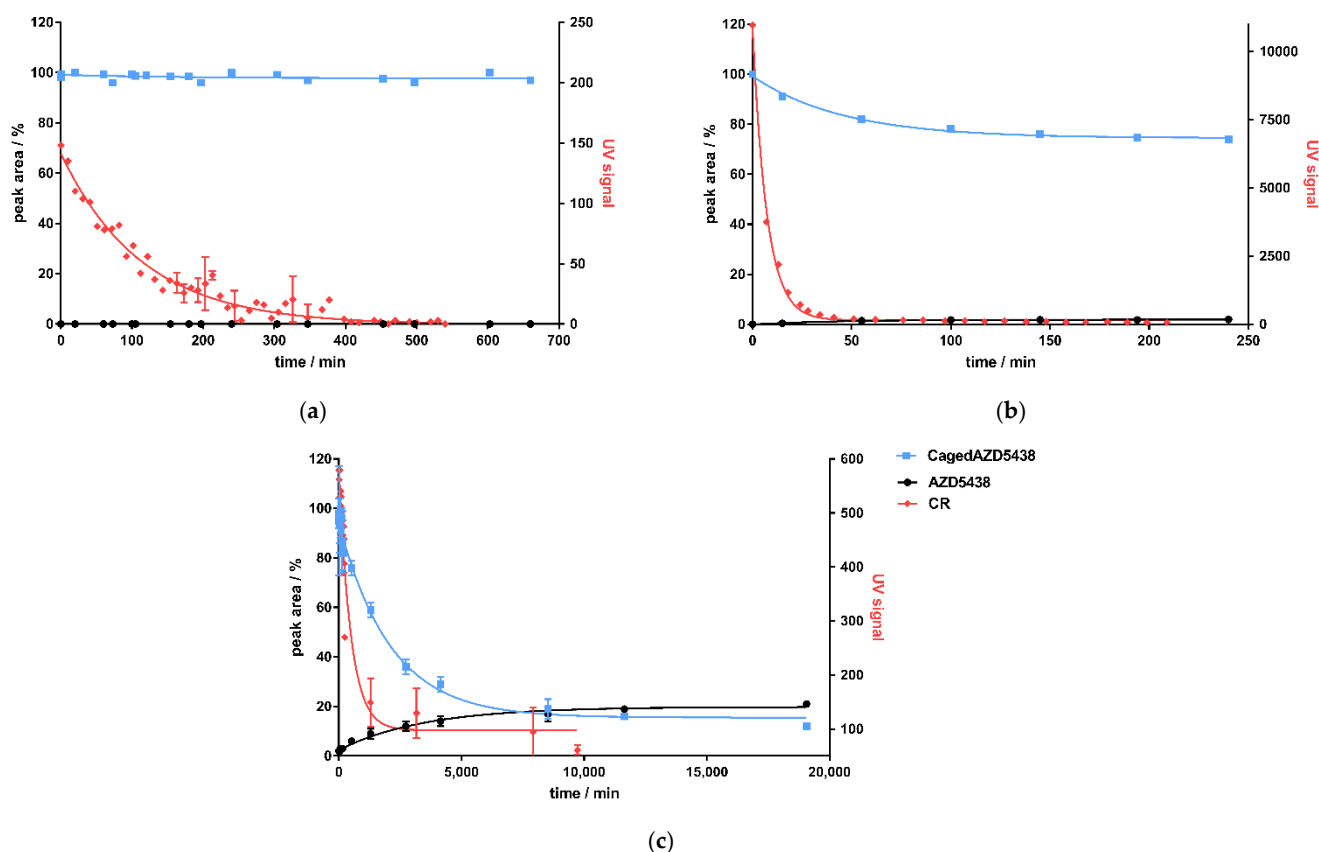


Figure 5. Correlation of CR detected by the KK method as UV signal (red dots) and uncaging of cagedAZD5438 (blue line) by HPLC analysis to yield uncaged AZD5438 (black) for 3 isotopes: (a) ^{18}F , (b) ^{68}Ga , and (c) ^{90}Y . All curves are fitted with one-phase decay.

Table 2. Trials from cagedAZD5438 activation experiments using ^{18}F and ^{18}F FDG as the radioactive source. As a solubilizer, either DMSO or MeOH was added. Each sample was analyzed by HPLC every 15 min for up to 24 h in two independent experiments. Following incubation with ^{18}F and ^{18}F FDG showing no uncaging of cagedAZD5438, samples 1–5 were irradiated with UV light, yielding AZD5438 (positive controls).

Sample	Radioactivity/MBq	Solvent	Total Volume/mL	Compound Concentration/ μM
1	20	10% DMSO in water	1	50
2	200	10% DMSO in water	1	50
3	150	10% DMSO in water	1	50
4	107	50% MeOH in water	0.4	125
5	120	50% MeOH in water	0.4	125

2.4. ^{68}Ga

Like ^{18}F , ^{68}Ga is a beta plus emitter showing 87.7% positron emission. However, the decay of ^{68}Ga produced a significantly higher maximum decay energy of 1.9 MeV, and ^{68}Ga had an E_{mean} level of 0.84 MeV, considerably above the threshold of 0.26 MeV to generate CR. Thus, we incubated freshly prepared ^{68}Ga samples ranging from 300 to 900 MBq with a solution of 50 μM cagedAZD5438 to investigate its photoactivation by HPLC (Table 3). Due to its short half-life, ^{68}Ga was generated in situ in the lab and could be eluted directly from its parent isotope ^{68}Ge using 1M HCl (^{68}Ga generator).

Table 3. Incubation of cagedAZD5438 with the beta plus emitter ^{68}Ga under varying conditions (samples 1–6; in samples 3 and 4, the acidic pH was buffered with ammonium acetate and HEPES). Each sample was analyzed twice. As positive controls, after incubation with ^{68}Ga , samples 1–6 were irradiated with UV light, showing uncaging of cagedAZD5438. As a negative control, a solution of the non-radioactive ^{69}Ga was employed (sample 6). Incubating a solution of AZD5438 under the respective conditions used for samples 1–6 proved the inhibitor AZD5438 to be stable (Figure S9b).

Sample	Radioactivity/MBq	Solvent	Total Volume/mL	Compound Concentration/ μM
1	300	20% DMSO in 1 M HCl	1.25	50
2	900	20% DMSO in 1 M HCl	1.25	50
3	900	20% DMSO in 1 M HCl with 0.4 M NH_4Ac	1.25	50
4	900	20% DMSO in 1 M HCl with 5 M HEPES	1.25	50
5	900	20% DMSO in 1 M HCl	3	50
6	–	20% DMSO in 1 M HCl and ^{69}Ga	1.25	50

Correlating to the detection of CR produced by ^{68}Ga , the amount of cagedAZD5438 in the samples decreased to approximately 75%, reaching a plateau at 149 min (Figure 5b). A non-quantitative uncaging was already observed by the photochemical characterization of cagedAZD5438, yielding only ca. 75% AZD5438 (Figure 3c). However, during incubation of the samples with ^{68}Ga , the concentration of AZD5438 did not increase correspondingly. In fact, the HPLC analysis showed a rather complex product mixture, suggesting an alternative degradation reaction by strong CR irradiation, by the emitted positrons, or by radical processes. Assays with a solution of AZD5438 incubated with ^{68}Ga did not indicate any destruction (Figure S9b). In contrast, we detected a partial destruction of cagedAZD5438 in the UV experiments (Figure 3c), which, according to the ESR experiments (Figure 3d,e), belongs to radical processes. However, direct ESR experiments employing ^{68}Ga were not possible due to the specific handling requirements of the radioactive samples. For the ^{68}Ga experiments, although we could demonstrate production of CR, we observed no release of AZD5438 from cagedAZD5438. Instead, a 25% decrease in cagedAZD5438 was detected, reaching a plateau at 149.3 min for CR (produced by the ^{68}Ga decay) and at 148.8 min for the decomposition of cagedAZD5438, showing a strong correlation (Figure 5b).

Thus, these findings suggest an uncaging reaction mediated by the CR but also compound decomposition by positrons generated by the decay of ^{68}Ga .

2.5. $^{90}\text{Yttrium}$

In contrast to ^{18}F and ^{68}Ga as positron emitters being used in radiopharmaceutical diagnostics, ^{90}Y is involved in radiotherapy (Table 1). The radionuclide ^{90}Y is a pure β -emitter possessing a decay energy of $E_{\text{mean}} = 2.28$ MeV and a half-life time of 64 h. We aimed to investigate whether uncaging of cagedAZD5438 can be achieved by the decay of ^{90}Y . Therefore, we incubated a 50 μM solution of cagedAZD5438 with a solution of ^{90}Y showing 419 MBq containing 20% DMSO in a total volume of 1.25 mL (Table 4). As a negative control, we used the uncaged AZD5438 accordingly (Figure S9c), and as positive controls, samples of cagedAZD5438 were irradiated with UV light of 365 nm. The samples of cagedAZD5438 incubated with ^{90}Y showed an uncaging reaction producing 21% AZD5438, reaching a plateau after 7 d (Figure 5c).

Table 4. Activation of cagedAZD5438 upon incubation with the beta minus emitter ^{90}Y ($N = 3$). As positive controls, samples of cagedAZD5438 were irradiated with UV light, proving quantitative uncaging.

Sample	Radioactivity/MBq	Solvent	Total Volume/mL	Compound Concentration/ μM
1	419	20% DMSO in 0.04 M HCl	1.25	50
2	–	20% DMSO in 0.04 M HCl	1.25	50

In contrast to the experiments with ^{68}Ga and ^{18}F , a release of 21% AZD5438 resulted by incubating cagedAZD5438 with the β -emitter ^{90}Y over a period of approx. 14 days (Figure 5c). However, besides the CR-mediated uncaging of cagedAZD5438 and similar to the ^{68}Ga experiments (Figure 5b), a significant compound decomposition also occurred, which may be dependent on the β -decay of ^{90}Y .

3. Conclusions

In this study, we verified experimentally using the KK method that the decay of the clinically applied beta emitters ^{68}Ga and ^{90}Y generates CR in an aqueous solution. A direct comparison of the main decay energies of the investigated nuclides showed that ^{18}F with 0.25 MeV releases significantly less energy than ^{68}Ga with 0.84 MeV and ^{90}Y with 0.93 MeV. We next employed the novel photoresponsive CDK2 inhibitor prodrug cagedAZD5438 as a model system to investigate whether the CR was able to uncage the prodrug when incubated together with the radionuclides. In correlation to the minor CR produced by the β^+ emitter ^{18}F , no uncaging could be determined for cagedAZD5438. Incubation of cagedAZD5438 with the β^+ emitter ^{68}Ga partly resulted in a complex product mixture. Furthermore, incubation of cagedAZD5438 with the β -emitter ^{90}Y yielded 21% AZD5438 but also indicated a compound decomposition towards a complex mixture. These findings suggest photoactivation of the photoresponsive model compound cagedAZD5438 by CR but also compound decomposition by the β^+/β^- irradiation produced by the decay of ^{68}Ga and ^{90}Y , respectively. Based on this proof-of-concept study, an optimized design of photoresponsive compounds could use CR for prodrug activation while providing stability against the β^+/β^- irradiation. Thus, CR induced by therapeutic radiopharmaceuticals such as ^{90}Y could offer a possibility for a synergistic combination of radiotherapy with targeted photopharmacology in future applications.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22169010/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, C.P.; methodology, M.K. and A.D.; software, M.K.; validation, M.K., A.D., and T.R.; formal analysis, M.K., A.D., and T.R.; investigation, M.K., A.D., Y.Z., and T.R.; resources, C.P., U.L., M.K., A.D., and T.R.; writing—original draft preparation, M.K.; writing—

review and editing, C.P. and M.Z.; visualization, M.K.; supervision, C.P., M.Z., and U.L.; project administration, M.K.; funding acquisition, C.P. and U.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), grant number PE1605_2_2. We acknowledge financial support by DFG within the funding programme “Open Access Publizieren”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Huggins, D.J.; Sherman, W.; Tidor, B. Rational Approaches to Improving Selectivity in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1424–1444. [[CrossRef](#)]
2. Mayer, G.; Heckel, A. Biologically Active Molecules with a “Light Switch”. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C.G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2012**, *113*, 119–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ellis-Davies, G.C.R. Caged compounds: Photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. D’Orazio, J.; Jarrett, S.; Amaro-Ortiz, A.; Scott, T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 12222–12248. [[CrossRef](#)]
6. Matsumura, Y.; Ananthaswamy, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *195*, 298–308. [[CrossRef](#)]
7. Gentile, M. Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 4779–4790. [[CrossRef](#)]
8. Phan, T.G.; Bullen, A. Practical intravital two-photon microscopy for immunological research: Faster, brighter, deeper. *Immunol. Cell Biol.* **2010**, *88*, 438–444. [[CrossRef](#)]
9. Sternberg, E.D.; Dolphin, D.; Brückner, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4151–4202. [[CrossRef](#)]
10. Vomasta, D.; Högner, C.; Branda, N.R.; König, B. Regulation of human carbonic anhydrase I (hCAI) activity by using a photochromic inhibitor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7644–7647. [[CrossRef](#)]
11. Morckel, A.R.; Lusic, H.; Farzana, L.; Yoder, J.A.; Deiters, A.; Nascone-Yoder, N.M. A photoactivatable small-molecule inhibitor for light-controlled spatiotemporal regulation of Rho kinase in live embryos. *Development* **2012**, *139*, 437–442. [[CrossRef](#)]
12. Zindler, M.; Pinchuk, B.; Renn, C.; Horbert, R.; Döbber, A.; Peifer, C. Design, Synthesis, and Characterization of a Photoactivatable Caged Prodrug of Imatinib. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1335–1338. [[CrossRef](#)]
13. Bliman, D.; Nilsson, J.R.; Kettunen, P.; Andréasson, J.; Grøtli, M. A Caged Ret Kinase Inhibitor and its Effect on Motoneuron Development in Zebrafish Embryos. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13109. [[CrossRef](#)]
14. Ferreira, R.; Nilsson, J.R.; Solano, C.; Andréasson, J.; Grøtli, M. Design, Synthesis and Inhibitory Activity of Photoswitchable RET Kinase Inhibitors. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9769. [[CrossRef](#)]
15. Frank, J.A.; Yushchenko, D.A.; Hodson, D.J.; Lipstein, N.; Nagpal, J.; Rutter, G.A.; Rhee, J.-S.; Gottschalk, A.; Brose, N.; Schultz, C.; et al. Photoswitchable diacylglycerols enable optical control of protein kinase C. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 755–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wilson, D.; Li, J.W.; Branda, N.R. Visible-Light-Triggered Activation of a Protein Kinase Inhibitor. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 284–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Schmidt, D.; Rodat, T.; Heintze, L.; Weber, J.; Horbert, R.; Girreser, U.; Raeker, T.; Bußmann, L.; Kriegs, M.; Hartke, B.; et al. Axitinib: A Photoswitchable Approved Tyrosine Kinase Inhibitor. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2415–2426. [[CrossRef](#)]
18. Goegan, B.; Terzi, F.; Bolze, F.; Cambridge, S.; Specht, A. Synthesis and Characterization of Photoactivatable Doxycycline Analogues Bearing Two-Photon-Sensitive Photoremovable Groups Suitable for Light-Induced Gene Expression. *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1341–1348. [[CrossRef](#)]
19. Hoorens, M.W.H.; Ourailidou, M.E.; Rodat, T.; van der Wouden, P.E.; Kobauri, P.; Kriegs, M.; Peifer, C.; Feringa, B.L.; Dekker, F.J.; Szymanski, W. Light-controlled inhibition of BRAFV600E kinase. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *179*, 133–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Trads, J.B.; Hüll, K.; Matsuura, B.S.; Laprell, L.; Fehrentz, T.; Görltd, N.; Kozek, K.A.; Weaver, C.D.; Klöcker, N.; Barber, D.M.; et al. Sign Inversion in Photopharmacology: Incorporation of Cyclic Azobenzenes in Photoswitchable Potassium Channel Blockers and Openers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 15421–15428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Jelley, J.V. British Journal of Applied Physics Cerenkov radiation and its applications. *Br. J. Appl. Phys.* **1955**, *6*, 227. [CrossRef]
22. Elrick, R.H.; Parker, R.P. The use of Cerenkov radiation in the measurement of β -emitting radionuclides. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1968**, *19*, 263–271. [CrossRef]
23. Ran, C.; Zhang, Z.; Hooker, J.; Moore, A. In vivo photoactivation without "light": Use of Cerenkov radiation to overcome the penetration limit of light. *Mol. Imaging Biol.* **2012**, *14*, 156–162. [CrossRef]
24. Kotagiri, N.; Sudlow, G.P.; Akers, W.J.; Achilefu, S. Breaking the depth dependency of phototherapy with Cerenkov radiation and low-radiance-responsive nanophotosensitizers. *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10*, 370–379. [CrossRef]
25. Bulin, A.-L.; Truillet, C.; Chouikrat, R.; Lux, F.; Frochot, C.; Amans, D.; Ledoux, G.; Tillement, O.; Perriat, P.; Barberi-Heyob, M.; et al. X-ray-Induced Singlet Oxygen Activation with Nanoscintillator-Coupled Porphyrins. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 21583–21589. [CrossRef]
26. Lioret, V.; Bellaye, P.-S.; Arnould, C.; Collin, B.; Decréau, R.A. Dual Cerenkov Radiation-Induced Near-Infrared Luminescence Imaging and Photodynamic Therapy toward Tumor Resection. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 9446–9456. [CrossRef] [PubMed]
27. Cline, B.; Delahunty, I.; Xie, J. Nanoparticles to mediate X-ray-induced photodynamic therapy and Cerenkov radiation photodynamic therapy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2019**, *11*, e1541. [CrossRef] [PubMed]
28. Schneider, P.B. Determination of specific activity of ^{32}P -labeled compounds using Cerenkov counting. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **1971**, *12*, 14–16.
29. Al-Masri, M.S. Cerenkov counting technique. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Artic.* **1996**, *207*, 205–213. [CrossRef]
30. Rowińska, L.; Jaskólska, H.; Radwan, M. Aktivitätsbestimmung von Phosphor-32 mit Hilfe der Tscherenkow -Strahlung. *Isot. Isot. Environ. Health Stud.* **2008**, *11*, 223–225. [CrossRef]
31. Axelsson, J.; Davis, S.C.; Gladstone, D.J.; Pogue, B.W. Cerenkov emission induced by external beam radiation stimulates molecular fluorescence. *Med. Phys.* **2011**, *38*, 4127–4132. [CrossRef]
32. Compton, A.H. A Quantum Theory of the Scattering of X-rays by Light Elements. *Phys. Rev.* **1923**, *21*, 483–502. [CrossRef]
33. Dinesh Mayani, D. Proton therapy for cancer treatment. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **2010**, *17*, 186–190. [CrossRef] [PubMed]
34. Tanha, K.; Pashazadeh, A.M.; Pogue, B.W. Review of biomedical Čerenkov luminescence imaging applications. *Biomed. Opt. Express* **2015**, *6*, 3053. [CrossRef]
35. Volkert, W.A.; Hoffman, T.J. Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2269–2292. [CrossRef]
36. Livechart-Table of Nuclides-Nuclear Structure and Decay Data. Available online: <https://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html#dcy1> (accessed on 20 May 2021).
37. Montgomery, C.W. Electron capture. In *Geochemistry*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1998; pp. 189–190.
38. Baum, R.P. Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapiekontrolle neuroendokriner Tumore (NET) mittels Rezeptor-PET/CT und Szintigraphie. *Fortschr. Röntgenstr* **2005**, *177*. [CrossRef]
39. Krause, B.J.; Beyer, T.; Bockisch, A.; Delbeke, D.; Kotzerke, J.; Minkov, V.; Reiser, M.; Willich, N. FDG-PET/CT in der Onkologie. Leitlinie. *Nukl. Nucl. Med.* **2007**, *46*, 291–301. [CrossRef] [PubMed]
40. Biersack, H.-J.; Ezziddin, S.; Risse, J.; Bender, H.; Palmedo, H. Therapie mit Radioisotopen in der Onkologie. Palliative und kurative Ansätze. *Schmerz* **2005**, *19*, 9–17. [CrossRef] [PubMed]
41. Thieme. *Nuklearmedizin: 122 Tabellen*; Büll, U., Bares, R., Eds.; Thieme: Stuttgart, Germany, 2001.
42. Haddad, T.; Fard-Esfahani, A.; Vali, R. A review of pediatric neuroendocrine tumors, their detection, and treatment by radioisotopes. *Nucl. Med. Commun.* **2020**, *19*, 589–608. [CrossRef]
43. Bahrami-Samani, A.; Anvari, A.; Jalilian, A.R.; Shirvani-Arani, S.; Yousefnia, H.; Aghamiri, M.R.; Ghannadi-Maragheh, M. Production, Quality Control and Pharmacokinetic Studies of (^{177}Lu)-EDTMP for Human Bone Pain Palliation Therapy Trials. *Iran. J. Pharm. Res.* **2012**, *11*, 137–144. [PubMed]
44. Kessel, K.; Seifert, R.; Weckesser, M.; Roll, W.; Humberg, V.; Schlack, K.; Bögemann, M.; Bernemann, C.; Rahbar, K. Molecular analysis of circulating tumor cells of metastatic castration-resistant Prostate Cancer Patients receiving ^{177}Lu -PSMA-617 Radioligand Therapy. *Theranostics* **2020**, *10*, 7645–7655. [CrossRef] [PubMed]
45. Fischer, M.; Mödder, G. Radionuclide therapy of inflammatory joint diseases. *Nucl. Med. Commun.* **2002**, *23*, 829–831. [CrossRef]
46. Bort, G.; Gallavardin, T.; Ogden, D.; Dalko, P.I. From One-Photon to Two-Photon Probes: "Caged" Compounds, Actuators, and Photoswitches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4526–4537. [CrossRef]
47. Corrie, J.E.T.; Furuta, T.; Givens, R.; Yousef, A.L.; Goeldner, M. Photoremovable Protecting Groups Used for the Caging of Biomolecules. In *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules*; Goeldner, M., Givens, R., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005; pp. 1–94.
48. Šolomek, T.; Mercier, S.; Bally, T.; Bochet, C.G. Photolysis of ortho-nitrobenzyl derivatives: The importance of the leaving group. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 548. [CrossRef]
49. Shchemelinin, I.; Sefc, L.; Necas, E. Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol.* **2006**, *52*, 81–100.
50. Schwartz, P.A.; Murray, B.W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorganic Chem.* **2011**, *39*, 192–210. [CrossRef] [PubMed]
51. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 122. [CrossRef] [PubMed]

52. Asghar, U.; Witkiewicz, A.K.; Turner, N.C.; Knudsen, E.S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 130–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Fischer, P.M. Approved and Experimental Small-Molecule Oncology Kinase Inhibitor Drugs: A Mid-2016 Overview. *Med. Res. Rev.* **2017**, *37*, 314–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Byth, K.F.; Thomas, A.; Hughes, G.; Forder, C.; McGregor, A.; Geh, C.; Oakes, S.; Green, C.; Walker, M.; Newcombe, N.; et al. AZD5438, a potent oral inhibitor of cyclin-dependent kinases 1, 2, and 9, leads to pharmacodynamic changes and potent antitumor effects in human tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 1856–1866. [[CrossRef](#)]
55. Super-Kamiokande Official Website. Available online: <http://www-sk.icrr.u-tokyo.ac.jp/sk/index-e.html> (accessed on 26 July 2021).
56. Buschendorf, F. *Messung der Kosmischen Strahlung—Myonenlebensdauer und-Rate*; Gymnasium der Stadt Rahden: Rahden, Germany, 2012.
57. Conti, M.; Eriksson, L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: A review and a discussion. *EJNMMI Phys.* **2016**, *3*, 1379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. The luminescence of irradiated transparent media and the Čerenkov effect-I. The luminescence of aqueous solutions of radioactive isotopes. In *Proceedings of the Royal Society of London—Series A: Mathematical and Physical Sciences Website*; Royal Society: London, UK, 1997; Volume 216, pp. 90–102.
59. Mougeot, X. Erratum: Reliability of usual assumptions in the calculation of β and ν spectra. *Phys. Rev. C* **2015**, *92*. [[CrossRef](#)]
60. Mougeot, X. Reliability of usual assumptions in the calculation of β and ν spectra. *Phys. Rev. C* **2015**, *91*, 455. [[CrossRef](#)]
61. Kirschner, S.; Döbber, A.; Krebs, M.; Witt, C.; Hartke, B.; Peifer, C. The Impact of Electronic Effects on Photolysis: A Model Study on the 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl Caged N-Phenylpyrimidine-2-amine Scaffold. *ChemPhotoChem* **2020**, *4*, 638–643. [[CrossRef](#)]
62. Rodat, T.; Krebs, M.; Döbber, A.; Jansen, B.; Steffen-Heins, A.; Schwarz, K.; Peifer, C. Restricted suitability of BODIPY for caging in biological applications based on singlet oxygen generation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19*, 1319–1325. [[CrossRef](#)]
63. Alegría, A.E.; Ferrer, A.; Santiago, G.; Sepúlveda, E.; Flores, W. Photochemistry of water-soluble quinones. Production of the hydroxyl radical, singlet oxygen and the superoxide ion. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1999**, *127*, 57–65. [[CrossRef](#)]



Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2020, **19**, 1319

Restricted suitability of BODIPY for caging in biological applications based on singlet oxygen generation†

Theo Rodat,[‡] Melanie Krebs,[‡] Alexander Döbber,[‡] Björn Jansen,[‡] Anja Steffen-Heins,[‡] Karin Schwarz[‡] and Christian Peifer^{‡*}

Recent studies report the boron-dipyrromethene (BODIPY) moiety to be interesting for caging applications in photopharmacology based on its response to irradiation with wavelengths in the biooptical window. Thus, in a model study, we investigated the *meso*-methyl-BODIPY caged CDK2 inhibitor **AZD5438** and aimed to assess the usability of BODIPY as a photoremovable protecting group in photoreversible kinase inhibitor applications. Photochemical analysis and biological characterisation *in vitro* revealed significant limitations of the BODIPY-caged inhibitor concept regarding solubility and uncaging in aqueous solution. Notably, we provide evidence for BODIPY-caged compounds generating singlet oxygen/radicals upon irradiation, followed by photodegradation of the caged compound system. Consequently, instead of caging, a non-specific induction of necrosis in cells suggests the potential usage of BODIPY derivatives for photodynamic approaches.

Received 16th March 2020,
Accepted 23rd July 2020

DOI: 10.1039/d0pp00097c

rsc.li/pps

Introduction

The boron-dipyrromethene (BODIPY) moiety is known for its applications in biological chemistry as dye agents,¹ fluorescence labels^{2,3} or photosensitisers.^{2,4–7} More recently, BODIPY has been investigated in the field of photopharmacology as a photoremovable protecting group (PPG) towards caging approaches (Table 1). The BODIPY moiety responds to wavelengths above 500 nm within the biooptical window, suggesting that it is highly suitable for the caging of inhibitors in biological chemistry. In line with this notion, Umeda *et al.*, in 2014, described a BODIPY-caged histamine that can be photo-released *via* irradiation of 500 nm.⁸ Herein, the histamine leaving group was linked to the boron atom. Further studies connected a *meso*-methylhydroxy-BODIPY either directly or *via* a carbamate linker to a leaving group.^{9,10} In 2017, Slanina *et al.* evaluated the influence of substituents attached to the *meso*-methyl-BODIPY group, but without providing further biological validation.¹¹ Moreover, Sitkowska *et al.* proposed a halide substituted BODIPY linked to the

leaving group *via* a carbamate linker with fast uncaging, but with some stability restrictions in aqueous solution.¹² Similar to this approach, two publications from Kawatani *et al.* (boron-linked leaving group) and Peterson *et al.* (red light single photon PPG) in 2018 were reported.^{13,14} In 2019, Toupin *et al.* published about the use of a photocleavable BODIPY moiety combined with singlet oxygen generation for an increased efficacy in cancer cell apoptosis (Fig. 1).¹⁵

Based on our platform for photoresponsive kinase inhibitors^{16,17} and the abovementioned findings, we became interested in investigating whether BODIPY would be suitable for caging applications using a potent protein kinase inhibitor. Protein kinases mediate key roles in nearly all important processes in eukaryote cells like proliferation, migration or apoptosis. Thus, alterations of kinase activities including gain-of-function in relevant signal transduction cascades are leading to uncontrolled cell proliferation or reduced apoptosis, most importantly in the development of cancer.^{18,19} As an example for highly critical kinases, the cyclin-dependent kinases (CDKs) are essential for a functional cell cycle and transcription regulation.^{20,21} For instance, CDK2 in complex with cyclin E1 regulates the G0 to G1 and G1 to S phase transition.²²

Thus, altering the cell cycle activity *via* kinase inhibitors targeting CDK2 may be a powerful strategy against cancer.^{23,24} However, influencing such essential functions in the cell, such as proliferation, can have a crucial impact on normal cell physiology, and may thus cause fatal side effects in patients. Therefore, actually effective CDK2 inhibitor candidates are

^aInstitute of Pharmacy, Kiel University, Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel, Germany.
E-mail: cpeifer@pharmazie.uni-kiel.de

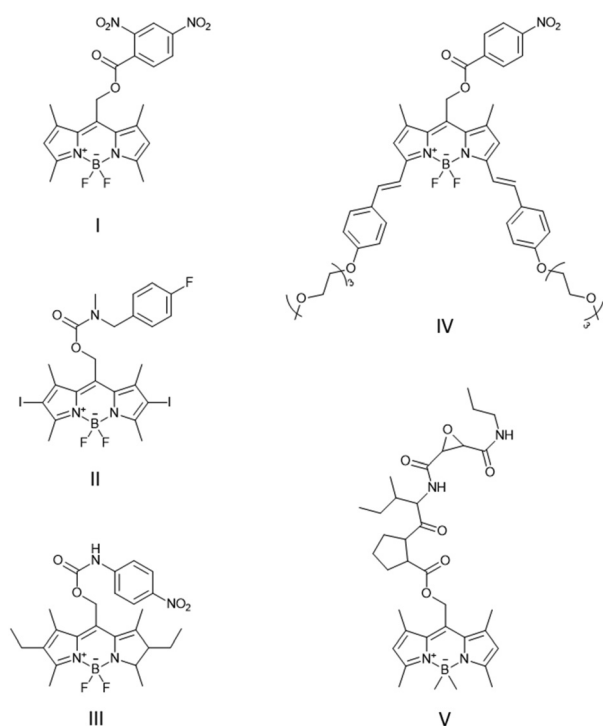
^bInstitute of Human Nutrition and Food Science, Division of Food Technology, Kiel University, Heinrich-Hecht-Platz 10, 24118 Kiel, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0pp00097c

‡ These authors contributed equally to this work.

Table 1 Comparison of current publications evaluating BODIPY as a PPG for caging

Reference	Leaving group	Linker	Activation wavelength	Biological evaluation
Umeda <i>et al.</i> ⁸	Histamine	Boron linked	500 nm	Ca ²⁺ rise in HeLa cells
Rubinstein <i>et al.</i> ⁹	4-Nitro-aniline	Carbamate	530/540 nm	Ca ²⁺ rise in HeLa cells
Goswami <i>et al.</i> ¹⁰	Acetic acids	Ester	500 nm	Compound integration of Drosophila S2 cells
Slanina <i>et al.</i> ¹¹	Different carbon acid analogues	Mostly ester	507 nm	None
Sitkowska <i>et al.</i> ¹²	Amine cargos	Carbamate	520–560 nm	None
Peterson <i>et al.</i> ¹³	Mostly carbon acid analogues	Mostly ester	635 nm	Compound integration of HeLa cells
Kawatani <i>et al.</i> ¹⁴	Capsaicin analogue	Boron linked	500 nm	Intracellular Ca ²⁺ dynamics in CaTM3
Toupin <i>et al.</i> ¹⁵	CTSB inhibitor	Ester	532 nm	CTSB Cell viability and flow cytometry of MDA-MB-231 and MCF-10A
Present work	AZD5438	Methylamine	519/525 nm	CDK2/cyclin E1 kinase Panc89 cell proliferation Caspase 3/7-mediated apoptosis

**Fig. 1** Selected cargos caged with BODIPY moieties at the *meso* position. (I) Goswami *et al.*¹⁰, (II) Sitkowska *et al.*¹², (III) Rubinstein *et al.*⁹, (IV) Peterson *et al.*¹³ and (V) Toupin *et al.*¹⁵

often not being developed further due to issues detected in clinical studies.²¹ Examples include the effective CDK2 inhibitor **AZD5438** of which clinical development was discontinued based on the appearance of severe side effects.^{25–27}

Regarding kinase inhibitors, several approaches of photochemistry and photopharmacology have been reported so far to overcome the lack of specificity of these biologically effective compounds.^{28–32} Besides caging,^{16,17,33–38} further applications use photoswitchable moieties including an azo-

benzene switch introduced in a BRAF_{V600E} inhibitor to manage the BRAF paradox.^{39–41} Another approach for regulating the VEGFR2 activity was achieved by using Axitinib as a photoreversible kinase inhibitor.⁴²

However, the wavelengths used to uncage PPGs are frequently not within the biooptical window.^{35,36} UV light only has a penetration range of millimetres in biological tissues and can additionally cause cellular apoptosis or DNA damage.^{43–47} Against this background, the BODIPY moiety would provide significant advantages towards caging as it responds to higher wavelengths within the biooptical window, thus allowing deeper tissue penetration of light.

In the present study, we aimed to use the actually effective clinical candidate CDK2 inhibitor **AZD5438** *in vivo* for caging with the BODIPY group. Our hypothesis was that the caged compound would be biologically inactive, but the potent activity of the leaving group **AZD5438** could be spatially and temporally controlled by irradiation with light of approximately 500 nm. This approach would probably provide a highly useful caged CDK2 inhibitor system, which could, for example, be employed as a photopharmacological tool.

Results and discussion

Design, synthesis and photochemical characterisation

To determine a suitable position at the inhibitor structure for the functionalisation with BODIPY as a PPG, we initially performed molecular modelling using the X-ray defined ligand complex of **AZD5438** in CDK2 with cyclin E1 (PDB: 4FKO). Herein, the ligand **AZD5438** forms key H-bonds *via* the cyclic guanidine moiety towards LEU83, an amino acid residue located in the hinge region of the kinase (Fig. 2). Thus, the binding mode suggested that the NH function is suitable for caging. In contrast, modelling the BODIPY-caged **AZD5438** into the active site of CDK2 revealed no plausible binding mode basically due to significant steric clashes (Fig. 2C).

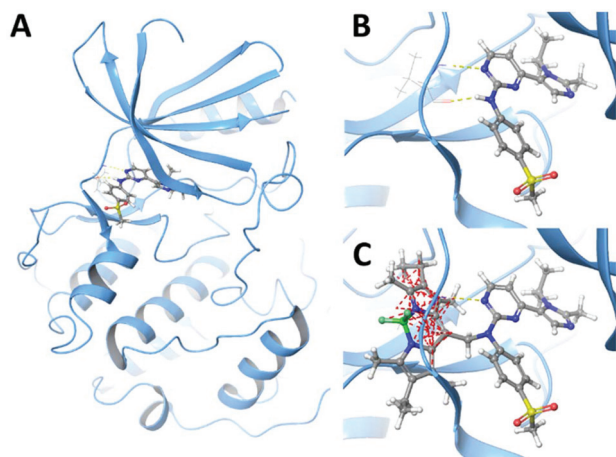
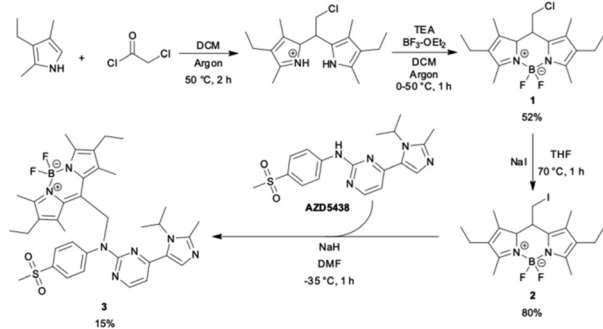


Fig. 2 Molecular modelling of CDK2 inhibitor **AZD5438** and the correspondingly caged compound **3** in the ATP binding pocket of CDK2/cyclin E1 (PDB: 4FKO). (A) Overview of CDK2 kinase structure with **AZD5438** as a ligand bound within the ATP pocket. (B) Binding mode of **AZD5438** addressing H-bonds (yellow dotted lines) to the hinge region LEU83 within the ATP pocket. (C) Superposition of BODIPY-caged **AZD5438** (compound **3**) in the CDK2 ATP binding pocket analogous to the original binding mode of the ligand. Caged compound **3** cannot bind into the binding pocket due to significant steric clashes (red dotted lines).

Furthermore, over the course of our studies towards caged kinase inhibitors, the NH moiety of the **AZD5438** pyrimidine-anilino core structure was found to be a feasible leaving group.⁴⁸

Taken together, our modelling data suggested the BODIPY caged **AZD5438** to be biologically inactive, whereas uncaging by irradiation with light of *ca.* 500 nm wavelength could cleave the BODIPY cage restoring the potent CDK2 inhibition of **AZD5438**. To prove this hypothesis, we set out to synthesise and subsequently perform the photochemical characterisation of the caged compound. Synthesis of the key BODIPY caging group **1** was achieved according to the literature^{49,50} based on a Friedel–Crafts acylation (Scheme 1).



Scheme 1 Convergent synthesis of the caged compound **3**. The BODIPY precursor **1** was synthesized by a Friedel–Crafts acylation.^{49,50} The 8-iodomethyl BODIPY **2** was achieved based on a Finkelstein reaction.⁵⁰

Herein, the starting material 3-ethyl-2,4-dimethylpyrrole as an electron-rich aromatic compound was reacted with 2-chloroacetylchloride in dry dichloromethane. After the addition of dry triethylamine and boron trifluoride diethyl etherate as Lewis acid, the reaction was left stirring for 1 h at 50 °C. A Finkelstein reaction exchanged chloride for iodide, in which sodium iodide was added to a solution of **1** in dry THF and the mixture was refluxed for 45 min to yield **2**, which was used in the following step providing a better leaving group. In turn, using a S_N reaction in dry DMF substitution of the benzylic BODIPY position by the deprotonated NH position of **AZD5438** at -35 °C yielded the key compound **3** (Scheme 1). Notably, all reactions were performed under an argon atmosphere and were protected from light.

Next, we performed photochemical characterisation in terms of the uncaging process of compound **3**. Determination of UV spectra revealed significant absorption of **3** at a wavelength of 525 nm (S_{12}^{\dagger}). Thus, we initially irradiated a 25 μ M solution of **5** in DMSO with light at this wavelength and monitored the uncaging reaction progress by HPLC analysis (Fig. 3).

The BODIPY uncaging reaction was considered to proceed *via* a cationic transition state, analogously to the coumarin caging group, although the detailed mechanism is still under discussion.^{9,12} However, in our experiments, by irradiation of **3** in aprotic DMSO solution, the decline of the BODIPY moiety in compound **3** could be clearly detected *via* adsorption at 544 nm (to avoid artefacts, a higher wavelength was chosen, see S_{13}^{\dagger}). While under the DMSO conditions, uncaging of **3** yielded **AZD5438** as determined by LC/MS analysis, and we could, in contrast, not detect a main BODIPY derivative, neither by UV adsorption nor by LC/MS analysis (S_{17}^{\dagger}). Interestingly, the situation turned out to be different under aqueous uncaging conditions and HPLC quantification could not be realised. Compared to the situation in DMSO, an aqueous solution of caged compound **3** was not quite stable even without irradiation and immediately after irradiation; the caged compound declined under the detection limit while the free inhibitor **AZD5438** was released, but not in an equimolar manner compared to **3**. Instead, irradiation resulted in a

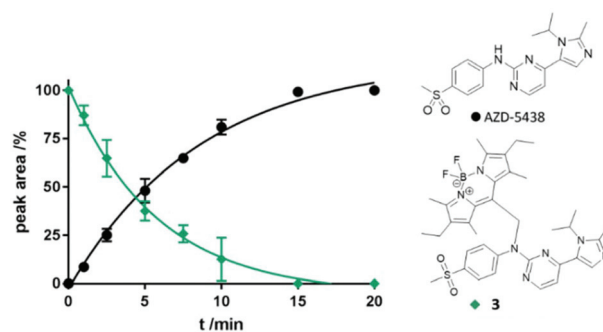


Fig. 3 Uncaging of **3** under irradiation with 525 nm in DMSO solution. 25 μ M of **3** were irradiated with 6.5 mW per cm^2 per well in a white 96-well plate. Concentrations of reaction products were quantified by HPLC. Error bars indicate SD ($N = 3$).

complex product mixture indicating nonspecific degradative reactions.

Biological evaluation

However, since **AZD5438** is partly released under irradiation with 525 nm, we decided to perform further biological *in vitro* evaluation of **3** in an enzymatic CDK2/cyclin E1 assay and CDK2-dependent Panc89 cell assay⁵¹ (Fig. 4). Accordingly to our initial hypothesis, when tested without irradiation in the enzymatic CDK2/cyclin E1 assay, caged **3** proved to be significantly less active compared to **AZD5438**. In contrast, the potent CDK2 inhibitor **AZD5438** was determined with an IC₅₀ value of 1.9 nM, which is in accordance with the data from the literature²⁵ (Fig. 4A). A similar situation was detected in our cellular assay, where caged **3** was initially less active without irradiation compared to **AZD5438** (Fig. 4C).

Unexpectedly, when we irradiated the caged compound **3** within the enzymatic assay, the results showed only minor inhibition of CDK2 activity. The biological activity of the irradiated compound **3** was actually comparable to the situation without irradiation and in sharp contrast to the potency of the

native **AZD5438** (Fig. 4A). Potential explanations may again include degradation under the aqueous assay conditions (in contrast to uncaging determined in DMSO, see Fig. 3). However, to our great astonishment, the irradiation of **3** in the cellular Panc89 assay with 525 nm resulted in a very strong biological activity (IC₅₀ = 0.026 μM). This efficacy is significantly higher compared to the potent CDK2 inhibitor **AZD5438** itself (IC₅₀ = 0.91 μM, Fig. 4C). Thus, our results indicate a bioactive role of the BODIPY moiety upon irradiation, which is in line with further recent reports.^{6,52,53} This substantial increase in potency could not be explained with additive effects of light or temperature increase due to irradiation (control experiments, S21†). To further investigate this unexpected effect, we synthesised the proposed hydroxylated BODIPY cleavage product **5** without any inhibitor attached (Scheme 2).

Having compound **5** in hand, we next tested its biological activity in the CDK2 kinase assay (no inhibition, Fig. 4B) and cellular Panc89 proliferation assay with and without irradiation by light of 525 nm (Fig. 4D). Interestingly, the inhibition of the Panc89 cells following treatment with **5** and irradiation with light (IC₅₀ = 0.022 μM) is similar to the results obtained by performing the assay using compound **3** (IC₅₀ = 0.026 μM). These results suggest the irradiated BODIPY moiety and not the potent inhibitor **AZD5438** to be mainly responsible for the strong inhibition of PANC89 cell proliferation in the assay.

Since obviously the BODIPY moiety mediated a strong bioactivity in combination with the irradiation of light with 525 nm in cells, we next set out to evaluate this effect in greater detail. First, based on the fluorescence of BODIPY, we used fluorescence microscopy to detect cellular localisation of the compound (Fig. 5B). Herein, decent cellular bioavailability was proven for **5**, which is in accordance with further reports from BODIPY derivatives detecting accumulation probably in mitochondria.^{54–56}

Additionally, the induction of apoptosis has been described related to the incubation of cells with BODIPY derivatives under irradiation, suggesting the BODIPY moiety to show a potential for photodynamic approaches.^{57–59} In line with this notion, apoptosis and, respectively, necrosis have been reported to be a common cell death path for photodynamic agents.⁶⁰ Thus, we treated Panc89 cells with compounds **3**, **5**, and **AZD5438** with and without irradiation and determined apoptosis rates *via* a bioluminescence signal of caspase 3/7 activation, respectively (Fig. 5A). Herein, **AZD5438**-treated cells showed a distinct apoptosis according to the mode of action as

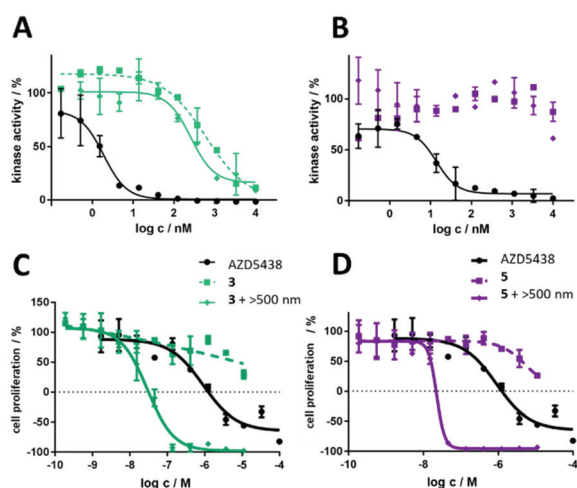
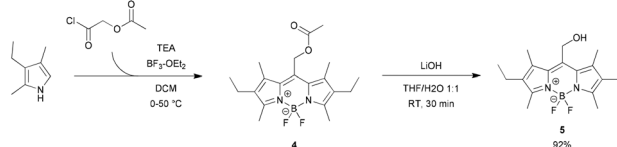


Fig. 4 Kinase assay and cell proliferation assay of CDK2 inhibitor **AZD5438**, caged **3**, and BODIPY derivative **5**. (A) Dose–response curve of **3** without irradiation (squares, green dotted line, IC₅₀ = 398 nM), **3** with 519 nm irradiation (rhomb, green line, IC₅₀ = 258 nM) and **AZD5438** as the positive control (circles, black line, IC₅₀ = 1.9 nM) on a CDK2/cyclin E1 system. (B) Dose–response curve of **5** without irradiation (purple squares), **5** with 519 nm irradiation (purple rhombs) and **AZD5438** as the positive control (circles, black line) on a CDK2/cyclin E1 system. Compounds **5** and **5** upon irradiation followed no dose-dependent inhibition. Kinase assay was performed with a final concentration of 10 μM ATP and irradiated for ten minutes, 6.5 mW per cm² per well. (C) Dose–response curve of **3** without irradiation (squares, green dotted line, IC₅₀ > 10 μM), **3** with 525 nm irradiation (rhomb, green line, IC₅₀ = 0.03 μM) and **AZD5438** as the positive control (circles, black line, IC₅₀ = 0.9 μM) in a Panc89 cell proliferation assay. (D) Dose–response curve of **5** without irradiation (squares, purple dotted line, IC₅₀ > 10 μM), **5** with 525 nm irradiation (rhomb, purple line, IC₅₀ = 0.02 μM) and **AZD5438** as the positive control (circles, black line, IC₅₀ = 0.9 μM) in a Panc89 cell proliferation assay. Well plate was irradiated for two minutes, 8.9 mW per cm² per well.



Scheme 2 Convergent synthesis of the hydroxylated BODIPY (**5**). The synthesis process was adapted from the literature.⁴⁹

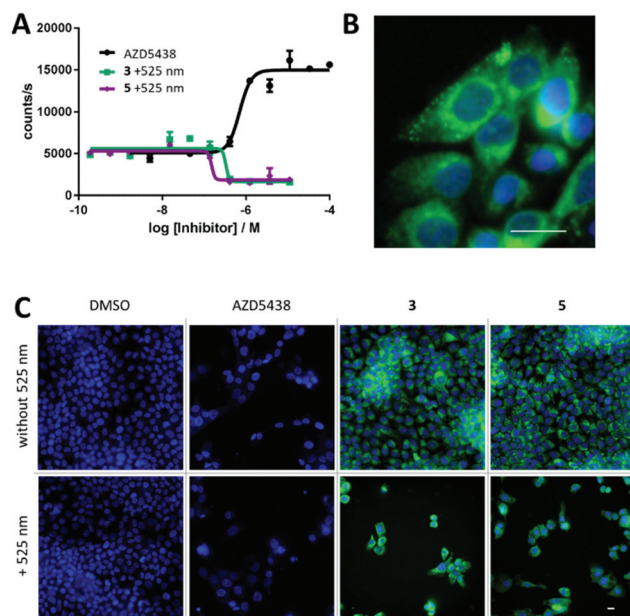


Fig. 5 Biological evaluation of **3** and **5** on Panc89 cells. (A) Caspase 3/7 assay of **3** under irradiation (squares, green line, no caspase activity) and **5** (rhombs, purple line, no caspase activity or necrosis) and **AZD5438** as the positive control (circles, black line, dose-dependent caspase activity). (B) Fluorescence microscopy of Panc89 treated with **5**. Nucleus was stained with Hoechst 333342 (blue) and compound distribution of **5** is coloured in green. Scale bar represents a length of 20 μm . (C) Fluorescence microscopy of Panc89 treated with DMSO, **AZD5438**, **3** or **5** under controlled light conditions. Scale bar at the lower right represents a total length of 70 μm .

CDK2 inhibitor. In contrast, when irradiated with light of 525 nm, Panc89 cells treated with both **3** and **5** resulted in significant necrosis. Notably, the BODIPY bearing compounds **3** and **5** do not show detectable cell death without irradiation. Images from fluorescence microscopy (Fig. 5C) further support these cell proliferation results. Cell density of Panc89 cells is highly decreased after the treatment with **3** (−93%) and **5** (−90%) under irradiation with light of 525 nm, whereas cells treated with DMSO (−14%) were seen as less light-dependent and cells treated with **AZD5438** (+1%) were seen as light-independent, respectively (S21†).

Photodegradation

Having clearly established a significant photodynamic effect of the BODIPY derivatives **3** and **5**, we aimed to elucidate the mechanical aspects of their supposed mode of action. Further evidence showed BODIPY derivatives are also known for creating reactive oxygen species under irradiation.^{5–7,56} We could demonstrate the considerable formation of short-lived radicals by ESR using the cyclic hydroxylamine TMTM after the irradiation of compound **3** at 525 nm (6A). In another test system, both **3** and **5** decreased the absorption maximum of read-out signal from 1,3-diphenylisobenzofuran under irradiation, providing further evidence for generating singlet oxygen (Fig. 6B). In DMSO, singlet oxygen generation as well

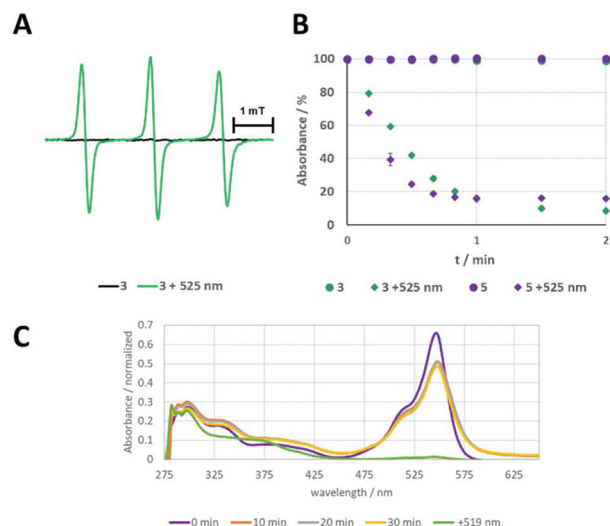


Fig. 6 Photochemical degradation of compounds **3** and **5**. (A) Electron spin resonance spectrum of the spin probe TMT in the presence of **3** without irradiation (black line) and **3** with 525 nm irradiation (green line) in DMSO, for 30 s and at an intensity of 90 mW per cm^2 per well. (B) Singlet oxygen assay. 1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF) and compounds were dissolved in DMSO. Absorption of DPBF decreases due to singlet oxygen production of **3** under irradiation (green rhombs) and **5** under irradiation (purple rhombs). **3** without irradiation (green circles) and **5** without irradiation (purple circles) have not generated singlet oxygen. Singlet oxygen quantum yields of **3** ($\phi = 0.38$) and **5** ($\phi = 0.74$) upon irradiation were determined with methylene blue ($\phi = 0.52$). (C) Absorption spectra of an aqueous solution of 0.1 mM **3** over time and under controlled light conditions. In aqueous solution, maxima decrease over time. Full deletion at 500 nm absorption was achieved at irradiation of 519 nm for 10 minutes, 6.5 mW per cm^2 per well.

as photouncaging appeared instantly upon irradiation with +500 nm (Fig. 6B vs. Fig. 3).

However, compounds **3** and **5** required only one minute of irradiation for a substantial singlet oxygen response in contrast to 15 minutes for uncaging under similar settings. Thus, it seemed that singlet oxygen generation appears preferably during the uncaging process of the BODIPY moiety. By correlating this effect to the observed cytotoxicity in Panc89 cells, we conclude that **3** and **5** produce singlet oxygen upon irradiation, thus severely damaging cells, thereby exceeding the effect of the potent CDK2 inhibitor **AZD5438**.^{61,62} Furthermore, the proposed radical mechanism provides a possible explanation for the observation of non-successful uncaging for **3** upon irradiation in the enzymatic assay (Fig. 3A). According to the production of short-lived radicals detected by ESR, we assume that the molecule decomposes, yielding a mixture of fragments instead of providing the actual CDK2 inhibitor **AZD5438**. Due to the solubility issues of **3**, photochemical characterisation was performed in DMSO yielding the uncaging of **3** without difficulties (Fig. 3). However, biological evaluation is performed in aqueous solutions at μM compound concentrations. Thus, we performed the respective experiments in aqueous solutions for **3** and **5**. Indeed, under irradiation, we observed strong photodegradation of the compounds yielding non-defined

product mixtures providing further evidence for the radical reaction processes (Fig. 5C, S16[†]).

Photodegradation has already been reported for photosensitisers, e.g. porphyrines and semi-porphyrines.⁶³ Compared to the features of these photosensitisers, solutions of compound 3 and 5 decoloured upon irradiation suggesting a type 2 photobleaching (true photobleaching) behaviour. Interestingly, not only photodegradation prevents proper photochemical characterisation in aqueous solution, but also precipitation occurring in the samples upon irradiation, probably as the result of radical polymerisation reactions. Similar to our observations, Descalzo *et al.* also reported about the aggregation and dimerisation of BODIPY moieties⁶⁴ in aqueous solutions, which are, however, indispensable for biological applications. We also observed the precipitation of 3 and 5 when water was added to a DMSO stock solution (S14[†]). Accordingly, aggregation of BODIPY moieties has been reported elsewhere to be responsible for precipitation when water was added.^{65,66} Furthermore, NMR experiments employing D₂O to investigate these effects in more detail proved to be non-successful again due to precipitation.

Conclusions

Uncaging of BODIPY-caged compounds is well established in organic solvents and could be also achieved in this work.^{9,11} However, with regard to biological evaluation in aqueous solutions, the situation turned out to be different. In line with recent reports from Sitkowska *et al.* and Takeda *et al.*, we observed unstable storage conditions for BODIPY derivatives.^{12,66} Although the BODIPY moiety is tempting for caging approaches based on its response to green light with a wavelength of >500 nm, we provide evidence for the BODIPY-caging concept being limited in an aqueous environment due to the production of singlet oxygen upon irradiation. Thus, the generated radical species mediate non-selective degradation effects. Accordingly, biological activities of BODIPY containing compounds 3 and 5 in a Panc89 cell proliferation assay turned out to be highly effective. In this assay, due to singlet oxygen generation, 3 as a caged compound is 30 times more active upon irradiation compared to the actually potent CDK2 inhibitor AZD5438. Hence, in order to avoid misinterpretation of the results for BODIPY caged compounds in biological applications, we strongly recommend investigation of BODIPY moieties case-by-case towards their potential to produce ROS upon irradiation. Whether BODIPY derivatives will be useful in photodynamic approaches remains to be seen.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We would like to thank Martin Schütt and Dr Ulrich Girreser from the Pharmaceutical Institute, Kiel, for excellent technical

and analytical assistance. We also kindly acknowledge Till Priegann for the technical support during fluorescence microscopy. Lastly, we gratefully acknowledge the Deutsche Forschungsgesellschaft for financial support (grant PE1605_2_2).

References

- M. Shah, K. Thangaraj, M.-L. Soong, L. T. Wolford, J. H. Boyer, I. R. Politzer and T. G. Pavlopoulos, *Heteroat. Chem.*, 1990, **1**(5), 389.
- X.-F. Zhang, G. Q. Zhang and J. Zhu, *J. Fluoresc.*, 2019, **29**(2), 407.
- R. Ziessel, G. Ulrich and A. Harriman, *New J. Chem.*, 2007, **31**(4), 496.
- J. Zou, Z. Yin, K. Ding, Q. Tang, J. Li, W. Si, J. Shao, Q. Zhang, W. Huang and X. Dong, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**(38), 32475.
- A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung and K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**(1), 77.
- W. M. Gallagher, L. T. Allen, C. O'Shea, T. Kenna, M. Hall, A. Gorman, J. Killoran and D. F. O'Shea, *Br. J. Cancer*, 2005, **92**(9), 1702.
- S. G. Awuah, J. Polreis, V. Biradar and Y. You, *Org. Lett.*, 2011, **13**(15), 3884.
- N. Umeda, H. Takahashi, M. Kamiya, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano and Y. Urano, *ACS Chem. Biol.*, 2014, **9**(10), 2242.
- N. Rubinstein, P. Liu, E. W. Miller and R. Weinstain, *Chem. Commun.*, 2015, **51**(29), 6369.
- P. P. Goswami, A. Syed, C. L. Beck, T. R. Albright, K. M. Mahoney, R. Unash, E. A. Smith and A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**(11), 3783.
- T. Slanina, P. Shrestha, E. Palao, D. Kand, J. A. Peterson, A. S. Dutton, N. Rubinstein, R. Weinstain, A. H. Winter and P. Klán, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**(42), 15168.
- K. Sitkowska, B. L. Feringa and W. Szymański, *J. Org. Chem.*, 2018, **83**(4), 1819.
- J. A. Peterson, C. Wijesooriya, E. J. Gehrman, K. M. Mahoney, P. P. Goswami, T. R. Albright, A. Syed, A. S. Dutton, E. A. Smith and A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**(23), 7343.
- M. Kawatani, M. Kamiya, H. Takahashi and Y. Urano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2018, **28**, 1.
- N. P. Toupin, K. Arora, P. Shrestha, J. A. Peterson, L. J. Fischer, E. Rajagurubandara, I. Podgorski, A. H. Winter and J. J. Kodanko, *ACS Chem. Biol.*, 2019, **14**(12), 2833.
- R. Horbert, B. Pinchuk, P. Davies, D. Alessi and C. Peifer, *ACS Chem. Biol.*, 2015, **10**(9), 2099.
- M. Zindler, B. Pinchuk, C. Renn, R. Horbert, A. Döbber and C. Peifer, *ChemMedChem*, 2015, **10**(8), 1335.
- P. A. Schwartz and B. W. Murray, *Bioorg. Chem.*, 2011, **39**(5–6), 192.

- 19 I. Shchemelinin, L. Sefc and E. Necas, *Folia Biol.*, 2006, **52**(3), 81.
- 20 M. Malumbres, *Genome Biol.*, 2014, **15**(6), 122.
- 21 U. Asghar, A. K. Witkiewicz, N. C. Turner and E. S. Knudsen, *Nat Rev. Drug Discovery*, 2015, **14**(2), 130.
- 22 A. C. Dar and K. M. Shokat, *Annu. Rev. Biochem.*, 2011, **80**(1), 769.
- 23 J. Cicenias and M. Valius, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2011, **137**(10), 1409.
- 24 S. Tadesse, E. C. Caldon, W. Tilley and S. Wang, *J. Med. Chem.*, 2019, **62**(9), 4233.
- 25 K. F. Byth, A. Thomas, G. Hughes, C. Forder, A. McGregor, C. Geh, S. Oakes, C. Green, M. Walker, N. Newcombe, S. Green, J. Growcott, A. Barker and R. W. Wilkinson, *Mol. Cancer Ther.*, 2009, **8**(7), 1856.
- 26 D. R. Camidge, D. Smethurst, J. Growcott, N. C. Barrass, J. R. Foster, S. Febbraro, H. Swaisland and A. Hughes, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2007, **60**(3), 391.
- 27 P. Raghavan, V. Tumati, L. Yu, N. Chan, N. Tomimatsu, S. Burma, R. G. Bristow and D. Saha, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2012, **84**, e507–e514.
- 28 C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer and A. Heckel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**(34), 8446.
- 29 M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam, W. Szymanski and B. L. Feringa, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2016, **55**(37), 10978.
- 30 A. Specht, F. Bolze, Z. Omran, J.-F. Nicoud and M. Goeldner, *HFSP J.*, 2009, **3**(4), 255.
- 31 Y. Yang, J. Mu and B. Xing, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2017, **9**(2), e1408.
- 32 H. Yu, J. Li, D. Wu, Z. Qiu and Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**(2), 464.
- 33 C. L. Fleming, M. Grötli and J. Andréasson, *ChemPhotoChem*, 2019, **45**, 4900.
- 34 A. Deiters, *ChemBioChem*, 2010, **11**(1), 47.
- 35 M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski and B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**(11), 3358.
- 36 P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov and J. Wirz, *Chem. Rev.*, 2013, **113**(1), 119.
- 37 A. Patchornik, B. Amit and R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**(21), 6333.
- 38 A. P. Pelliccioli and J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, **1**(7), 441.
- 39 W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema and B. L. Feringa, *Chem. Rev.*, 2013, **113**(8), 6114.
- 40 K. Hüll, J. Morstein and D. Trauner, *Chem. Rev.*, 2018, **118**(21), 10710.
- 41 M. W. H. Hoorens, M. E. Ourailidou, T. Rodat, P. E. van der Wouden, P. Kobauri, M. Kriegs, C. Peifer, B. L. Feringa, F. J. Dekker and W. Szymanski, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **179**, 133.
- 42 D. Schmidt, T. Rodat, L. Heintze, J. Weber, R. Horbert, U. Girreser, T. Raeker, L. Bußmann, M. Kriegs, B. Hartke and C. Peifer, *ChemMedChem*, 2018, **13**(22), 2415.
- 43 W. F. Cheong, S. A. Prahl and A. J. Welch, *IEEE J. Quantum Electron.*, 1990, **26**(12), 2166.
- 44 Y. Matsumura and H. N. Ananthaswamy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, **195**(3), 298.
- 45 S. Mallidi, S. Anbil, A.-L. Bulin, G. Obaid, M. Ichikawa and T. Hasan, *Theranostics*, 2016, **6**(13), 2458.
- 46 M. Gentile, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**(16), 4779.
- 47 J. D'Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz and T. Scott, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**(6), 12222.
- 48 S. Kirschner, A. Döbber, M. Krebs, C. Witt, B. Hartke and C. Peifer, *ChemPhotoChem*, 2020, **4**(8), 638.
- 49 F. Amat-Guerri, M. Liras, M. L. Carrascoso and R. Sastre, *Photochem. Photobiol.*, 2003, **77**(6), 577.
- 50 T. Kálai and K. Hideg, *Tetrahedron*, 2006, **62**(44), 10352.
- 51 D. Subramaniam, G. Periyasamy, S. Ponnurangam, D. Chakrabarti, A. Sugumar, M. Padigaru, S. J. Weir, A. Balakrishnan, S. Sharma and S. Anant, *Mol. Cancer Ther.*, 2012, **11**(7), 1598.
- 52 N. Adarsh, R. R. Avirah and D. Ramaiah, *Org. Lett.*, 2010, **12**(24), 5720.
- 53 T. Yogo, Y. Urano, Y. Ishitsuka, F. Maniwa and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**(35), 12162.
- 54 E. Ucar, O. Seven, D. Lee, G. Kim, J. Yoon and E. U. Akkaya, *ChemPhotoChem*, 2019, **27**, 1604053.
- 55 O. Karaman, T. Almammadov, M. Emre Gedik, G. Gunaydin, S. Kolemen and G. Gunbas, *ChemMedChem*, 2019, **14**(22), 1879.
- 56 M. Gorbe, A. M. Costero, F. Sancenón, R. Martínez-Mañez, R. Ballesteros-Cillero, L. E. Ochando, K. Chulvi, R. Gotor and S. Gil, *Dyes Pigm.*, 2019, **160**, 198.
- 57 N. Adarsh, P. S. S. Babu, R. R. Avirah, M. Viji, S. A. Nair and D. Ramaiah, *J. Mater. Chem. B*, 2019, **7**(14), 2372.
- 58 C. Wang and Y. Qian, *Org. Biomol. Chem.*, 2019, **17**(34), 8001.
- 59 R. Priefer, J. R. Griffiths, J. N. Ludwig, G. Skelhorne-Gross and R. S. Greene, *Lett. Org. Chem.*, 2011, **8**(6), 368.
- 60 P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal and M. R. Hamblin, *Cancers*, 2011, **3**(2), 2516.
- 61 Z. Zhou, J. Song, L. Nie and X. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**(23), 6597.
- 62 M. L. Agazzi, M. B. Ballatore, A. M. Durantini, E. N. Durantini and A. C. Tomé, *J. Photochem. Photobiol. C*, 2019, **40**, 21.
- 63 R. Bonnett and G. Martínez, *Tetrahedron*, 2001, **57**(47), 9513.
- 64 A. B. Descalzo, P. Ashokkumar, Z. Shen and K. Rurack, *ChemPhotoChem*, 2019, **4**(2), 120.
- 65 S. Choi, J. Bouffard and Y. Kim, *Chem. Sci.*, 2014, **5**(2), 751.
- 66 A. Takeda, T. Komatsu, H. Nomura, M. Naka, N. Matsuki, Y. Ikegaya, T. Terai, T. Ueno, K. Hanaoka, T. Nagano and Y. Urano, *ChemBioChem*, 2016, **17**(13), 1233.

The Impact of Electronic Effects on Photolysis: A Model Study on the 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl Caged *N*-Phenylpyrimidine-2-amine Scaffold

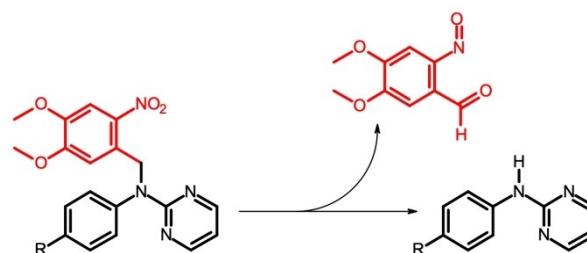
Stefan Kirschner,^[a] Alexander Döbber,^[a] Melanie Krebs,^[a] Christopher Witt,^[b] Bernd Hartke,^[b] and Christian Peifer^{*[a]}

Caging of pharmacologically active compounds is an interesting approach in biological chemistry and such photoactivatable compounds are also being developed towards novel therapeutic prodrug concepts. In this study we investigated the photolysis of the commonly used 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB) caging moiety attached to the *NH*-nitrogen of the pharmacologically relevant *N*-phenylpyrimidine-2-amine scaffold. Based on this concept, a small set of *para*-phenyl substituted derivatives with varying I/M effects (inductive/mesomeric electron-donating/withdrawing effects) was de-

signed, synthesized and parameters of the photolysis were determined. *Hammett* constants were related to photokinetic measurements, revealing electron donating effects to be unfavorable for the photolysis reaction. Our findings suggest electronic features of the entire molecule should be taken into account when considering its suitability for the caging concept. The results may also serve as a guideline to make relevant choices for DMNB applications in classical protecting group chemistry.

1. Introduction

Among photoresponsive compounds, photoactivatable “caged” ligands show an interesting potential towards novel therapeutic applications.^[1] Furthermore, caged tool compounds are highly suitable for sophisticated approaches in biological chemistry.^[2,3] The basic idea is straightforward: a photoremovable protecting group (PPG) is covalently attached to a biologically active compound at a critical position, thus rendering it pharmacologically inactive.^[4] The so-called caged compound is not capable of binding to its target, hence representing a biologically inactive prodrug as a start. However, back reaction to yield the actual bioactive compound can be achieved in a precise spatiotemporal manner by irradiation with light of appropriate wavelength so that the PPG “cage” is removed (Scheme 1).^[5,6] As an outcome of this photolysis reaction, the original compound is released and thus affinity to its biological target is restored. Upon irradiation, the photo-induced cleavage of the PPG ideally results in a rapid local concentration jump of the bioactive compound.^[7] Hence, the uncaging technique can be a powerful tool for studying both



Scheme 1. The 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB) moiety in red as an example for the concept of caging in terms of a photochemical protection group (PPG). The actual inhibitor scaffold (in black) is blocked at a crucial position (left). Triggered by irradiation, photocleavage, including a redox-reaction, occurs, in which the hybrid compound is split yielding a nitrosobenzaldehyde and the bioactive compound as leaving group.

biological processes and regulation of biological activities.^[8] Regarding applicability of photoresponsive compounds in biological setups, tissue penetration of irradiation and efficacy of photoactivation are the most critical parameters.^[9] Regardless of whether photoresponsive compounds shall be used to study biological processes or applied towards therapeutic approaches, fast, clean and specific photoactivation is indispensable.^[8] Obviously for caging, the utilized PPG represents the decisive factor, but recent studies showed that the leaving group, that is to say the actual inhibitor in the case of caged prodrugs, affects the rate of photoactivation as well.^[10–12] In this context, the photoactivation mechanism of the commonly used 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB) protecting group (Scheme 1) has been studied intensively.^[12] Accordingly, the DMNB cage has been employed to block mostly oxygen-moieties, and to a lesser extent nitrogen-moieties of bioactive compounds.^[13] Yet, beyond the nature of the

[a] S. Kirschner, Dr. A. Döbber, M. Krebs, Prof. Dr. C. Peifer
Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry
Christian-Albrechts-University of Kiel
Gutenbergstraße 76, 24118 Kiel (Germany)
E-mail: cpeifer@pharmazie.uni-kiel.de

[b] C. Witt, Prof. Dr. B. Hartke
Institute for Physical Chemistry
Christian-Albrechts-University of Kiel
Max-Eyth-Str. 2, 24118 Kiel (Germany)

© 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

attached atom, more general features of the leaving group actually affecting the photolysis reaction remain less clear.^[14]

So far only few studies address this question, including a computational study that was performed by Il'ichev et al. in 2003.^[15] Their calculated results suggest that electron-donating substituents in the benzylic position of DMNB, hence electron-donating leaving groups, can improve the photocleavage. Furthermore, in this respect in 2011 Solomek et. al. argued that radical stabilizing features of the leaving group may enhance the photoreaction.^[12] Thus, radical stabilizing characteristics of different leaving groups have been calculated by computational methods. However, wet lab experiments to determine the influence of electronic parameters of the leaving group have rarely been reported.

In chemical biology applications “uncaged” pharmacologically active compounds actually represent the so-called leaving group (see Scheme 1).^[6] In line with this notion, systematic data regarding characteristics of the leaving group would be markedly valuable against the background of designing and developing photoactivatable prodrugs. Biologically active compounds possess particular pharmacophore moieties which typically cannot be simply structurally modified without affecting important properties such as target affinity, specificity or pharmacokinetic parameters.^[16] Hence, some pharmacophores might be more suitable for the caging concept than others. In order to address this question in more detail, we aimed for an investigation using the *N*-phenylpyrimidine-2-amine scaffold regarding the photolysis reaction at the basis of the commonly used DMNB group. Particularly the *N*-phenylpyrimidine-2-amine scaffold was chosen as a suitable example as it yields more than 24.000 reference hits upon substructure search including biological studies using SciFinder®, suggesting the scaffold to be a pharmacologically interesting “leaving group” in terms of caging. Moreover, the *N*-phenylpyrimidine-2-amine scaffold appeared to be highly suitable for our projects since it is exactly the core structure present in many kinase inhibitors^[13,17] such as imatinib^[18] and others (Figure 1).

Having focused on the pharmacologically relevant *N*-phenylpyrimidine-2-amine scaffold, we asked the question if/how variations of *para*-*N*-phenyl substituents may influence the *N*-DMNB “uncaging” photolysis reaction. Thus, we designed a significant set of novel DMNB-caged *N*-phenylpyrimidine-2-amine compounds 1–9 (Scheme 2) to evaluate the impact of the inductive/mesomeric effects (+I=inductive electron-donating effect; –I=inductive electron-withdrawing effect; +M=mesomeric electron-donating effect; –M=mesomeric electron-withdrawing effect) of the different substituents on the rate of photolysis. Notably, both the *para*/*ortho*-phenyl positions could be modified in order to allow an M-effect corresponding to the benzylic position. However, in this comprehensive study we focused only on modification of the *para*-position.

2. Material and Methods

As starting material, the differently *para*-substituted compounds based on the *N*-phenylpyrimidine-2-amine scaffold

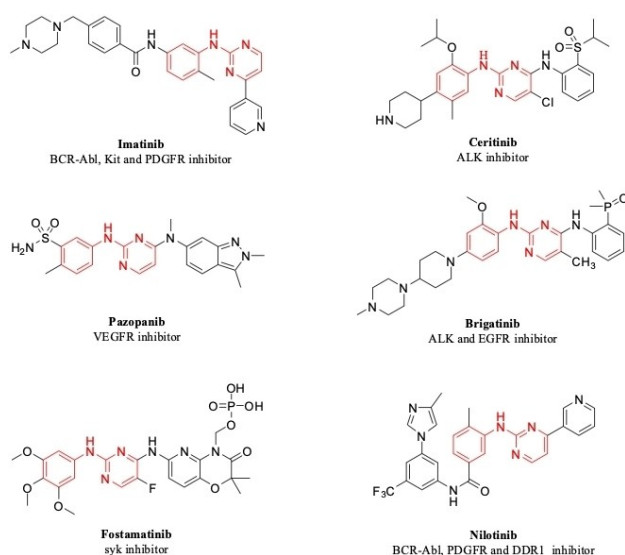
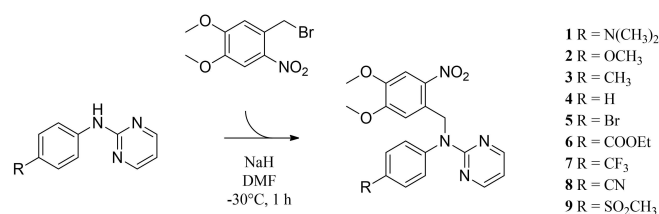


Figure 1. Examples of FDA-approved kinase inhibitors exhibiting the *N*-phenylpyrimidine-2-amine scaffold as part of the central pharmacophore unit.^[6]



Scheme 2. Design and synthesis of derivatives of the *N*-DMNB caged phenylpyrimidine-2-amine scaffold.

were prepared in compliance with literature.^[17,19–21] Next, the *N*-protection with the DMNB group was carried out by nucleophilic substitution. Accordingly, the respective starting material was *NH*-deprotonated by sodium hydride in DMF at 0°C. After cooling to –30°C, DMNB–Br was added dropwise and the reaction was left stirring for an hour. After quenching by the addition of water, the crude product was purified by flash chromatography. Importantly, light exposure was strictly to be avoided during both synthesis and purification of the caged compounds due to their home-made light sensitivity.

Having the designed set of caged compounds in hand, we aimed for their photochemical characterization. Particularly, we wanted to determine and compare the photolysis rates of compounds 1–9. In a first step, light absorbance at the wavelength respectively required for photolysis was assessed for comparable results. Higher light absorption at the respective wavelength required for photoactivation might enhance the rate of the photoreaction. However, all caged compounds in the set showed highly similar light absorption at 365 nm (see Table 1) suggesting this wavelength to be suitable for all irradiation experiments. Next, the photolysis reaction of each compound in DMSO solution was examined using a custom-made UV-LED with a suitable emission maximum at 365 nm. The concentration of the caged compounds was set to 500 μM

Table 1. Compound set and overview of results from photochemical characterization experiments in DMSO solution.

#	R	Hammett [a]	Absorbance [b]	% photo- activated ^[c]	Reaction rates ^[d]
1	-N (CH ₃) ₂	-0.83	0.123 ± 0.001	2.5 ± 0.6	0.32 ± 0.007
2	-OCH ₃	-0.27	0.118 ± 0.004	18.4 ± 1.6	2.02 ± 0.15
3	-CH ₃	-0.17	0.122 ± 0.002	19.7 ± 0.3	2.31 ± 0.13
4	-H	0	0.123 ± 0.010	29.9 ± 0.6	3.31 ± 0.03
5	-Br	0.23	0.121 ± 0.003	29.5 ± 2.2	3.27 ± 0.06
6	-COOEt	0.45	0.143 ± 0.000	37.6 ± 3.3	4.12 ± 0.33
7	-CF ₃	0.54	0.125 ± 0.007	31.3 ± 0.4	3.64 ± 0.17
8	-CN	0.66	0.123 ± 0.005	32.6 ± 0.6	3.51 ± 0.09
9	-SO ₂ CH ₃	0.72	0.115 ± 0.000	32.0 ± 0.9	3.60 ± 0.26

[a] σ_p ; [b] At 365 nm; [c] After 45 s of irradiation; [d] $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$.

in order to avoid quantification limits of the subsequent HPLC analysis. All compounds were then irradiated uniformly for 120 seconds at an emission power of 7.5 mW. Analytical samples were taken from the reaction mixture to examine the kinetic of the photoactivation reaction, respectively.

3. Results and Discussion

Conceptually, the decrease of the caged species during the photolysis reaction was considered to be a reliable determinant for the rate of photoactivation, based on a considerably low analytical error-proneness.^[10] Accordingly, plotting the declining amounts of each caged species against the irradiation time showed the photolysis reaction to give a zero-order like kinetics within the first 45 s of irradiation (Figure 2). However, photo-reaction rates slowed down after 45 s of irradiation, resulting in a flattening of the curves (Figure 2). Thus, in order to determine relevant reaction rates, the range between 0 and 45 seconds was considered to be significant and processed by a zero-order fitting. This procedure was adapted according to a similar study by Solomek et al.^[10] Notably, in contrast to their approach, we have focused only on electronic effects and thus have not calculated radical stabilizing features.

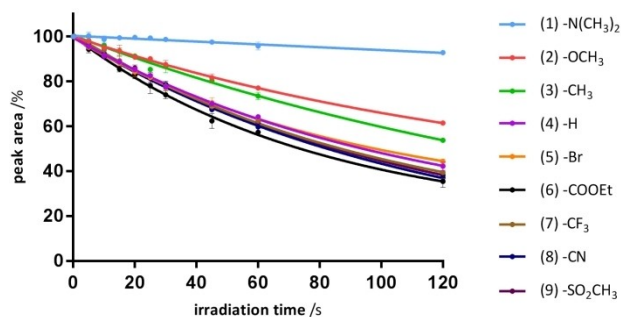


Figure 2. Photolysis reactions of compounds 1–9. Compound solutions (100 μl /500 μM in DMSO) were irradiated at 365 nm (7.5 mW) for up to 120 s. Peak areas of the respective compounds were determined by HPLC analysis at the indicated time points. Each value is expressed as mean \pm SD of two independent experiments.

In our study the reaction rates were subsequently calculated from the slopes of the zero-order fits. As a result, compared to 4 with R=H, compounds 1–3 substituted at the *para*-phenyl position with electron-donating substituents, namely dimethylamine (+M), methoxy (+M) and methyl (+I), showed significantly slower photolysis rates (Figure 2). In particular compound 1, having the very strong electron-donating dimethylamine-moiety, barely showed any photolysis at all under these conditions. In contrast, compounds 5–9 with electron-withdrawing *para*-phenyl substituents such as bromo (-I/+M), trifluoromethyl (-I), nitrile (-I/-M) or sulfonylmethyl (-I/-M) did not significantly increase the photoactivation when compared to the unsubstituted 4. In order to quantify the electronic effects within this small set of compounds, their respective Hammett constants^[22–24] and reaction rates were calculated (Table 1).

Towards an interpretation of the obtained results, the reaction rate of the H-substituted *N*-phenylpyrimidine-2-amine compound 4 was taken as the reference value (Hammett $\sigma_p = 0$). Compared to this reference point, the photolysis reaction rates are clearly decreased by the presence of electron-donating +M/+I moieties with a more negative Hammett constant (compounds 1–3). In contrast, by the presence of electron-withdrawing substituent (compounds 5–9), the photolysis reaction rates increase only marginally compared to 4. Accordingly, when plotting the respective Hammett constants σ_p versus the determined reaction rates, a distinct correlation can be discussed for negative σ_p values, but not for positive σ_p values (Figure 3).

For a more detailed interpretation of these findings, the photocleavage reaction mechanism regarding the DMNB caged scaffold is of considerable interest (Scheme 3). Herein, three critical stages can be identified in the course of the photolysis reaction.^[14]

In the first step (a), a photoinduced reversible H-atom transfer from the benzylic position to the oxygen atom of the nitro group in structure 10 occurs, leading to the aci-nitro intermediate 11. Notably, this photoinduced H-atom transfer involves an excitation of the molecule. Starting from the excited state of compound 11, two competing reactions are possible, namely a reverse H-atom transfer to rebuild 10 (b), or

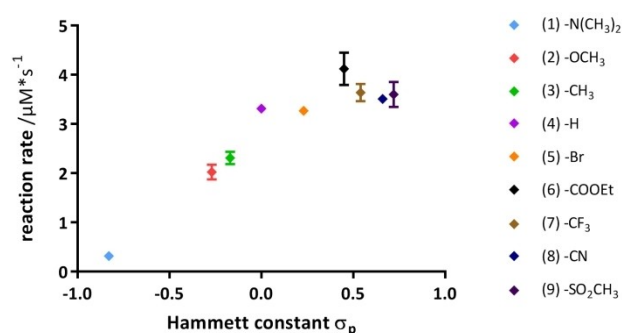
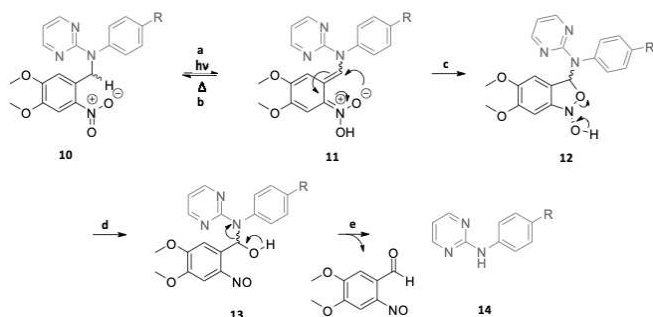


Figure 3. Correlation between the Hammett constant σ_p of the respective substituent and the experimentally determined reaction rates. Squares represent \pm SD of two independent experiments. Linear fit is shown for compounds 1–6 $R^2 = 0.995$.



Scheme 3. Proposed reaction mechanism towards photocleavage of the DMNB moiety attached to the *N*-phenylpyrimidine-2-amine scaffold. The leaving group, the respective uncaged scaffold, is shown in grey. The relevant proton for the H-atom transfer at the benzylic position is particularly depicted in structure 10.

a ground stage *Michael*-addition-like cyclization to form the isoxazole derivative 12 (c). Importantly, as the cyclization step (c) is irreversible, this ultimately results in subsequent DMNB-leaving group cleavage. Thus, the isoxazole ring opening (d) towards the nitroso intermediate 13 then leads to the final release of the actual leaving group scaffold 14 (e), and of dimethoxy-*o*-nitrosobenzaldehyde as a by-product.

Since starting from the key intermediate 11, both the reaction paths (photocleavage towards 12 or relaxation back to 10) are possible, corresponding steps a–c were considered to be mechanistically determining for the reaction rates of the photolysis.^[12] During steps a–c the benzylic carbon directly bound to the nitrogen atom of the leaving group is in the center of action. Accordingly, a significant electronic effect is exerted on the benzylic carbon by the adjacent free ion pair of the vicinal nitrogen, which is further affected by both the pyrimidine ring as well as by the phenyl ring with the substituents in the para-position. Thus, an electron-donating substituent is able to increase the electron density at the nitrogen considerably, resulting in an enlarged electron density of the adjacent benzylic carbon. Consequently, the nucleophilic attack of the oxygen (c) to form the isoxazole derivative 12 will be diminished, potentially resulting in a shift towards the reverse H-atom transfer (b) to re-form the starting material 10. Accordingly to our experimental results, this mechanism might explain the significantly decreased photolysis reaction rates of the caged compounds 1–3 which are equipped with electron-donating substituents. Vice versa, electron-withdrawing substituents in the phenyl para-position should consequently enhance the photocleavage.

In order to provide further evidence for the relevance of these electronic correlations, we performed DFT calculations assessing partial charges at the DMNB-attached nitrogen atom (Table 2). Herein, electronic density at the *N*-atom for +*M*/*I* substituents was more negatively charged whereas less negative values were calculated for –*M*/*I* substituents. Thus, these data correlate with the mechanistical context discussed above. However, the differences in the partial charges are very small and possibly not sufficiently significant. Instead, we suspect that similar substituent influences may have a stronger effect

Table 2. Partial charges^[26] on the amine nitrogen atom in the negatively charged intermediate of the scaffold calculated using the Gaussian 16 software suite^[27] at B3LYP/aug-cc-pVDZ level of theory.

cpd #	–R	Hirshfeld	CM5
1	N(CH ₃) ₂	–0.260729	–0.423510
2	OCH ₃	–0.260478	–0.423338
3	CH ₃	–0.260177	–0.422949
4	H	–0.259213	–0.422165
5	Br	–0.257799	–0.420975
6	COOEt	–0.246601	–0.410363
7	CF ₃	–0.252699	–0.416260
8	CN	–0.248391	–0.412217
9	–SO ₂ CH ₃	–0.249003	–0.412861

on energy differences between electronic states, i.e., on the excitation wavelengths, while still resulting in similar observable phenomena. To check this hypothesis reliably, high-level quantum mechanical excited-state calculations are needed, which are beyond the scope of the present work.

Interestingly, the reaction rates of the caged scaffolds 5–9 possessing electron-withdrawing substituents are not increased significantly compared to the H-substituted caged scaffold 4 (although a decent trend is discernible). These results are in line with data from Burdette, Brown and Kennedy^[25] where it is shown that similar effects on photocleavage also apply for electron-donating/withdrawing effects in the leaving group. Regarding a possible interpretation, the electron-withdrawing character of the attached electron deficient pyrimidine ring system might be the reason. Herein, the free ion pair of the relevant DMNB-attached nitrogen is already delocalized in a cyclic guanidine moiety resulting in a basically weak electron density at both the nitrogen atom and the benzylic carbon. Thus, by presence of –*M*/*I* substituents, the electron-withdrawing effect might be levelled by the already present pyrimidine ring, resulting in overall similar photolysis reaction rates for relevant –*M*/*I* substituted compounds.

In further experiments, it has to be shown if the objected kinetics may apply for protic solvents as well. As the compounds are hardly soluble in water, the experiments need to be performed by adding sufficient DMSO or for example methanol.

4. Conclusions

The photoactivatable “caged” compounds approach is interesting both for biological chemistry and for novel therapeutic prodrug concepts. In our study we focused on the photolysis of the commonly used DMNB caging moiety attached to the nitrogen of the pharmacologically relevant *N*-phenylpyrimidine-2-amine scaffold. In order to investigate the impact of electronic parameters of the leaving “uncaged” compound, we designed and synthesized a small set of *para*-phenyl substituted derivatives with varying *I*/*M* effects. Photokinetic measurements and correlation with *Hammett* constants revealed electron donating substituents to be unfavorable for photolysis. On the other hand, electron-withdrawing effects on photolysis could not be further differentiated probably due to the

presence of an electronically levelling cyclic guanidine moiety already yielding relatively fast cleavage reactions. Relating to the original hypothesis, we conclude that biological active derivatives possessing the *N*-phenylpyrimidin-2-amine scaffold equipped with electron-donating substituents are unfavorable in terms of caging when the DMNB protecting group is used. Importantly, our findings suggest the whole molecule should be electronically considered regarding its suitability for the caging concept. Beyond these biological caging approaches, our results may also serve as a guideline to make choices for applications in classical protecting group chemistry.

Experimental Section

Chemical Synthesis

All reactions and purifications were carried out under controlled light conditions to avoid unwanted photolysis of the products.

General method for caging of the 2-aminopyrimidines (1–9)

Sodium hydride (1.2 equiv.) was dissolved in 5 ml of dry DMF under an argon atmosphere. After cooling it to 0 °C, the respective *N*-phenylpyrimidin-2-amine (1.0 equiv.) dissolved in 3 ml of dry DMF, was added to the reaction by the drop. After 1 h, the reaction was cooled to –35 °C and the DMNB bromide (1.1 equiv.) dissolved in 3 ml of dry DMF, was added to the reaction by the drop. After stirring at –35 °C for 1 h, the reaction was quenched by slow addition of H₂O. After 1 h, the reaction was filtrated. The precipitate was purified by flash chromatography (stationary phase and eluent given for each compound, respectively) to afford the caged product.

*N*1-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-*N*4,*N*4-dimethyl-*N*1-(pyrimidin-2-yl)benzene-1,4-diamine (1). The compound was synthesized according to the general procedure. Purification was achieved by flash chromatography with a gradient of ethyl acetate and petroleum ether to afford 1 as a yellow solid (yield 70%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.87 (s, 6H), 3.69 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 5.43 (s, 2H), 6.68–6.74 (m, 3H), 6.99 (s, 1H), 7.15 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 2H) 7.62 (s, 1H), 8.32 (d, ³J_{HH} = 4.7 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 40.3, 51.5, 55.9, 56.0, 108.2, 110.5, 111.4, 112.7, 127.8, 129.1, 132.7, 140.3, 147.2, 148.5, 152.9, 157.8, 161.7 ppm HRMS (ESI): *m/z* = 410.18214 [M + H]⁺ (calc. *m/z* = 410.18228).

N-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)pyrimidin-2-amine (2). The compound was synthesized according to the general procedure. Purification was achieved by flash chromatography with a gradient of ethyl acetate and petroleum ether to afford 2 as a bright yellow solid (yield 62%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.69 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 5.46 (s, 2H), 6.76 (t, ³J_{HH} = 4.7 Hz, 1H), 6.91 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 1H), 6.98 (s, 1H), 7.27 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 8.34 (d, ³J_{HH} = 4.7 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 51.4, 55.2, 55.9, 56.0, 108.2, 110.6, 111.7, 114.2, 128.4, 128.8, 136.5, 140.3, 147.2, 152.9, 157.1, 157.9, 161.5 ppm. HRMS (ESI): *m/z* = 397.15062 [M + H]⁺ (calc. *m/z* = 397.15065).

N-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-*N*-(*p*-tolyl)pyrimidin-2-amine (3). The compound was synthesized according to the general procedure. Purification was achieved by flash chromatography with a gradient of ethyl acetate and petroleum ether to afford 3 as a bright yellow solid (yield 65%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.28 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 5.50 (s, 2H), 6.78 (t, ³J_{HH} =

4.8 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.16 (d, ³J_{HH} = 8.1 Hz, 2H), 7.26 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 8.35 (d, ³J_{HH} = 4.7 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20.5, 51.3, 55.9, 26.0, 108.3, 110.4, 112.0, 126.7, 128.9, 129.4, 134.9, 140.2, 141.1, 147.2, 152.9, 157.9, 161.3 ppm. HRMS (ESI): *m/z* = 381.15560 [M + H]⁺ (calc. *m/z* = 381.15573).

N-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-*N*-phenylpyrimidin-2-amine (4). The compound was synthesized according to the general procedure. Purification was achieved by RP flash chromatography with a gradient of methanol and water to afford 4 as a bright yellow solid (yield 40%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.66 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 5.53 (s, 2H), 6.80 (t, ³J_{HH} = 4.7 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.16–7.22 (m, 1H), 7.33–7.40 (m, 4H), 7.64 (s, 1H), 8.97 (d, ³J_{HH} = 4.7 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 51.2, 55.9, 56.0, 108.3, 110.4, 112.2, 125.6, 126.8, 128.9, 128.9, 140.2, 143.7, 147.2, 153.9, 157.9, 161.2 ppm. HRMS (ESI): *m/z* = 367.13991 [M + H]⁺ (calc. *m/z* = 367.1408).

N-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-*N*-(*p*-tolyl)pyrimidin-2-amine (5). The compound was synthesized according to the general procedure. Purification was achieved by flash chromatography with a gradient of ethyl acetate and petroleum ether to afford 5 as a bright yellow solid (yield 54%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.66 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 5.53 (s, 2H), 6.84 (t, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 7.36 (d, ³J_{HH} = 9.0 Hz, 2H), 7.53 (d, ³J_{HH} = 9.0 Hz, 2H), 7.64 (s, 1H), 8.39 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 50.9, 55.9, 56.0, 108.3, 110.3, 112.6, 117.8, 128.6, 128.8, 131.7, 140.2, 142.9, 147.3, 153.0, 158.0, 160.9 ppm. HRMS (ESI): *m/z* = 445.05035 [M + H]⁺ (calc. *m/z* = 445.05059).

Ethyl 4-((4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-(pyrimidin-2-yl)amino)benzoate (6). The compound was synthesized according to the general procedure. Purification was achieved by flash chromatography with a gradient of ethyl acetate and petroleum ether to afford 6 as a dark yellow solid (yield 73%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.30 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.29 (q, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2H), 5.62 (s, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.91 (t, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 1H), 7.56 (d, ³J_{HH} = 8.7 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.92 (d, ³J_{HH} = 8.7 Hz, 1H), 8.45 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 14.1, 50.8, 55.9, 56.0, 60.5, 108.4, 110.0, 113.3, 125.5, 126.0, 128.7, 129.8, 140.1, 147.2, 147.9, 153.1, 158.1, 160.8, 165.2 ppm. HRMS (EI): *m/z* = 438.15296 M⁺ (calc. *m/z* = 438.15393).

N-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrimidin-2-amine (7). The compound was synthesized according to the general procedure. Purification was achieved by flash chromatography with a gradient of ethyl acetate and petroleum ether to afford 7 as a bright yellow solid (yield 54%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.93 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 5.62 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.91 (t, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 1H), 7.66–7.72 (m, 5H), 8.45 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 50.9, 55.9, 56.0, 108.5, 110.0, 113.3, 122.4, 125.2, 125.9, 126.4, 128.6, 140.1, 147.2, 147.3, 153.1, 158.1, 160.8 ppm. HRMS (ESI): *m/z* = 435.12750 [M + H]⁺ (calc. *m/z* = 435.12747).

N-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-*N*-(4-cyanophenyl)pyrimidin-2-amine (8). The compound was synthesized according to the general procedure. Purification was achieved by flash chromatography with a gradient of ethyl acetate and petroleum ether to afford 8 as a bright yellow solid (yield 57%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.61 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 5.64 (s, 2H), 6.81 (s, 1H), 6.95 (t, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 1H), 7.63 (d, ³J_{HH} = 8.7 Hz, 2H), 7.68 (s, 1H), 7.78 (d, ³J_{HH} = 8.7 Hz, 2H), 8.47 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 50.7, 55.9, 56.0, 106.7, 108.5, 109.9, 113.8, 118.8, 125.9, 128.5, 132.8, 140.1, 147.3, 147.8, 153.1, 158.2, 160.6 ppm. HRMS (ESI): *m/z* = 392.13510 [M + H]⁺ (calc. *m/z* = 392.13533).

N-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)pyrimidin-2-amine (**9**). The compound was synthesized according to the general procedure. Purification was achieved by RP flash chromatography with a gradient of methanol and water to afford **9** as a bright yellow solid (yield 60%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.22 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 5.64 (s, 2H), 6.84 (s, 1H), 6.94 (t, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 1H), 7.70 (m, 3H), 7.88 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 2H), 8.47 (d, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 2H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 43.6, 51.0, 56.0, 56.0, 108.5, 109.8, 133.6, 126.0, 127.8, 128.7, 136.5, 140.0, 147.3, 148.2, 153.2, 158.2, 160.7 ppm. HRMS (ESI): *m/z* = 467.09947 [M + Na]⁺ (calc. *m/z* = 467.09958); 445.11744 [M + H]⁺ (calc. *m/z* = 445.11763).

UV/Vis Absorption Spectra

Spectra were recorded on UV/Vis spectrophotometer Varian Cary® 50 Scan, Agilent Technologies. UV/Vis absorbance was measured in DMSO at compound concentration of 25 μM, relatively.

Photolysis Experiments

Compounds **3–11** were dissolved in DMSO (500 μM). 100 μL of each solution were irradiated in one well of a 96-well plate at 365 nm (LED source: 16x Nichia NCSU276 A U365, Sahlmann Photochemical Solutions) with 7.5 mW. After 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 and 120 seconds, samples were taken and analyzed by HPLC at a wavelength of 296 nm without further dilution. Each sample was analyzed in duplicate.

HPLC Analysis

High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed with a Hewlett Packard 1050 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) for monitoring of the reaction progress, purity control and peak area determination of photochemical characterizations and stability experiments. Used column: STAGROMA® C18, 5 μm (125·4 mm, Stagroma AG, Reinach, Switzerland). The injection volume was 20 μL. Depending on the compounds to be separated, different gradients of acetonitrile and KH₂PO₄ buffer (10 mM, pH 2.3) were used as the mobile phase with a fixed flow rate (1.5 ml·min⁻¹). UV detection was achieved at 296 nm.

Acknowledgements

Financial support by DFG (grant PE1605_2_2) is gratefully acknowledged.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: caged compounds · electronic effects · kinase inhibitors · photoactivation · photolysis

- [1] W. A. Velema, W. Szymanski, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2178.
- [2] B. Curten, P. H. M. Kullmann, M. E. Bier, K. Kandler, B. F. Schmidt, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 641.
- [3] G. Bort, T. Gallavardin, D. Ogden, P. I. Dalko, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 4526.
- [4] P. Klan, T. Solomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Pobik, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119.
- [5] A. Y. Vorob'ev, T. Y. Dranova, A. E. Moskalensky, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13421.
- [6] J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 445.
- [7] F. Palma-Cerda, G. Papageorgiou, B. Barbour, C. Auger, D. Ogden, *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 465.
- [8] G. C. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619.
- [9] H. M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409.
- [10] R. Horbert, B. Pinchuk, P. Davies, D. Alessi, C. Peifer, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2099.
- [11] L. Kammari, T. Solomek, B. P. Ngoy, D. Heger, P. Klan, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11431.
- [12] T. Solomek, S. Mercier, T. Bally, C. G. Bochet, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 548.
- [13] C. Zhang, G. Bollag, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2010**, *20*, 79.
- [14] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441.
- [15] Y. V. Il'ichev, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 10159.
- [16] S. Mignani, J. Rodrigues, H. Thomas, R. Jalal, P. P. Singh, J.-P. Majoral, R. A. Vishwakarma, *Drug Discovery Today*, **2018**, *23*, 605.
- [17] Y. C. Lv, M. Li, S. Cao, L. Tong, T. Peng, L. Wei, H. Xie, J. Ding, W. Duan, *MedChemComm* **2015**, *6*, 1375.
- [18] M. Zindler, C. Renn, B. Pinchuk, R. Horbert, A. Döbber, C. Peifer, *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1335.
- [19] X. W. Hao, J. Yuan, G.-A. Yu, M.-Q. -Qiu, N.-F. She, Y. Sun, C. Zhao, S.-L. Mao, J. Yin, S.-H. Liu, *J. Organomet. Chem.* **2012**, *706*, 99.
- [20] J. W. Shaw, D. H. Grayson, I. Rozas, *Arkivoc* **2014**, 161.
- [21] H. Jiang, S. Gao, J. Xu, X. Wu, A. Lin, H. Yao, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 188.
- [22] J. K. Seydel, *Mol. Pharmacol.* **1966**, *2*, 259.
- [23] M. H. Khan, *ACS Omega* **2018**, *3*, 2773.
- [24] C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165.
- [25] D. P. Kennedy, D. C. Brown, S. C. Burdette, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4486.
- [26] A. V. Marenich, S. V. Jerome, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 2, 527.
- [27] Gaussian 16, Revision A.03, **2016**. Cite this work as: Gaussian 16, Revision A.03, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

Manuscript received: December 11, 2019
Revised manuscript received: March 16, 2020
Accepted manuscript online: April 13, 2020
Version of record online: April 28, 2020

8 Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Peifer im Fachbereich Pharmazeutische und Medizinische Chemie des Pharmazeutischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Zeitraum von Mai 2018 bis Januar 2023 angefertigt.

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

Kiel, 12.01.2023

Melanie Busse

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Hilfe und Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Als erstes danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Peifer für das interessante Thema und die gute Betreuung während der Promotion. Durch seine mitreißende Begeisterung für die Pharmazie haben mir die Jahre in seinem Arbeitskreis besonders Freude gemacht. Vielen Dank dass ich Teil davon sein durfte! Darüber hinaus möchte ich mich noch besonders für das Verständnis und die Unterstützung durch meine Schwangerschaft und den späteren erzwungenen Umzug bedanken. Es ist nicht selbstverständlich und ich danke ihm vom ganzem Herzen, dass er es trotzdem möglich machte, dass ich meine Promotion beenden kann.

Desweiteren möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Maaz Zuhayra aus der Nuklearmedizin für die schöne Zeit danken. Die Gespräche waren stets lehrreich und interessant und ich habe sie immer genossen. Zudem werde ich wohl nie vergessen, wie er mich sehr spät am Abend aus dem Innenhof befreien musste, wo ich mich, ganz vertieft in meine Versuche, aus Versehen eingeschlossen habe.

Meinem gesamtem Arbeitskreis mit Björn, Britta, Clemens, Dorian, Joana, Linda, Lydia, Stefan und Theo möchte ich für den guten Zusammenhalt und die schönen gemeinsamen Aktivitäten danken. Besonders Martin als das Herz des Arbeitskreises möchte ich für all die netten Gespräche und die Unterstützung danken. Sei es bei synthetischen Fragen, oder bei vor Ort Unterstützung meiner Online-Lehre. Auch meinen beiden HiWis Vivien Kühn und Johanna Kelm danke ich für ihren Beitrag.

Dem DESY-Forschungszentrum danke ich für die Bereitstellung der Kamiokanone und den Tipps für dessen Auswertung.

Darüber hinaus danke ich der deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner wundervollen Familie, dass sie mich immer bei allem, was ich mir vorgenommen habe, unterstützt. Sei es beim Korrekturlesen meiner Arbeit, oder Aufpassen auf Marlene wenn ich dann doch mal wieder nach Kiel möchte.

Am Ende danke ich meinem Ehemann Mattis für die jahrelange Unterstützung die sich später auf intensive Wochenendbetreuung unserer Tochter ausweitete, sodass ich am Wochenende durcharbeiten konnte, wenn Marlene in der Woche mal wieder keine Lust auf die Krippe hatte.

Literatur

- ¹ Edgar Uhl, Friederike Wolff, Sriyash Mangal, Henry Dube, and Esther Zanin. Light-controlled cell-cycle arrest and apoptosis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 60(3):1187–1196, 2021.
- ² Clara Brieke, Falk Rohrbach, Alexander Gottschalk, Günter Mayer, and Alexander Heckel. Light-controlled tools. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(34):8446–8476, 2012.
- ³ James M. Ritter, R. J. Flower, Graeme Henderson, Yoon Kong Loke, David J. MacEwan, and H. P. Rang. *Rang and Dale's Pharmacology*. Elsevier, Edinburgh, ninth edition edition, 2020.
- ⁴ David J. Huggins, Woody Sherman, and Bruce Tidor. Rational approaches to improving selectivity in drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(4):1424–1444, 2012.
- ⁵ Willem A. Velema, Wiktor Szymanski, and Ben L. Feringa. Photopharmacology: Beyond proof of principle. *Journal of the American Chemical Society*, 136(6):2178–2191, 2014.
- ⁶ I. Ralph Edwards and Jeffrey K. Aronson. Adverse drug reactions: Definitions, diagnosis, and management. *The Lancet*, 356(9237):1255–1259, 2000.
- ⁷ Michael M. Lerch, Mickel J. Hansen, Gooitzen M. van Dam, Wiktor Szymanski, and Ben L. Feringa. Emerging targets in photopharmacology. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 55(37):10978–10999, 2016.
- ⁸ Günter Mayer and Alexander Heckel. Biologically active molecules with a “light switch”. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(30):4900–4921, 2006.
- ⁹ Petr Klán, Tomáš Šolomek, Christian G. Bochet, Aurélien Blanc, Richard Givens, Marina Rubina, Vladimir Popik, Alexey Kostikov, and Jakob Wirz. Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: Reaction mechanisms and efficacy. *Chemical Reviews*, 113(1):119–191, 2012.
- ¹⁰ Graham C. R. Ellis-Davies. Caged compounds: Photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nature Methods*, 4(8):619–628, 2007.

- ¹¹ John D’Orazio, Stuart Jarrett, Alexandra Amaro-Ortiz, and Timothy Scott. Uv radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6):12222–12248, 2013.
- ¹² Yasuhiro Matsumura and Honnavara N. Ananthaswamy. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(3):298–308, 2004.
- ¹³ M. Gentile. Cell cycle arrest and apoptosis provoked by uv radiation-induced dna damage are transcriptionally highly divergent responses. *Nucleic Acids Research*, 31(16):4779–4790, 2003.
- ¹⁴ M. Jeffrey Maisels and Antony F. McDonagh. Phototherapy for neonatal jaundice. *The New England journal of medicine*, 358(9):920–928, 2008.
- ¹⁵ Victor Gold, editor. *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Research Triangle Park, NC, 2019.
- ¹⁶ Katharina Hüll, Johannes Morstein, and Dirk Trauner. In vivo photopharmacology. *Chemical reviews*, 118(21):10710–10747, 2018.
- ¹⁷ Linda Heintze, Dorian Schmidt, Theo Rodat, Lydia Witt, Julia Ewert, Malte Kriegs, Rainer Herges, and Christian Peifer. Photoswitchable azo- and diazocine-functionalized derivatives of the vegfr-2 inhibitor axitinib. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 2020.
- ¹⁸ Dorian Schmidt, Theo Rodat, Linda Heintze, Jantje Weber, Rebecca Horbert, Ulrich Girreser, Tim Raeker, Lara Bußmann, Malte Kriegs, Bernd Hartke, and Christian Peifer. Axitinib: A photoswitchable approved tyrosine kinase inhibitor. *ChemMedChem*, 13(22):2415–2426, 2018.
- ¹⁹ J. H. Kaplan, B. Forbush, and J. F. Hoffman. Rapid photolytic release of adenosine 5’-triphosphate from a protected analogue: Utilization by the na:k pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry*, 17(10):1929–1935, 1978.
- ²⁰ Jason S. Wood, Mary Koszelak, Judy Liu, and David S. Lawrence. A caged protein kinase inhibitor. *Journal of the American Chemical Society*, 120(28):7145–7146, 1998.
- ²¹ T. M. Gomez and N. C. Spitzer. In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature*, 397(6717), 1999.

- ²² H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, and H. Okamoto. Photo-mediated gene activation using caged rna/dna in zebrafish embryos. *Nature genetics*, 28(4):317–325, 2001.
- ²³ Gerard Marriott, Partha Roy, and Kenneth Jacobson. [11] preparation and light-directed activation of caged proteins, 2003.
- ²⁴ Srinivas Kantevari, Masanori Matsuzaki, Yuya Kanemoto, Haruo Kasai, and Graham C. R. Ellis-Davies. Two-color, two-photon uncaging of glutamate and gaba. *Nature Methods*, 7(2):123–125, 2010.
- ²⁵ Hannah W. Mbatia, H. M. Dhammika Bandara, and Shawn C. Burdette. Cuprocleav-1, a first generation photocage for cu+. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 48(43):5331–5333, 2012.
- ²⁶ Allison R. Morckel, Hrvoje Lusic, Laila Farzana, Jeffrey A. Yoder, Alexander Deiters, and Nanette M. Nascone-Yoder. A photoactivatable small-molecule inhibitor for light-controlled spatiotemporal regulation of rho kinase in live embryos. *Development (Cambridge, England)*, 139(2):437–442, 2012.
- ²⁷ Alexander Döbber, Athena F. Phoa, Ramzi H. Abbassi, Brett W. Stringer, Bryan W. Day, Terrance G. Johns, Mohammed Abadleh, Christian Peifer, and Lenka Munoz. Development and biological evaluation of a photoactivatable small molecule microtubule-targeting agent. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 8(4):395–400, 2017.
- ²⁸ Cassandra L. Fleming, Morten Grøtli, and Joakim Andréasson. On-command regulation of kinase activity using photonic stimuli. *ChemPhotoChem*, 3(6):318–326, 2019.
- ²⁹ Haitao Yu, Jinbo Li, Dongdong Wu, Zhenjun Qiu, and Yan Zhang. Chemistry and biological applications of photo-labile organic molecules. *Chemical Society Reviews*, 39(2):464–473, 2010.
- ³⁰ Anna Paola Pelliccioli and Jakob Wirz. Photoremovable protecting groups: Reaction mechanisms and applications. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 1(7):441–458, 2002.
- ³¹ John E. T. Corrie, Andreas Barth, V. Ranjit N. Munasinghe, David R. Trentham, and Michael C. Hutter. Photolytic cleavage of 1-(2-nitrophenyl)ethyl ethers involves two parallel pathways and product release is rate-limited by decomposition of a common hemiacetal intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 125(28):8546–8554, 2003.

- ³² Mickel J. Hansen, Willem A. Velema, Michael M. Lerch, Wiktor Szymanski, and Ben L. Feringa. Wavelength-selective cleavage of photoprotecting groups: Strategies and applications in dynamic systems. *Chemical Society Reviews*, 44(11):3358–3377, 2015.
- ³³ Florian Schäfer, Khashti Ballabh Joshi, Manuela A. H. Fichte, Timo Mack, Josef Wachtveitl, and Alexander Heckel. Wavelength-selective uncaging of da and dc residues. *Organic letters*, 13(6):1450–1453, 2011.
- ³⁴ Alexandre Rodrigues-Correia, Xenia M. M. Weyel, and Alexander Heckel. Four levels of wavelength-selective uncaging for oligonucleotides. *Organic letters*, 15(21):5500–5503, 2013.
- ³⁵ Theo Rodat, Melanie Krebs, Alexander Döbber, Björn Jansen, Anja Steffen-Heins, Karin Schwarz, and Christian Peifer. Restricted suitability of bodipy for caging in biological applications based on singlet oxygen generation. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 19(10):1319–1325, 2020.
- ³⁶ Aoi Takeda, Toru Komatsu, Hiroshi Nomura, Masamitsu Naka, Norio Matsuki, Yuji Ikegaya, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Tetsuo Naganano, and Yasuteru Urano. Unexpected photo-instability of 2,6-sulfonamide-substituted bodipys and its application to caged gaba. *ChemBioChem*, 17(13):1233–1240, 2016.
- ³⁷ Rebecca Horbert, Boris Pinchuk, Paul Davies, Dario Alessi, and Christian Peifer. Photoactivatable prodrugs of antimelanoma agent vemurafenib. *ACS Chemical Biology*, 10(9):2099–2107, 2015.
- ³⁸ Xiaohu Ouyang, Ilya A. Shestopalov, Surajit Sinha, Genhua Zheng, Cameron L. W. Pitt, Wen-Hong Li, Andrew J. Olson, and James K. Chen. Versatile synthesis and rational design of caged morpholinos. *Journal of the American Chemical Society*, 131(37):13255–13269, 2009.
- ³⁹ Tomáš Slanina, Pradeep Shrestha, Eduardo Palao, Dnyaneshwar Kand, Julie A. Peterson, Andrew S. Dutton, Naama Rubinstein, Roy Weinstein, Arthur H. Winter, and Petr Klán. In search of the perfect photocage: Structure-reactivity relationships in meso-methyl bodipy photoremovable protecting groups. *Journal of the American Chemical Society*, 139(42):15168–15175, 2017.

- ⁴⁰ Nobuhiro Umeda, Hironori Takahashi, Mako Kamiya, Tasuku Ueno, Toru Komatsu, Takuya Terai, Kenjiro Hanaoka, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano. Boron dipyrromethene as a fluorescent caging group for single-photon uncaging with long-wavelength visible light. *ACS Chemical Biology*, 9(10):2242–2246, 2014.
- ⁴¹ Naama Rubinstein, Pei Liu, Evan W. Miller, and Roy Weinstain. meso-methylhydroxy bodipy: A scaffold for photo-labile protecting groups. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 51(29):6369–6372, 2015.
- ⁴² Kaja Sitkowska, Ben L. Feringa, and Wiktor Szymański. Green-light-sensitive bodipy photoprotecting groups for amines. *The Journal of organic chemistry*, 83(4):1819–1827, 2018.
- ⁴³ Nicholas P. Toupin, Karan Arora, Pradeep Shrestha, Julie A. Peterson, Logan J. Fischer, Erandi Rajagurubandara, Izabela Podgorski, Arthur H. Winter, and Jeremy J. Kodanko. Bodipy-caged photoactivated inhibitors of cathepsin b flip the light switch on cancer cell apoptosis. *ACS Chemical Biology*, 14(12):2833–2840, 2019.
- ⁴⁴ Srivalleesha Mallidi, Sriram Anbil, Anne-Laure Bulin, Girgis Obaid, Megumi Ichikawa, and Tayyaba Hasan. Beyond the barriers of light penetration: Strategies, perspectives and possibilities for photodynamic therapy. *Theranostics*, 6(13):2458–2487, 2016.
- ⁴⁵ Paul D. Ray, Bo-Wen Huang, and Yoshiaki Tsuji. Reactive oxygen species (ros) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24(5):981–990, 2012.
- ⁴⁶ Toren Finkel. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology*, 194(1):7–15, 2011.
- ⁴⁷ Paul T. Schumacker. Reactive oxygen species in cancer: A dance with the devil. *Cancer cell*, 27(2):156–157, 2015.
- ⁴⁸ Geisslinger, editor. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie Klinische Pharmakologie Toxikologie*. wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 11 edition, 2020.
- ⁴⁹ Julia G. Levy. Photodynamic therapy. *Trends in Biotechnology*, 13(1):14–18, 1995.

- ⁵⁰ T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, and Q. Peng. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12):889–905, 1998.
- ⁵¹ Martijn Triesscheijn, Paul Baas, Jan H. M. Schellens, and Fiona A. Stewart. Photodynamic therapy in oncology. *The oncologist*, 11(9):1034–1044, 2006.
- ⁵² Michael R. Hamblin and Paweł Mróz, editors. *Advances in photodynamic therapy: Basic, translational, and clinical*. Artech House engineering in medicine & biology series. Artech House, Boston, Mass, 2008.
- ⁵³ Jonathan P. Celli, Bryan Q. Spring, Imran Rizvi, Conor L. Evans, Kimberley S. Samkoe, Sarika Verma, Brian W. Pogue, and Tayyaba Hasan. Imaging and photodynamic therapy: Mechanisms, monitoring, and optimization. *Chemical reviews*, 110(5):2795–2838, 2010.
- ⁵⁴ ZHENG HUANG, LIBO LI, HONGWEI WANG, XIULI WANG, KAIHUA YUAN, ARLEN MEYERS, LIHAO YANG, and FRED W. HETZEL. Photodynamic therapy — an update on clinical applications. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 02(01):73–92, 2011.
- ⁵⁵ R. Saini and C. F. Poh. Photodynamic therapy: A review and its prospective role in the management of oral potentially malignant disorders. *Oral diseases*, 19(5):440–451, 2013.
- ⁵⁶ Ron R. Allison. Photodynamic therapy: Oncologic horizons. *Future oncology (London, England)*, 10(1):123–124, 2014.
- ⁵⁷ Stanisław Kwiatkowski, Bartosz Knap, Dawid Przystupski, Jolanta Saczko, Ewa Kędzierska, Karolina Knap-Czop, Jolanta Kotlińska, Olga Michel, Krzysztof Kotowski, and Julita Kulbacka. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 106:1098–1107, 2018.
- ⁵⁸ Johannes Broichhagen, James Allen Frank, and Dirk Trauner. A roadmap to success in photopharmacology. *Accounts of chemical research*, 48(7):1947–1960, 2015.
- ⁵⁹ Lihong V. Wang and Hsin-i Wu. *Biomedical optics: Principles and imaging*. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, 2007.
- ⁶⁰ Tri Giang Phan and Andrew Bullen. Practical intravital two-photon microscopy for immunological research: Faster, brighter, deeper. *Immunology & Cell Biology*, 88(4):438–444, 2010.

- ⁶¹ Ethan D. Sternberg, David Dolphin, and Christian Brückner. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 54(17):4151–4202, 1998.
- ⁶² Marc Clement, Gwenaëlle Daniel, and Mario Trelles. Optimising the design of a broad-band light source for the treatment of skin. *Journal of cosmetic and laser therapy : official publication of the European Society for Laser Dermatology*, 7(3-4):177–189, 2005.
- ⁶³ Scott K. Lyons, P. Stephen Patrick, and Kevin M. Brindle. Imaging mouse cancer models in vivo using reporter transgenes. *Cold Spring Harbor protocols*, 2013(8):685–699, 2013.
- ⁶⁴ Romy Fain, Felipe Barbosa, Jaime Cardenas, and Michal Lipson. Photonic needles for light delivery in deep tissue-like media. *Scientific reports*, 7(1):5627, 2017.
- ⁶⁵ Warren R. Zipfel, Rebecca M. Williams, and Watt W. Webb. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature biotechnology*, 21(11):1369–1377, 2003.
- ⁶⁶ Christopher N. LaFratta, John T. Fourkas, Tommaso Baldacchini, and Richard A. Farrer. Multiphoton fabrication. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(33):6238–6258, 2007.
- ⁶⁷ Guillaume Bort, Thibault Gallavardin, David Ogden, and Peter I. Dalko. From one-photon to two-photon probes: “caged” compounds, actuators, and photoswitches. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(17):4526–4537, 2013.
- ⁶⁸ Chongzhao Ran, Zhaoda Zhang, Jacob Hooker, and Anna Moore. In vivo photoactivation without "light": Use of cherenkov radiation to overcome the penetration limit of light. *Molecular imaging and biology*, 14(2):156–162, 2012.
- ⁶⁹ Daniel Vomasta, Christina Högner, Neil R. Branda, and Burkhard König. Regulation of human carbonic anhydrase i (hcai) activity by using a photochromic inhibitor. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 47(40):7644–7647, 2008.
- ⁷⁰ Melanie Zindler, Boris Pinchuk, Christian Renn, Rebecca Horbert, Alexander Döbber, and Christian Peifer. Design, synthesis, and characterization of a photoactivatable caged prodrug of imatinib. *ChemMedChem*, 10(8):1335–1338, 2015.

- ⁷¹ David Bliman, Jesper R. Nilsson, Petronella Kettunen, Joakim Andréasson, and Morten Grøtli. A caged ret kinase inhibitor and its effect on motoneuron development in zebrafish embryos. *Scientific reports*, 5:13109, 2015.
- ⁷² Rubén Ferreira, Jesper R. Nilsson, Carlos Solano, Joakim Andréasson, and Morten Grøtli. Design, synthesis and inhibitory activity of photoswitchable ret kinase inhibitors. *Scientific reports*, 5:9769, 2015.
- ⁷³ James Allen Frank, Dmytro A. Yushchenko, David J. Hodson, Noa Lipstein, Jatin Nagpal, Guy A. Rutter, Jeong-Seop Rhee, Alexander Gottschalk, Nils Brose, Carsten Schultz, and Dirk Trauner. Photoswitchable diacylglycerols enable optical control of protein kinase c. *Nature chemical biology*, 12(9):755–762, 2016.
- ⁷⁴ Danielle Wilson, Jason W. Li, and Neil R. Branda. Visible-light-triggered activation of a protein kinase inhibitor. *ChemMedChem*, 12(4):284–287, 2017.
- ⁷⁵ Bastien Goegan, Firat Terzi, Frédéric Bolze, Sidney Cambridge, and Alexandre Specht. Synthesis and characterization of photoactivatable doxycycline analogues bearing two-photon-sensitive photoremovable groups suitable for light-induced gene expression. *ChemBioChem*, 19(12):1341–1348, 2018.
- ⁷⁶ Mark W. H. Hoorens, Maria E. Ourailidou, Theo Rodat, Petra E. van der Wouden, Piermichele Kobauri, Malte Kriegs, Christian Peifer, Ben L. Feringa, Frank J. Dekker, and Wiktor Szymanski. Light-controlled inhibition of brafv600e kinase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 179:133–146, 2019.
- ⁷⁷ Julie B. Trads, Katharina Hüll, Bryan S. Matsuura, Laura Laprell, Timm Fehrentz, Nicole Görldt, Krystian A. Kozek, C. David Weaver, Nikolaj Klöcker, David M. Barber, and Dirk Trauner. Sign inversion in photopharmacology: Incorporation of cyclic azobenzenes in photoswitchable potassium channel blockers and openers. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 58(43):15421–15428, 2019.
- ⁷⁸ Melanie Krebs, Alexander Döbber, Theo Rodat, Ulf Lützen, Yi Zhao, Maaz Zuhayra, and Christian Peifer. Photopharmacological applications for cherenkov radiation generated by clinically used radionuclides. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 2021.
- ⁷⁹ G. M. Hale and M. R. Querry. Optical constants of water in the 200-nm to 200-microm wavelength region. *Applied optics*, 12(3):555–563, 1973.

- ⁸⁰ P. E. Ciddor. Refractive index of air: New equations for the visible and near infrared. *Applied optics*, 35(9):1566–1573, 1996.
- ⁸¹ David J. Rowe, David Smith, and James S. Wilkinson. Complex refractive index spectra of whole blood and aqueous solutions of anticoagulants, analgesics and buffers in the mid-infrared. *Scientific reports*, 7(1):7356, 2017.
- ⁸² Panagiotis Giannios, Konstantinos G. Toutouzas, Maria Matiatou, Konstantinos Stasinou, Manousos M. Konstadoulakis, George C. Zografos, and Konstantinos Moutzouris. Visible to near-infrared refractive properties of freshly-excised human-liver tissues: Marking hepatic malignancies. *Scientific reports*, 6:27910, 2016.
- ⁸³ T. Inagaki, R. N. Hamm, E. T. Arakawa, and L. R. Painter. Optical and dielectric properties of dna in the extreme ultraviolet. *The Journal of Chemical Physics*, 61(10):4246–4250, 1974.
- ⁸⁴ Kamioka Observatory, ICRR, The Univ. of Tokyo. Super-kamiokande official website, 01.09.2022.
- ⁸⁵ Claus Grupen. *Astroparticle physics*. Undergraduate texts in physics. Second edition edition, 2020.
- ⁸⁶ Christoph Berger. *Elementarteilchenphysik: Von den Grundlagen zu den modernen Experimenten*. Springer-Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin, 3., aktualisierte und überarb. aufl. edition, 2014.
- ⁸⁷ Louise N. Johnson. The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 4):627–641, 2009.
- ⁸⁸ Phillip A. Schwartz and Brion W. Murray. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorganic Chemistry*, 39(5-6):192–210, 2011.
- ⁸⁹ Philip Cohen. Protein kinases — the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(4):309–315, 2002.
- ⁹⁰ D. H. Spector, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in dna of uninfected vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(9):4102–4106, 1978.
- ⁹¹ Tony Hunter. Treatment for chronic myelogenous leukemia: The long road to imatinib. *The Journal of clinical investigation*, 117(8):2036–2043, 2007.

- ⁹² Paul B. Chapman, Axel Hauschild, Caroline Robert, John B. Haanen, Paolo Ascierto, James Larkin, Reinhard Dummer, Claus Garbe, Alessandro Testori, Michele Maio, David Hogg, Paul Lorigan, Celeste Lebbe, Thomas Jouary, Dirk Schadendorf, Antoni Ribas, Steven J. O'Day, Jeffrey A. Sosman, John M. Kirkwood, Alexander M. M. Eggermont, Brigitte Dreno, Keith Nolop, Jiang Li, Betty Nelson, Jeannie Hou, Richard J. Lee, Keith T. Flaherty, and Grant A. McArthur. Improved survival with vemurafenib in melanoma with braf v600e mutation. *The New England journal of medicine*, 364(26):2507–2516, 2011.
- ⁹³ Clifford A. Hudis. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *The New England journal of medicine*, 357(1):39–51, 2007.
- ⁹⁴ Emmy D. G. Fleuren, Luxi Zhang, Jianmin Wu, and Roger J. Daly. The kinome 'at large' in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 16(2):83–98, 2016.
- ⁹⁵ Misty M. Attwood, Dorian Fabbro, Aleksandr V. Sokolov, Stefan Knapp, and Helgi B. Schiöth. Trends in kinase drug discovery: Targets, indications and inhibitor design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(11):839–861, 2021.
- ⁹⁶ Robert Roskoski. Properties of fda-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2022 update. *Pharmacological research*, 175:106037, 2022.
- ⁹⁷ Arvin C. Dar and Kevan M. Shokat. The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling. *Annual review of biochemistry*, 80:769–795, 2011.
- ⁹⁸ Fabio Zuccotto, Elena Ardini, Elena Casale, and Mauro Angiolini. Through the "gatekeeper door": Exploiting the active kinase conformation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(7):2681–2694, 2010.
- ⁹⁹ Robert Roskoski. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacological research*, 103:26–48, 2016.
- ¹⁰⁰ Robert A. Copeland. The drug-target residence time model: A 10-year retrospective. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(2):87–95, 2016.
- ¹⁰¹ Lori Krim Gavrin and Eddine Saiah. Approaches to discover non-atp site kinase inhibitors. *MedChemComm*, 4(1):41–51, 2013.
- ¹⁰² Vandana Lamba and Indraneel Ghosh. New directions in targeting protein kinases: Focusing upon true allosteric and bivalent inhibitors. *Current pharmaceutical design*, 18(20):2936–2945, 2012.

- ¹⁰³ Taylor K. Johnson and Matthew B. Soellner. Bivalent inhibitors of c-src tyrosine kinase that bind a regulatory domain. *Bioconjugate Chemistry*, 27(7):1745–1749, 2016.
- ¹⁰⁴ Yuko Nakamura, Tadanobu Nagaya, Kazuhide Sato, Shuhei Okuyama, Fusa Ogata, Karen Wong, Stephen Adler, Peter L. Choyke, and Hisataka Kobayashi. Cerenkov radiation-induced photoimmunotherapy with 18f-fdg. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 58(9):1395–1400, 2017.
- ¹⁰⁵ R. Robertson, M. S. Germanos, C. Li, G. S. Mitchell, S. R. Cherry, and M. D. Silva. Optical imaging of cerenkov light generation from positron-emitting radiotracers. *Physics in Medicine and Biology*, 54(16):N355–N365, 2009.
- ¹⁰⁶ Hongguang Liu, Gang Ren, Zheng Miao, Xiaofen Zhang, Xiaodong Tang, Peizhen Han, Sanjiv S. Gambhir, Zhen Cheng, and Andrew Boswell. Molecular optical imaging with radioactive probes. *PLoS ONE*, 5(3):e9470, 2010.
- ¹⁰⁷ Antonello E. Spinelli, Chaincy Kuo, Brad W. Rice, Riccardo Calandrino, Pasquina Marzola, Andrea Sbarbati, and Federico Boschi. Multispectral cerenkov luminescence tomography for small animal optical imaging. *Optics Express*, 19(13):12605, 2011.
- ¹⁰⁸ Antonello Enrico Spinelli, Marco Ferdeghini, Carlo Cavedon, Emanuele Zivelonghi, Riccardo Calandrino, Alberto Fenzi, Andrea Sbarbati, and Federico Boschi. First human cerenkography. *Journal of Biomedical Optics*, 18(2):020502, 2013.
- ¹⁰⁹ Anne-Laure Bulin, Charles Truillet, Rima Chouikrat, François Lux, Céline Frochot, David Amans, Gilles Ledoux, Olivier Tillement, Pascal Perriat, Muriel Barberi-Heyob, and Christophe Dujardin. X-ray-induced singlet oxygen activation with nanoscintillator-coupled porphyrins. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(41):21583–21589, 2013.
- ¹¹⁰ Benjamin Cline, Ian Delahunty, and Jin Xie. Nanoparticles to mediate x-ray-induced photodynamic therapy and cherenkov radiation photodynamic therapy. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 11(2):e1541, 2019.
- ¹¹¹ Vivian Lioret, Pierre-Simon Bellaye, Christine Arnould, Bertrand Collin, and Richard A. Decréau. Dual cerenkov radiation-induced near-infrared

- luminescence imaging and photodynamic therapy toward tumor resection. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(17):9446–9456, 2020.
- ¹¹² Nalinikanth Kotagiri, Gail P. Sudlow, Walter J. Akers, and Samuel Achilefu. Breaking the depth dependency of phototherapy with cherenkov radiation and low-radiance-responsive nanophotosensitizers. *Nature Nanotechnology*, 10(4):370–379, 2015.
- ¹¹³ Lisa Hübinger, Roswitha Runge, Tobias Rosenberg, Robert Freudenberg, Jörg Kotzerke, and Claudia Brogsitter. Psoralen as a photosensitizers for photodynamic therapy by means of in vitro cherenkov light. *International journal of molecular sciences*, 23(23), 2022.
- ¹¹⁴ R. H. Elrick and R. P. Parker. The use of cherenkov radiation in the measurement of β -emitting radionuclides. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 19(3):263–271, 1968.
- ¹¹⁵ Maurizio Conti and Lars Eriksson. Physics of pure and non-pure positron emitters for pet: A review and a discussion. *EJNMMI Physics*, 3(1):1379, 2016.
- ¹¹⁶ The luminescence of irradiated transparent media and the čerenkov effect - i. the luminescence of aqueous solutions of radioactive isotopes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 216(1124):90–102, 1997.
- ¹¹⁷ R. P. Baum. Nuklearmedizinische diagnostik und therapiekontrolle neuroendokriner tumore (net) mittels rezeptor-pet/ct und szintigraphie. *RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*, 177(S 01), 2005.
- ¹¹⁸ B. J. Krause, T. Beyer, A. Bockisch, D. Delbeke, J. Kotzerke, V. Minkov, M. Reiser, and N. Willich. Fdg-pet/ct in der onkologie. leitlinie. *Nuklearmedizin. Nuclear medicine*, 46(6):291–301, 2007.
- ¹¹⁹ H-J Biersack, S. Ezziddin, J. Risse, H. Bender, and H. Palmedo. Therapie mit radioisotopen in der onkologie. palliative und kurative ansätze. *Schmerz (Berlin, Germany)*, 19(1):9–17, 2005.
- ¹²⁰ Udalrich Büll and Roland Bares, editors. *Nuklearmedizin: 122 Tabellen*. Thieme, Stuttgart, 3., neubearb. aufl., sonderausg edition, 2001.

- ¹²¹ Tara Haddad, Armaghan Fard-Esfahani, and Reza Vali. A review of pediatric neuroendocrine tumors, their detection, and treatment by radioisotopes. *Nuclear medicine communications*, 2020.
- ¹²² Ali Bahrami-Samani, Akbar Anvari, Amir Reza Jalilian, Simindokht Shirvani-Arani, Hassan Yousefnia, Mahmoud Reza Aghamiri, and Mohammad Ghannadi-Maragheh. Production, quality control and pharmacokinetic studies of (177)lu-edtmp for human bone pain palliation therapy trials. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 11(1):137–144, 2012.
- ¹²³ Katharina Kessel, Robert Seifert, Matthias Weckesser, Wolfgang Roll, Verena Humberg, Katrin Schlack, Martin Bögemann, Christof Bernemann, and Kambiz Rahbar. Molecular analysis of circulating tumor cells of metastatic castration-resistant prostate cancer patients receiving 177lu-psma-617 radioligand therapy. *Theranostics*, 10(17):7645–7655, 2020.
- ¹²⁴ Manfred Fischer and G. Mödder. Radionuclide therapy of inflammatory joint diseases. *Nuclear medicine communications*, 23(9):829–831, 2002.
- ¹²⁵ IAEA- Nuclear Data Section. Livechart - table of nuclides - nuclear structure and decay data, 20.05.2021.
- ¹²⁶ X. Mougeot. Erratum: Reliability of usual assumptions in the calculation of β and ν spectra [phys. rev. c 91 , 055504 (2015)]. *Physical Review C*, 92(5), 2015.
- ¹²⁷ X. Mougeot. Reliability of usual assumptions in the calculation of β and ν spectra. *Physical Review C*, 91(5):455, 2015.
- ¹²⁸ John E.T. Corrie, Toshiaki Furuta, Richard Givens, Abraham L. Yousef, and Maurice Goeldner. Photoremovable protecting groups used for the caging of biomolecules. In Maurice Goeldner and Richard Givens, editors, *Dynamic studies in biology*, pages 1–94. Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- ¹²⁹ Tomáš Šolomek, Sébastien Mercier, Thomas Bally, and Christian G. Bochet. Photolysis of ortho-nitrobenzylic derivatives: The importance of the leaving group. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(3):548, 2012.
- ¹³⁰ I. Shchemelinin, L. Sefc, and E. Necas. Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia biologica*, 52(3):81–100, 2006.
- ¹³¹ K. F. Byth, A. Thomas, G. Hughes, C. Forder, A. McGregor, C. Geh, S. Oakes, C. Green, M. Walker, N. Newcombe, S. Green, J. Growcott,

- A. Barker, and R. W. Wilkinson. Azd5438, a potent oral inhibitor of cyclin-dependent kinases 1, 2, and 9, leads to pharmacodynamic changes and potent antitumor effects in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(7):1856–1866, 2009.
- ¹³² P. B. Schneider. Determination of specific activity of ³²p-labeled compounds using cerenkov counting. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 12(1):14–16, 1971.
- ¹³³ Helmut J. Wieler, editor. *PET in der klinischen Onkologie*. Steinkopff, Darmstadt, 1999.
- ¹³⁴ CIS bio international, Member of Curium group. Fachinformation yttrium-citrat (90y) cis bio international, 2018.
- ¹³⁵ Stefan Kirschner, Alexander Döbber, Melanie Krebs, Christopher Witt, Bernd Hartke, and Christian Peifer. The impact of electronic effects on photolysis: A model study on the 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl caged n-phenylpyrimidine-2-amine scaffold. *ChemPhotoChem*, 4(8):638–643, 2020.
- ¹³⁶ Erik de Blois, Ho Sze Chan, Mark Konijnenberg, Rory de Zanger, and Wouter A.P. Breeman. Effectiveness of quenchers to reduce radiolysis of ¹¹¹in- or ¹⁷⁷lu-labelled methionine-containing regulatory peptides. maintaining radiochemical purity as measured by hplc.
- ¹³⁷ S. Liu and D. S. Edwards. Stabilization of (90)y-labeled dota-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid. *Bioconjugate Chemistry*, 12(4):554–558, 2001.
- ¹³⁸ C. James Hastie, Hilary J. McLauchlan, and Philip Cohen. Assay of protein kinases using radiolabeled atp: A protocol. *Nature protocols*, 1(2):968–971, 2006.
- ¹³⁹ Antonio E. Alegría, Amaris Ferrer, Glysette Santiago, Elsa Sepúlveda, and Wilmarie Flores. Photochemistry of water-soluble quinones. production of the hydroxyl radical, singlet oxygen and the superoxide ion. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 127(1-3):57–65, 1999.
- ¹⁴⁰ Gynter Mödder and K. Tillmann. *Die Radiosynoviorthese: Nuklearmedizinische Gelenktherapie (und -diagnostik) in Rheumatologie und Orthopädie*. CIS Diagnostik, Dreieich, 1995.
- ¹⁴¹ Tobias F. Jakobs, Ralf-T Hoffmann, Gabriele Poepperl, Anna Schmitz, Jürgen Lutz, Walter Koch, Klaus Tatsch, Andreas Lubiensky, Maximilian F.

Reiser, and Thomas Helmberger. Mid-term results in otherwise treatment refractory primary or secondary liver confined tumours treated with selective internal radiation therapy (sirt) using (90)yttrium resin-microspheres. *European radiology*, 17(5):1320–1330, 2007.

¹⁴² Malgorzata Borowiak, Wallis Nahaboo, Martin Reynders, Katharina Nekolla, Pierre Jalinot, Jens Hasserodt, Markus Rehberg, Marie Delattre, Stefan Zahler, Angelika Vollmar, Dirk Trauner, and Oliver Thorn-Seshold. Photoswitchable inhibitors of microtubule dynamics optically control mitosis and cell death. *Cell*, 162(2):403–411, 2015.

¹⁴³ Deutsche Elektronen-Synchrotron DESY. Kamiokannen-experiment, 22.04.2021.

¹⁴⁴ Fabiola Buschendorf. Messung der kosmischen strahlung – myonenlebensdauer und -rate, 2012.

¹⁴⁵ Solomon Tadesse, Elizabeth C. Caldon, Wayne Tilley, and Shudong Wang. Cyclin-dependent kinase 2 inhibitors in cancer therapy: An update. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(9):4233–4251, 2019.

¹⁴⁶ Jonas Cicenas and Mindaugas Valius. The cdk inhibitors in cancer research and therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(10):1409–1418, 2011.

¹⁴⁷ R. S. TWIGG. Oxidation-reduction aspects of resazurin. *Nature*, 155(3935):401–402, 1945.