



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 13 533 T2** 2004.11.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 095 032 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 13 533.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/15659**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 933 887.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/04008**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.07.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.01.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.05.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **10.12.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.11.2004**

(51) Int Cl.7: **C07D 311/16**
C12Q 1/26

(30) Unionspriorität:
92995 P 16.07.1998 US

(73) Patentinhaber:
Gentest Corp., Woburn, Mass., US

(74) Vertreter:
**Patentanwälte
HANSMANN-KLICKOW-HANSMANN, 22767
Hamburg**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**MILLER, P., Vaughn, Arlington, US; CRESPI, L.,
Charles, Marblehead, US**

(54) Bezeichnung: **REAGENTIEN FÜR CYP2D FLUORESCENZTEST**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Diese Anmeldung beansprucht gemäß Titel 35 § 19 (e) die Priorität der US-"Provisional"-Anmeldung Nr 60/092,995, angemeldet am 16 Juli 1998 mit dem Titel "Novel CYP2D Fluorescent Assay Reagents", deren gesamter Inhalt hier durch Inbezugnahme aufgenommen wird.

[0002] Diese Erfindung liegt auf dem Gebiet des Arzneimittel- und Xenobiotika-Metabolismus. Die Erfindung beinhaltet neue fluoreszierende Cytochrom-P450-CYP2D Prüfsubstrate, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Testreagenzien.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] P450-Cytochrome (CYP) sind die grundlegenden Enzyme für den oxidativen Metabolismus von vielen Arzneimitteln, Prokarzinogenen, Promutagenen und Umweltgiften. Cytochrom P450 ist ein hämhaltiges, membrangebundenes Multienzymsystem, das in vivo in vielen Geweben anwesend ist, mit dem höchsten Niveau jedoch in der Leber. Es wird geschätzt, daß in der menschlichen Leber 15–20 verschiedene xenobiotika-metabolisierende Cytochrom-P450-Arten vorhanden sind. Es ist eine Standardnomenklatur entwickelt worden, die auf der Verwandtschaft von Aminosäuresequenzen basiert. Von bestimmten P450-Arten (wie beispielsweise CYP2D6 und CYP2C19) ist bekannt, daß sie im Menschen polymorph sind, und manche (wie CYP1A2 und CYP3A4) werden in Reaktion auf Umweltchemikalien reguliert. Konkurrenz um den Metabolismus durch eine bestimmte Cytochrom-P450-Art ist ein grundlegender Mechanismus einiger klinisch relevanter Arzneimittel-Arzneimittel-Wechselwirkungen.

[0004] Die Identifizierung der für den Stoffwechsel verantwortlichen Enzyme ist zu einem wichtigen Aspekt der Arzneimittelentwicklung geworden. Solche Identifizierungen berücksichtigen sowohl den Metabolismus des neuen Arzneimittels als auch eine Hemmung durch das neue Arzneimittel. Auf Grundlage der Kenntnis von der Fähigkeit zusammen verabreichter Arzneimittel, dasselbe Enzym zu hemmen, erlaubt die Identifizierung von Enzymen, die in den Metabolismus des neuen Arzneimittels involviert sind, eine Vorhersage darüber, welche zusammen verabreichten Arzneimittel den Metabolismus des neuen Arzneimittels möglicherweise hemmen. Diese Information kann auch verwendet werden, um auf Basis bekannter Stoffwechsel-Polymorphismen eine individuelle Variabilität vorherzusagen. Die Identifizierung von Enzymen, die gegenüber einer Hemmung durch das neue Arzneimittel am empfindlichsten sind, erlaubt auf Grundlage der Kenntnis darüber, welche zusammen verabreichten Arzneimittel durch dasselbe Enzym metabolisiert werden, eine Vorhersage darüber, von welchen zusammen verabreichten Arzneimitteln der Metabolismus durch das neue Arzneimittel gehemmt werden kann. Das frühe Erhalten von Informationen über eine Reihe von Arzneimitteln im Arzneimittelentwicklungsprozeß kann die Auswahl des besten Arzneimittelkandidaten für die weitere Entwicklung erleichtern.

[0005] CYP2D6 ist das einzige Mitglied der CYP2D-Subfamilie, das im Menschen exprimiert wird. CYP2D6 ist verantwortlich für den Stoffwechsel vieler wichtiger Arzneimittel, z. B.: Hustenblocker, Antiarrhythmika, Psychotrope Arzneimittel. CYP2D6 ist ebenfalls polymorph. Etwa 5–10% der Kaukasier und 1–3% der Asiaten und Afrikaner weisen einen Mangel an diesem Enzym auf. Etwa 5% der Kaukasier sind ultraschnelle Metabolisierer, haben sehr hohe Level von CYP2D6 (S. Rendic und F. J. Di Carlo, Drug Metab. Rev. 29, 413–580 (1997)). Die Bedeutung von diesem P450 für den Arzneimittelmetabolismus sowie seine Variabilität in Bezug auf die Aktivität aufgrund Polymorphismus machen das Screening hinsichtlich des Stoffwechsels und der Hemmung dieses Enzyms wichtig für die Arzneimittelentwicklung.

[0006] Nachweise für CYP2D haben sich auf den Metabolismus von Arzneimittelmolekülen oder Arzneimittelkandidaten konzentriert. Von vielen Arzneimitteln wird ein Abbau durch CYP2D6 via O-Dealkylierung angegeben. Zum Beispiel wird Dextromethorphan durch CYP2D6 O-demethyliert (Kupfer, A., Schmid, B., Preisig, R., und G. Pfaff (1984) Lancet i, S. 517.). Substrate wie Dextromethorphan oder Bufuralol sind zwar zur Beurteilung der CYP2D-Aktivität und -Hemmung geeignet, sind aber der Hochdurchsatz-Screening-Technologie nicht zugänglich (beide erfordern eine zeitintensive Trennung von CYP2D-Reaktionsprodukten mittels HPLC). Darüber hinaus besitzt keines dieser Substrate die erforderlichen Fluoreszenzeigenschaften, die das Substrat für die In-situ-Fluoreszenz-Plattenanalyse geeignet machen würden.

[0007] Wir haben bereits früher die Verwendung der kommerziell erhältlichen Verbindung 3-Cyano-7-ethoxycumarin (CEC) als fluoreszierendes Substrat zur Bestimmung der CYP2D6-Aktivität in einem Hochdurchsatz-

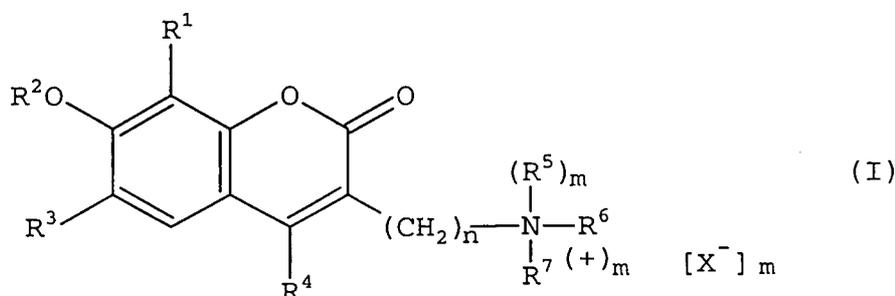
verfahren beschrieben (Siehe Crespi et al. Anal Biochem. 248, 188–190, (1997). Aufgrund des geringen Enzymdurchsatzes und geringer Spezifität des Substrates ist es jedoch von geringer Eignung.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft neue fluoreszierende Substrate des menschlichen P450-Enzymes CYP2D6. Diese Substrate sind geeignet zur Bestimmung der CYP2D6-Enzymaktivität und bei der Auswahl von Verbindungen, die die CYP2D6-Enzymaktivität hemmen. Entsprechend sind die erfindungsgemäßen Verbindungen und Verfahren geeignet für die Identifizierung potentieller nachteiliger Arzneimittelwechselwirkungen, die durch die Hemmung der CYP2D6-Enzymaktivität verursacht werden.

[0009] Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind Substrate, die spezifisch für CYP2D sowie dadurch gekennzeichnet sind, daß sie Eigenschaften aufweisen, die die empfindliche Quantifizierung der CYP2D-Aktivität unter Verwendung einer In-situ-Fluoreszenzanalyse erlauben. Um diese Bedürfnisse zu befriedigen, enthalten die erfindungsgemäßen Verbindungen 1) ein Ammonium oder eine basische Amino-Funktionalität zur Ansteuerung eines aktiven Zentrums von CYP2D, 2) einen 7-Hydroxycumarin-Kern für eine einfache Fluoreszenzdetektion, und 3) eine O-Alkyl-Gruppe 5–7 Angström von dem Stickstoff, der durch das Enzym leicht O-dealkyliert werden kann.

[0010] Nach einem Aspekt der Erfindung werden Verbindungen der Formel I bereitgestellt:



- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
- (b) wobei R2 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Alkyl und einem Aryl;
- (c) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
- (d) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
- (e) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
- (f) wobei R6 ein Alkyl ist;
- (g) wobei R7 ein Alkyl ist;
- (h) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
- (i) wobei m 1 ist; und
- (j) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist.

[0011] Jeder der Substituenten R1, R2, R3, R4, R5, R6 und R7 ist unabhängig aus den oben angegebenen Gruppen ausgewählt.

[0012] Bevorzugt sind R1 und R3 beide Hydrid oder ein Halogen. In den am meisten bevorzugten Ausführungsformen sind R1 oder R3 oder beide Hydrid.

[0013] Bevorzugt ist R2 ein ungesättigtes Alkyl, enthaltend 1 bis 5 Kohlenstoffatome, einschließlich, oder ein Aryl wie beispielsweise Benzyl.

[0014] Bevorzugt ist R4 ein Hydrid oder ein Alkyl. Die bevorzugten R4-Alkyle sind gesättigte Alkyle, enthaltend 1–5 Kohlenstoffatome, einschließlich. Das am meisten bevorzugte R4 ist ein Alkyl, das substituiert ist und eine elektronenanziehende Gruppe, z. B. CF₃ oder CN, enthält.

[0015] Diese substituierten Alkyl-Gruppen verleihen den Verbindungen der Formel I unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften.

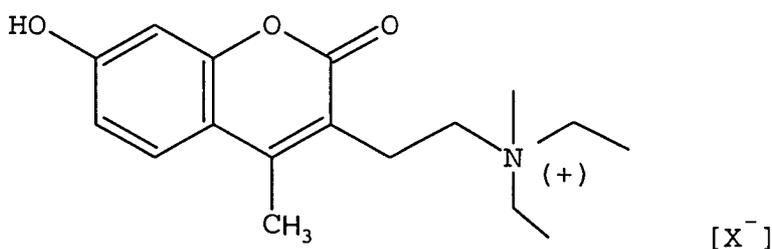
[0016] Bevorzugt sind R6 und R7, unabhängig voneinander, ungesättigte Alkyle, enthaltend 1–5 Kohlenstoffatome, einschließlich. Besonders bevorzugt sind R6 und R7 Alkyle, die 1, 2 oder 3 Kohlenstoffatome enthalten,

und am meisten bevorzugt sind die R6- und R7-Alkyle Ethyl.

[0017] In den bevorzugten Ausführungsformen ist n 0, 1, 2, 3 oder 4, und besonders bevorzugt ist n 2.

[0018] In den am meisten bevorzugten Ausführungsformen ist die Verbindung der Formel I Verbindung Ia (AMMC, $C_{18}H_{26}NO_3$, Name: 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-4-methyl-7-methoxycumarin) oder Verbindung Ib ($C_{18}H_{23}F_3NO_3$, Name: 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-trifluormethylcumarin) oder Verbindung Ic ($C_{17}H_{20}F_3NO_3$, Name: 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-methoxy-4-trifluormethylcumarin) oder Verbindung Id (AMC, $C_{17}H_{23}NO_3$, Name: 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin). Besonders bevorzugt ist die Verbindung 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin).

[0019] In der am meisten bevorzugten Ausführungsform sind die Produkte, die durch das Verfahren des In-Reaktion-bringens eines CYP2D-Enzyms mit einer Verbindung der Formel I hergestellt werden, Verbindung IIa (AMHC, $C_{17}H_{24}NO_3$), Name: 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin).



Verbindung II

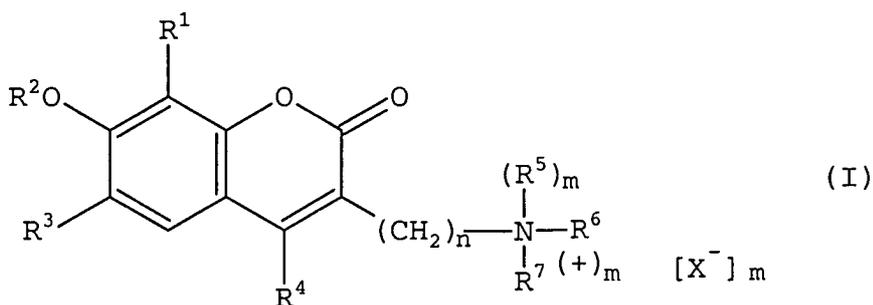
[0020] Salze der Verbindungen der Formel I werden von den erfindungsgemäßen Verbindungen ebenfalls umfaßt. Insbesondere sind Salze von AMMC und AMC bevorzugt.

[0021] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung wird eine Zusammensetzung bereitgestellt, die eine Verbindung der Formel I umfaßt. Die Verbindung liegt in der Zusammensetzung in einer Konzentration von mehr als mindestens 50% Gewichtsprozent vor. Die am meisten bevorzugte Zusammensetzung enthält eine Konzentration der Verbindung der Formel I, die mindestens 80, besonders bevorzugt mindestens 90 und am meisten bevorzugt mindestens 95 Gewichtsprozent beträgt. Die bevorzugten Zusammensetzungen sind im wesentlichen frei von einem nachweisbaren Reaktionsprodukt, d. h. die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen enthalten keine Spiegel des CYP2D-katalysierten Umsetzungsprodukts einer Verbindung der Formel II.

[0022] Die Zusammensetzungen können in Fläschchen enthalten sein, die Bestandteil eines Kits zur Untersuchung der CYP2D-Enzymaktivität sind. Bevorzugt enthalten die Fläschchen vorbestimmte Mengen der Zusammensetzungen, um zur Erreichung einer vorbestimmten Konzentration der Verbindung für die Durchführung eines CYP2D-Enzymtests die Lösung des Inhalts zu erleichtern.

[0023] In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird (3-[2-(Diethylamino)-ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AMC, $C_{17}H_{23}NO_3$) bereitgestellt.

[0024] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Untersuchung der CYP2D-Enzymaktivität bereitgestellt, umfassend ein Verfahren zur Untersuchung der CYP2D-Aktivität, umfassend: das In-Kontakt-bringen eines CYP2D-Enzyms mit einer Verbindung der Formel I:



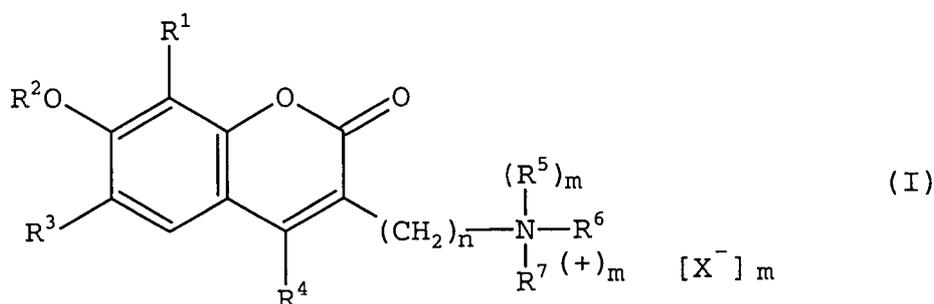
(a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;

- (b) wobei R2 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Alkyl und einem Aryl;
- (c) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
- (d) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
- (e) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
- (f) wobei R6 ein Alkyl ist;
- (g) wobei R7 ein Alkyl ist;
- (h) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
- (i) wobei m ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 0 und 1; und
- (j) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist,

unter Bedingungen, unter denen das CYP2D-Enzym die Umsetzung der beanspruchten Verbindung zu einem fluoreszierenden Produkt katalysiert.

[0025] Der Test kann in vivo oder in vitro durchgeführt werden. Beispielsweise können die erfindungsgemäßen Verbindungen (z. B. die Verbindungen der Formel I) an ein Tiermodell verabreicht werden, um z. B. die CYP2D-Enzymaktivität (z. B. durch Beobachtung in biologischen Flüssig- oder Gewebeproben des Tieres) zu lokalisieren und wahlweise zu quantifizieren. Besonders bevorzugt wird das Verfahren zur Untersuchung der CYP2D-Enzymaktivität verwendet, um die Aktivität eines CYP2D zu bestimmen, das in einer biologischen Flüssigprobe oder Feststoffprobe (z. B. eine Biopsieprobe der Leber, des Hirns oder Darms) enthalten sein kann, oder das in einem zellhaltigen oder zellfreien System exprimiert sein kann (z. B. ein mikrosomenhaltiges cDNA-exprimiertes CYP2D). Auf diese Weise können Zustände, die mit Mängeln oder Überexpression der CYP2D-Enzymaktivität verbunden sind, festgestellt werden. Daher kann das CYP2D-Enzym in einer Probe, die eine Leberprobe wie beispielsweise ein aus einer Biopsie erhaltenes Rohhomogenat, teilweise oder gereinigtes Leberenzym, ein cDNA-exprimiertes CYP2D ist, in Hepatozyten oder in Mikrosomen enthalten sein.

[0026] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Screening-Verfahren zur Auswahl von Mittel bereitgestellt, die CYP2D-Enzymaktivität hemmen, umfassend das In-Kontakt-bringen eines CYP2D-Enzyms mit einer Verbindung der Formel I:



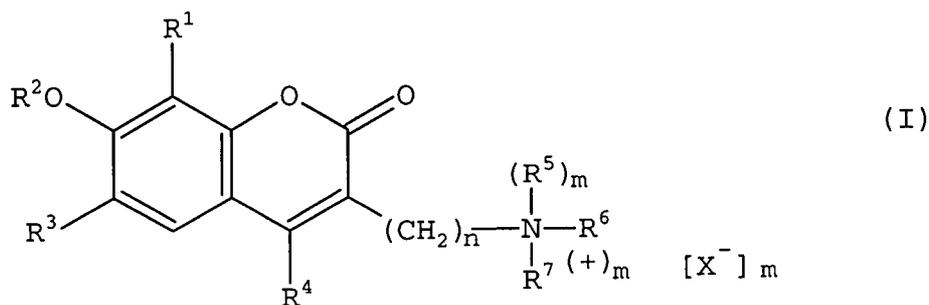
- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
- (b) wobei R2 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Alkyl und einem Aryl;
- (c) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
- (d) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
- (e) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
- (f) wobei R6 ein Alkyl ist;
- (g) wobei R7 ein Alkyl ist;
- (h) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
- (i) wobei m ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 0 und 1; und
- (j) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist,

in Gegenwart eines mutmaßlichen CYP2D-Enzym-Inhibitors und unter Bedingungen, unter denen das CYP2D-Enzym die Umsetzung der Verbindung zu einem fluoreszierenden Produkt katalysiert; und Auswählen eines Mittels, das die CYP2D-Enzymaktivität hemmt, als CYP2D-Enzym-Inhibitor.

[0027] In den bevorzugten Ausführungsformen ist das Screening-Verfahren ein Hochdurchsatzverfahren.

[0028] Nach einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Visualisierung eines CYP2D-Enzyms bereitgestellt, umfassend das In-Kontakt-bringen einer CYP2D-Enzym-haltigen Probe mit einer Verbin-

ung der Formel I:



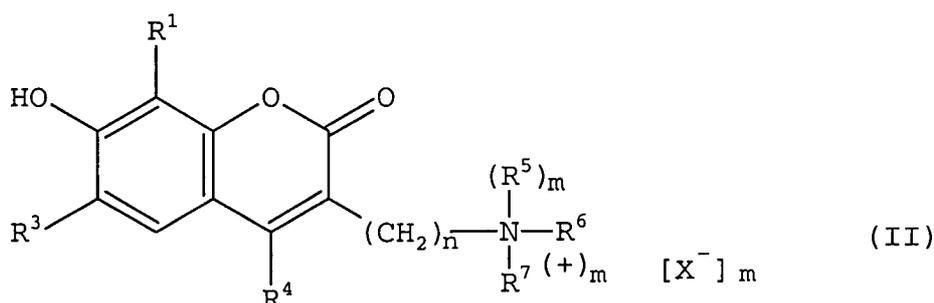
- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R2 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Alkyl und einem Aryl;
 (c) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (d) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (e) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (f) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (g) wobei R7 ein Alkyl ist;
 (h) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (i) wobei m ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 0 und 1; und
 (j) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist,

und Aussetzen des CYP2D-Enzyms und der beanspruchten Verbindung gegenüber Bedingungen, unter denen das CYP2D-Enzym die Umsetzung der Verbindung zu einem fluoreszierenden Produkt katalysiert.

[0029] In den bevorzugten Ausführungsformen wird das Verfahren zur Visualisierung eines CYP2D-Enzyms an einer Gewebeschnitt-Probe durchgeführt, d. h., die CYP2D-haltige Probe ist ein Gewebeschnitt, wie er beispielsweise aus einer Biopsieprobe erhalten wird.

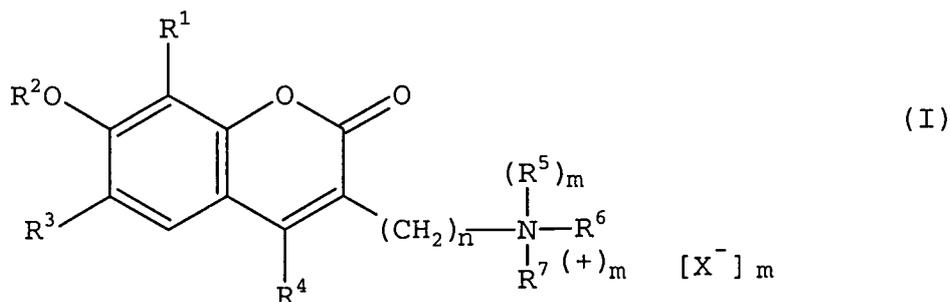
[0030] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung werden Kits zur Bestimmung und/oder Messung der CYP2D-Enzymaktivität bereitgestellt. Die Kits enthalten eine Verbindung der Formel I und Anweisungen zur Verwendung des Kits, um die CYP2D-Enzymaktivität zu messen. Die Kits können weiter Anweisungen zur Ermittlung von K_i und/oder IC₅₀ für einen CYP2D-Inhibitor enthalten. Die bevorzugten Verbindungen der Formel I sind Verbindungen, die eine hohe Bindungsspezifität für das Enzym aufweisen und für die das Enzym eine hohe Substratumsatzrate zeigt. Diese Parameter werden typischerweise in den Km- und Vmax-Werten für die enzymkatalysierte Umsetzung des Substrates (d. h. die erfindungsgemäße Verbindung) zu einem fluoreszierenden Produkt wiedergegeben. Im allgemeinen wird eine im Vergleich zu einem zweiten Substrat höhere relative Affinität des CYP2D-Enzyms für ein erstes Substrat durch einen im Vergleich zu dem zweiten Substrat niedrigeren Km-Wert für das erste Substrat angezeigt. Ein im Vergleich zu einem zweiten Substrat höherer katalytischer Umsatz für ein erstes Substrat wird durch ein höheres Vmax für das erste Substrat angezeigt. Die bevorzugten erfindungsgemäßen Verbindungen haben einen Km von größer als etwa 50 nM mit einem Vmax größer als etwa 0,05 min⁻¹. Im allgemeinen weisen die erfindungsgemäßen Verbindungen einen Km von etwa 1 bis etwa 100 mM und ein Vmax von etwa 0,05 bis etwa 20 min⁻¹ auf, mit einem bevorzugten Bereich für Km von größer als etwa 50 nM und einem bevorzugten Bereich für Vmax von etwa 0,2 bis etwa 20 min⁻¹.

[0031] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung werden neue fluoreszierende Produkte bereitgestellt. Die neuen Produkte sind Verbindungen der Formel II. Daher wird in einem weiteren Aspekt der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Produktes bereitgestellt, umfassend eine Verbindung der Formel II:



- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (c) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (d) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (e) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (f) wobei R7 ein Alkyl ist;
 (g) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (h) wobei m ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 0 und 1; und
 (i) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist,

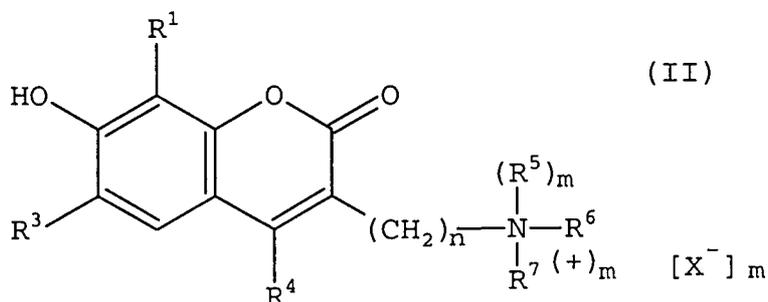
durch In-Reaktion-bringen eines CYP2D-Enzyms mit einem Substrat, das eine Verbindung der Formel I ist:



- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R2 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Alkyl und einem Aryl;
 (c) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (d) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (e) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (f) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (g) wobei R7 ein Alkyl ist;
 (h) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (i) wobei m ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 0 und 1; und
 (j) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist,

unter Bedingungen, unter denen das CYP2D-Enzym das Substrat zu einer Verbindung gemäß Formel II umsetzt. Im allgemeinen werden die Verbindungen der Formel II als Reaktionsprodukt der CYP2D-katalysierten Reaktion eines Substrates, das eine Verbindung gemäß der Formel I ist, hergestellt. Diese Verbindungen weisen im allgemeinen Strukturen auf, die sich von denen der Verbindungen der Formel I dadurch unterscheiden, daß sie eine Hydroxyl-Gruppe an Position 7 des Coumarinrings aufweisen.

[0032] In einem anderen Aspekt der Erfindung wird eine Verbindung der Formel II



bereitgestellt,

- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (c) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (d) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (e) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (f) wobei R7 ein Alkyl ist;

- (g) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (h) wobei m 1 ist; und
 (i) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist.

[0033] Die Verbindungen der Formel I können tertiäre (d. h. m = 0) oder quartäre (d. h. m = 1) Amine sein. Bevorzugt sind die Verbindungen der Formel I tertiäre Amine.

[0034] Bevorzugte Merkmale der Aspekte der Erfindung sind in den beigefügten Unteransprüchen enthalten.

[0035] Diese und andere Aspekte der Erfindung sowie verschiedene Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten werden unter Berücksichtigung der ausführlichen Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen ersichtlicher sein.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0036] Fig. 1 zeigt eine Auswahl der Dealkylierung von Verbindung Ia durch eine Reihe von menschlichen P450-Enzymen.

[0037] Fig. 2 zeigt eine Auswahl der Dealkylierung von Verbindung Ic durch eine Reihe von menschlichen P450-Enzymen.

[0038] Fig. 3 zeigt eine Auswahl der Dealkylierung von Verbindung Ib durch eine Reihe von menschlichen P450-Enzymen.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

I. Definitionen

[0039] Im vorliegenden Dokument wird CYP2D in Bezug auf das Enzym verwendet, das die Umsetzung einer erfindungsgemäßen Verbindung zu einem fluoreszierenden Produkt katalysiert. Es ist ersichtlich, daß jedes Mitglied der CYP2D-Familie in jeder der hier diskutierten Enzymreaktionen verwendet werden kann und daß CYP2D6 eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung repräsentiert.

[0040] Molekülbegriffe, die in der vorliegenden Anmeldung verwendet werden, haben die übliche Bedeutung, sofern nichts anderes angegeben ist. Der Begriff Hydrid bezeichnet ein einzelnes Wasserstoffatom. Der Begriff Amino bezeichnet ein Stickstoffatom mit zwei Substituenten, die gleich oder verschieden sein können. Die Aminogruppen-Substituenten werden unabhängig ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Hydrid-, Alkyl-, Cycloalkyl- und Aryl-Gruppen.

[0041] Alkyl-Gruppen können linear oder verzweigt sein, gesättigt oder ungesättigt, und können bis zu 10 Kohlenstoffatome aufweisen. Besonders bevorzugt sind die Alkyl-Gruppen "Niederalkyl"-Gruppen mit 1–5 Kohlenstoffatomen, einschließlich. Beispiele für Alkyl-Gruppen schließen Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl und Pentyl ein. Weitere Beispiele für Alkyl-Gruppen schließen Isopropyl und Tert-butyl ein.

[0042] Aryl-Gruppen können in einem einzelnen oder verschmolzenen carbozyklischen oder heterozyklischen Ringsystem mit 5–15 Ringmitgliedern 0–4 Heteroatome enthalten, ausgewählt aus Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel. Eines oder mehrere Wasserstoffatome können auch durch eine Substituenten-Gruppe, ausgewählt aus einer Acyl-, einer Amino-, einer Carboalkoxy-, einer Carboxy-, einer Carboxyamido-, einer Cyano-, einer Halogen-, einer Hydroxyl-, einer Nitro-, einer Thio-, einer Alkyl-, einer Aryl-, einer Cycloalkyl-, einer Alkoxy-, einer Aryloxy-, einer Sulfoxy- und einer Guanido-Gruppe, substituiert werden.

[0043] Eine bevorzugte Klasse von Aryl-Gruppen sind unsubstituierte Phenyl-Gruppen und Phenyl-Gruppen, in denen ein oder mehrere Wasserstoffatome ersetzt sind durch eine Alkyl-, Alkoxy-, Aryloxy-, oder Halogen-Gruppe. Beispiele für Aryl-Gruppen beinhalten Phenyl, Phenyl-Naphthyl, Biphenyl, Terphenyl, Pyridinyl und verschiedene andere Phenyl-derivate.

[0044] Cycloalkyl-Gruppen weisen vorzugsweise gesättigte oder teilweise ungesättigte Ringsystem auf, die jeweils null bis vier Heteroatome, ausgewählt aus Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel, in einem einzelnen oder verschmolzenen carbozyklischen oder heterozyklischen Ringsystem mit drei bis fünfzehn Ringmitgliedern enthalten. Eines oder mehrere Wasserstoffatome können auch durch eine Substituenten-Gruppe, ausgewählt aus

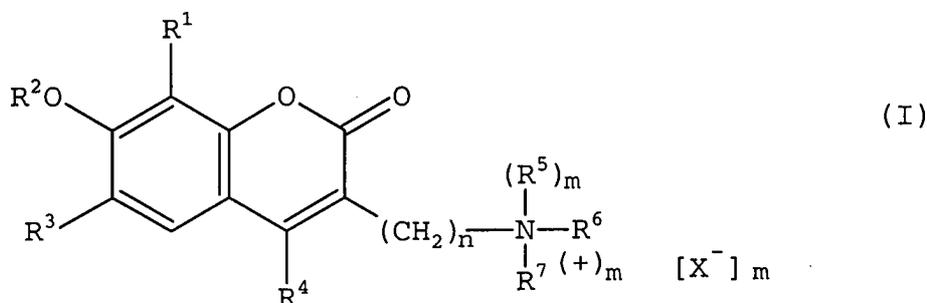
Acyl-, Amino-, Carboalkoxy-, Carboxy-, Carboxyamido-, Cyano-, Halogen-, Hydroxy-, Nitro-, Oxo-, Thio-, Alkyl-, Aryl-, Cycloalkyl-, Alkoxy-, Aryloxy- und Guanido-Gruppen, ersetzt sein oder zwei Substituenten zusammen können einen verschmolzenen Cycloalkylring bilden. Beispiele für eine Cycloalkyl-Gruppe schließen Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, Morpholinyl, Piperidinyl und Pyrolidinyl ein. Eine Alkoxy-Gruppe bezeichnet ein Sauerstoffatom, das substituiert ist mit einer Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkyl-Gruppe. Beispiele beinhalten Methoxy, Tert-butoxy, Benzyl- und Cyclohexyloxy. Eine Aryloxy-Gruppe bezeichnet ein Sauerstoffatom, das mit einer Aryl-Gruppe substituiert ist. Beispiele für Aryloxy-Gruppen sind Phenoxy, 4-Carbobenzyl- und 4-Phenoxyphenoxy. Bevorzugte Aryloxy-Gruppen sind Phenoxy- und substituierte Phenoxy-Gruppen. Sulfoxy-Gruppen umfassen ein hexavalentes Schwefelatom, das an zwei oder drei Substituenten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Oxo-, Alkyl-, Aryl- und Cycloalkyl-Gruppen, gebunden ist, wobei mindestens eines der Substituenten eine Oxo-Gruppe ist.

[0045] Die annehmbaren Salze der Verbindungen der Formel I beinhalten Säureadditionssalze. Solche Salze, die für die Verabreichung an Tiere, beispielsweise ein Tiermodell für Stoffwechseluntersuchungen, vorgesehen sind, können ein pharmazeutisch annehmbares Salz sein, d. h. das Salz ist eines, das nicht toxisch und annehmbar zur Verabreichung an ein Tier gemäß Regierungsverordnungen ist. Der Begriff Salze umfaßt Salze, die üblicherweise verwendet werden, um Additionssalze von Ammoniumionen zu bilden. Die Art des Salzes ist nicht kritisch. Geeignete Säureadditionssalze der Verbindungen der Formel I können aus einer anorganischen oder organischen Säure hergestellt werden. Beispiele solcher anorganischer Säuren sind Salz-, Bromwasserstoff-, Iodwasserstoff-, Salpeter-, Carbon-, Schwefel- und Phosphorsäure. Geeignete organische Säuren können ausgewählt sein aus aliphatischen, cycloaliphatischen, aromatischen, arylaliphatischen, heterocyclischen, Carbon- und Sulfon-Arten organischer Säuren, wofür Beispiele Ameisen-, Essig-, Propion-, Bernstein-, Glykol-, Glukon-, Malein-, Embon- (Pamo-), Methansulfon-, Ethansulfon-, 2-Hydroxyethansulfon-, Panthothen-, Benzolsulfon-, Toluolsulfon-, Sulfanil-, Mesyl-, Cyclohexylaminosulfon-, Stearin-, Algen-, b-Hydroxybutter-, Malon-, Milch- und Galakturonsäure. All diese Salze können durch konventionelle Mittel aus der entsprechenden Verbindung der Formel I, z. B. durch Behandeln der Verbindung der Formel I mit einem geeigneten Salz, hergestellt werden.

II. Beschreibung

[0046] Die Erfindung stellt Verbindungen der Formel I, Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung bereit. Die Verbindungen der Formel I sind geeignet zur Untersuchung der Aktivität von CYP2D. Die Verbindungen sind besonders geeignet zur Messung der potentiellen Hemmung von CYP2D6, bevorzugt in einem Hochdurchsatz-Screening-Assay. Beispielsweise stellt die Erfindung ein Verfahren zur Untersuchung von CYP2D bereit, das das In-Kontakt-bringen eines CYP2D-Enzyms mit einer Verbindung der Formel I unter den Bedingungen beinhaltet, unter denen das CYP2D-Enzym mit der Verbindung der Formel I wechselwirkt und die Dealkylierung an Position 7 der Verbindung katalysiert, um ein 7-Hydroxycumarin-Produkt zu bilden. Solche Bedingungen sind dem Fachmann bekannt (siehe hinsichtlich der Bedingungen auch z. B. die Beispiele). Dieses Verfahren kann unter Verwendung von In-vivo- oder In-vitro-Quellen des Enzyms CYP2D durchgeführt werden. In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Untersuchung der potentiellen CYP2D-Hemmung durch eine Testchemikalie, bevorzugt in einem Hochdurchsatz-Screening-Assay, bereit. Solche Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und beispielhaft in den Beispielen angegeben.

[0047] Die vorliegende Erfindung umfaßt, in einem ersten Aspekt, Verbindungen der Formel I:



- (a) wobei R1 ein Hydrid oder ein Halogen (z. B. F, Cl, Br und I) ist;
 (b) wobei R2 ein Alkyl (z. B. Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl und Pentyl) oder ein Cycloalkyl (z. B. Cyclohexyl) oder ein Aryl (z. B. Benzyl) ist;
 (c) wobei R3 ein Hydrid oder ein Halogen (z. B. F, Cl, Br und I) ist;
 (d) wobei R4 ein Hydrid, ein Alkyl (z. B. Methyl, Ethyl, CF₃, CN) oder ein Aryl (z. B. Benzyl) ist;

- (e) wobei R5 ein Hydrid, ein Alkyl (z. B. Methyl, Ethyl) oder ein Aryl (z. B. Benzyl) ist;
- (f) wobei R6 ein Alkyl (z. B. Methyl, Ethyl, Propyl) ist;
- (g) wobei R7 ein Alkyl (z. B. Methyl, Ethyl, Propyl) ist;
- (h) wobei n 0, 1, 2, 3 oder 4 ist;
- (i) wobei m 0 oder 1 ist; und
- (j) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion (z. B. ein Halogen wie Cl, F, Br, I oder eine organische Base wie AcO⁻) ist.

[0048] Jeder der Substituenten R1, R2, R3, R4, R5, R6 und R7 ist unabhängig aus den oben angegebenen Gruppen ausgewählt.

[0049] Bevorzugt sind R1 und R3 beide Hydrid oder Halogen. Beispielsweise können R1 und R3 jeweils Fluor, Chlor, Brom oder Iod sein. Das bevorzugte Halogene ist Fluor. Besonders bevorzugt sind R1 oder R3 oder beide Hydrid.

[0050] Bevorzugt ist R2 ein Alkyl, ein Cycloalkyl oder ein Aryl. Besonders bevorzugt ist R2 ein Alkyl oder ein Aryl. Die bevorzugten R2-Alkyle sind ungesättigte Alkyle, die 1 bis 5 Kohlenstoffatome, einschließlich, enthalten. Das bevorzugte R2-Aryl ist Benzyl.

[0051] Bevorzugt ist R4 ein Hydrid oder ein Alkyl. Das R4-Alkyl kann substituiert oder unsubstituiert sein; die bevorzugten R4-Alkyle sind jedoch gesättigtes Alkyl enthaltend 1–5 Kohlenstoffatome, einschließlich. Das am meisten bevorzugte R4 ist ein Alkyl, das in einer Weise substituiert ist, daß es eine elektronenanziehende Gruppe, z. B. CF₃ oder CN, enthält. Diese substituierten Alkyl-Gruppen verleihen den Verbindungen der Formel 1 verschiedene Fluoreszenzeigenschaften. Auf diese Weise kann man die Exzitations- und Emissionswellenlängen des fluoreszierenden Produktes, das durch die Einwirkung von CYP2D auf die Verbindung der Formel 1 gebildet wird, vorhersehbar durch Veränderung der Identität der R4-Gruppe ändern.

[0052] Für Verbindungen der Formel 1, die quartäre Amine sind, ist R5 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, Alkyl oder einem Aryl. Die bevorzugten R5-Alkyle sind gesättigte oder ungesättigte Alkyle, die 1–5 Kohlenstoffatome, einschließlich, enthalten. Die am meisten bevorzugten R5-Alkyle sind Methyl oder Ethyl. Das am meisten bevorzugte R5-Aryl ist Benzyl.

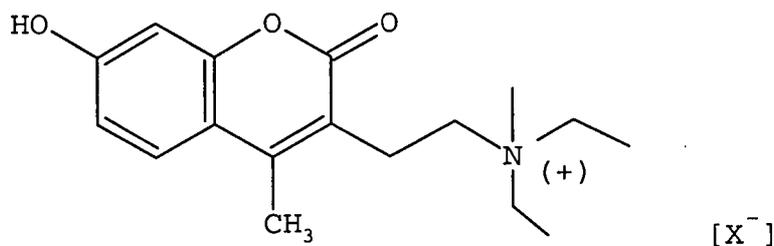
[0053] Die R6- und R7-Gruppen werden unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einem Alkyl und einem Aryl. Besonders bevorzugte R6- und R7-Gruppen sind ungesättigte Alkyle, die einen 1–5 Kohlenstoffatome, einschließlich, enthalten. Besonders bevorzugt sind R6 und R7 Alkylgruppen, die 1, 2 oder 3 Kohlenstoffatome enthalten, und am meisten bevorzugt sind die R6- und R7-Alkyle Ethyl.

[0054] Die Verbindungen der Formel 1 können tertiäre (d. h. m = 0) oder quartäre (d. h. m = 1) Amine sein. Quartäre Amine der Formel I benötigen ein negativ geladenes Gegenion wie z. B. ein Halogen oder eine organische Base. Das Halogen kann Fluor, Bor, Brom oder Iod sein, wobei Chlor bevorzugt ist. In die organischen Basen, die Gegenionen sein können, sind Formiat, Acetat, Maleat und Succinat eingeschlossen.

[0055] In den bevorzugten Ausführungsformen ist n 0, 1, 2, 3 oder 4, und besonders bevorzugt ist n 2.

[0056] In den am meisten bevorzugten Ausführungsformen ist die Verbindung der Formel 1 Verbindung 1a (AMMC, C₁₈H₂₆NO₃, Name: 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin) oder Verbindung 1b (C₁₉H₂₃F₃NO₃, Name: 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-trifluormethylcumarin) oder Verbindung 1c (C₁₇H₂₀F₃NO₃, Name: 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-methoxy-4-trifluoromethylcumarin) oder Verbindung 1d (AMC, C₁₇H₂₃NO₃, Name: 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin). Besonders bevorzugt ist die Verbindung 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin).

[0057] In den am meisten bevorzugten Ausführungsformen ist das Produkt, hergestellt durch das Verfahren des In-Reaktion-Bringens eines CYP2D-Enzyms mit einer Verbindung der Formel I, eine Verbindung der Formel II. Beispiele für Verbindungen der Formel II beinhalten Verbindung 1a (AMHC, C₁₇H₂₄NO₃), Name: 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin):



Verbindung IIa

[0058] Insbesondere ist die Verbindung II ein Reaktionsprodukt der Reaktion von CYP2D unter Verwendung des Substrats AMMC (Verbindung Ia).

[0059] Salze der Verbindungen der Formel I werden von den erfindungsgemäßen Verbindungen ebenfalls umfaßt.

[0060] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung wird eine Zusammensetzung umfassend eine Verbindung der Formel I bereitgestellt. Die Verbindung ist in der Zusammensetzung in einer Konzentration von mehr als mindestens 50 Gewichtsprozent anwesend und ist in der Zusammensetzung besonders bevorzugt in einer Konzentration von mehr als mindestens 75% Gewichtsprozent enthalten. Die am meisten bevorzugte Zusammensetzung enthielt eine Konzentration der Verbindung der Formel I, die mindestens 80, besonders bevorzugt mindestens 90 und am meisten bevorzugt mindestens 95% Gewichtsprozent betrug.

[0061] Die Zusammensetzungen können in Fläschchen enthalten sein, die Bestandteile eines Kits zur Untersuchung der CYP2D-Enzymaktivität sind. Die Fläschchen können vorgewählte Mengen der Zusammensetzungen enthalten, um zur Erreichung einer vorgewählten Konzentration der Verbindung für die Durchführung eines CYP2D-Enzym-Assays das Lösen der Inhalte zu erleichtern. Entsprechend enthalten die Zusammensetzungen in bestimmten Ausführungsformen der Erfindung die geeigneten Puffer zur Durchführung einer Enzymreaktion, bei der die Verbindung der Formel I als Substrat zur Bildung eines fluoreszierenden Produkts dient.

[0062] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Untersuchung der CYP2D-Enzymaktivität bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltet das In-Kontakt-bringen eines CYP2D-Enzyms mit einer Verbindung der Formel I. Das Verfahren zur Untersuchung der CYP2D-Aktivität wird verwendet, um die Aktivität eines CYP2D zu bestimmen, das in einer biologischen Flüssigprobe oder Feststoffprobe (z. B. eine Biopsieprobe aus Leber, Hirn oder Darm) enthalten sein kann, oder das in einem zellhaltigen oder zellfreien System (z. B. ein mikrosomenhaltiges cDNA-exprimiertes CYP2D) enthalten sein kann. Auf diese Weise können Zustände, die mit Mängeln oder Überexpression der CYP2D-Enzymaktivität verbunden sind, festgestellt werden.

[0063] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Screening-Verfahren zur Identifizierung von Mitteln bereitgestellt, die die CYP2D-Enzymaktivität hemmen. Das Verfahren beinhaltet das In-Kontakt-bringen eines CYP2D-Enzyms mit einer Verbindung der Formel I in Gegenwart eines mutmaßlichen CYP2D-Enzyme-Inhibitors und das Identifizieren eines Mittels, das die CYP2D-Enzymaktivität hemmt, als den CYP2D-Enzym-Inhibitor. In den bevorzugten Ausführungsformen ist das Screening-Verfahren ein Hochdurchsatz-Screening-Verfahren. Besonders bevorzugt wird der Screening-Assay in einer Multiwell-(z. B. Mikrotiter-)Platte oder einem Behälter zur Aufnahme eines relativ kleinen Volumens durchgeführt, z. B. wird die Verbindung der Formel I mit dem mutmaßlichen CYP2D-Enzym-Inhibitor und dem CYP2D-Enzym im Loch einer Mikrotiterplatte oder einem kleinen Fläschchen in Kontakt gebracht. In bestimmten Ausführungsformen können die Verbindungen der Formel I in dem Mikrotiterplattenloch oder dem kleinen Fläschchen bereitgestellt werden. Beispielsweise können die Verbindungen der Formel I in einem oder mehreren Fläschchen verteilt werden, die dann lyophilisiert oder auf andere Weise getrocknet werden, um ein Produkt bereitzustellen, das eine verbesserte Haltbarkeit aufweist. Wenn das Produkt zur Verwendung in einem Kit zur Messung der CYP2D-Enzymaktivität bereitgestellt wird, kann der Kit weiterhin Anweisung zur Auflösung der Verbindung der Formel I und, wahlweise, einen geeigneten Puffer (z. B. Enzymreaktionspuffer) zur Herbeiführung der Auflösung enthalten.

[0064] Nach einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Visualisierung eines CYP2D-Enzyms bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltet das In-Kontakt-bringen einer CYP2D-Enzym-haltigen Probe mit einer Verbindung der Formel I und Aussetzen des CYP2D-Enzyms und der Verbindung gegenüber Bedingungen, unter denen das CYP2D-Enzym die Umsetzung der Verbindung der Formel I zu einem fluoreszierenden Produkt katalysiert. In den bevorzugten Ausführungsformen wird das Verfahren zur Visualisierung eines CYP2D-Enzyms an einer Gewebeschnitt-Probe durchgeführt, d. h. die CYP2D-Enzym-haltige Probe ist ein

Gewebeschnitt wie er beispielsweise aus einer Biopsieprobe erhalten wird.

[0065] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung werden Kits zur Detektion und/oder Messung der CYP2D-Enzymaktivität bereitgestellt. Die Kits enthalten eine Verbindung der Formel I und Anweisungen zur Verwendung des Kits, um die CYP2D-Enzymaktivität zu messen. Die bevorzugten Verbindungen der Formel I sind Verbindungen, die eine hohe Bindungsspezifität für das Enzym aufweisen und für die das Enzym eine hohe Substratumsatzrate zeigt. Die Parameter werden üblicherweise durch die K_m und V_{max} -Werte für die enzymkatalysierte Umsetzung des Substrates (z. B. der erfindungsgemäßen Verbindung) zu einem fluoreszierenden Produkt wiedergegeben. Im allgemeinen wird eine im Vergleich zu einem zweiten Substrat höhere relative Affinität des CYP2D-Enzymz für ein erstes Substrat durch einen im Vergleich zu dem zweiten Substrat niedrigeren K_m -Wert für das erste Substrat angezeigt. Ein im Vergleich zu einem zweiten Substrat höherer katalytischer Umsatz für ein erstes Substrat wird durch ein höheres V_{max} für das erste Substrat angezeigt. Die bevorzugten erfindungsgemäßen Verbindungen haben einen K_m von größer als etwa 50 nM mit einem V_{max} größer als etwa $0,05 \text{ min}^{-1}$. Im allgemeinen weisen die erfindungsgemäßen Verbindungen einen K_m von etwa 1 bis etwa 100 mM und ein V_{max} von etwa 0,05 bis etwa 20 min^{-1} auf, mit einem bevorzugten Bereich für K_m von größer als etwa 50 nM und einem bevorzugten Bereich für V_{max} von etwa 0,2 bis etwa 20 min^{-1} .

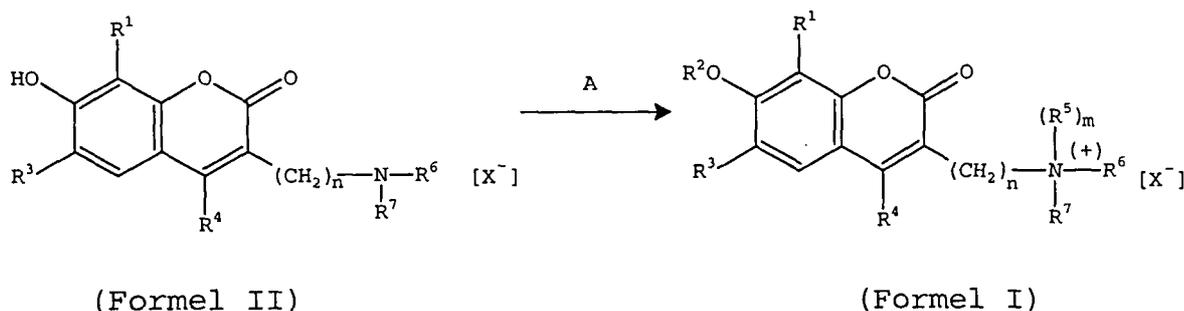
[0066] Nach noch einem anderen Aspekt der Erfindung werden neue fluoreszierende Produkte bereitgestellt. Die fluoreszierenden Produkte werden als ein Reaktionsprodukt der CYP2D-katalysierten Reaktion eines Substrates, das eine Verbindung der Formel I ist, hergestellt. Im allgemeinen weisen die Verbindungen (die Verbindungen der Formel II) Strukturen auf, die sich von den Verbindungen der Formel I darin unterscheiden, daß sie eine Hydroxyl-Gruppe an Position 7 des Cumarinrings aufweisen.

Allgemeine Syntheseverfahren

Allgemeines Verfahren I

[0067] Eine Verbindung der Formel II oder ein kommerziell erhältliches Reagenz wird durch Behandlung mit Reagenz A und eine Base wie beispielsweise Kaliumcarbonat in einem geeigneten Lösungsmittel wie beispielsweise Tetrahydrofuran, Acetone, Dimethylsulfoxid, Acetonitril oder Dimethylformamid bei Temperaturen im Bereich von 0°C bis 75°C in eine Verbindung der Formel I, die ein quartäres Amin ist, umgesetzt. Eine für die Durchführung dieser Reaktion bevorzugte Verbindung ist Verbindung IIa (Register-Nr. 15776-59-7, Name: 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin-Hydrochlorid), kommerziell erhältlich (Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI), um eine bevorzugte Verbindung der Formel I zu erhalten, Verbindung Ia (AMMC).

Reaktion 1

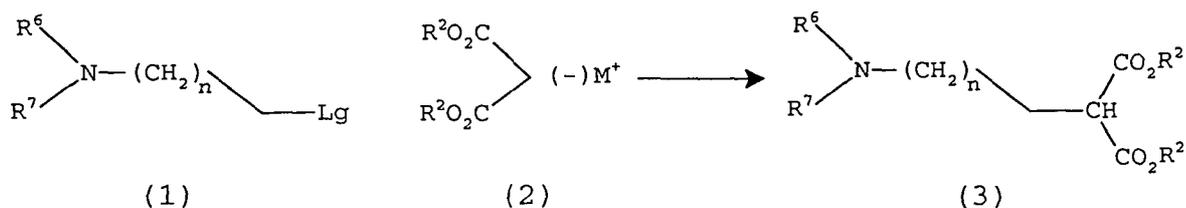


wobei R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, m und n wie oben definiert sind; wobei A ein Alkohole alkylierendes Reagenz wie beispielsweise Iodmethan, Iodethan, Benzylbromid, Diazomethan oder (Trimethylsilyl)diazomethan ist.

Allgemeines Verfahren 2

[0068] Verbindung 1 oder eine kommerziell erhältliches Reagenz wird durch Reaktion mit einem Dialkylmalonat, Verbindung 2, in einem geeigneten Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran, Diethylether oder Dimethylformamid bei einer Temperatur im Bereich von 0°C bis 100°C zu Verbindung 3 umgesetzt. In den folgenden Reaktionen wird jedes der Zwischenprodukte wahlweise durch die Reinigungsverfahren, die in den besonderen Beispielen beschrieben sind, gereinigt.

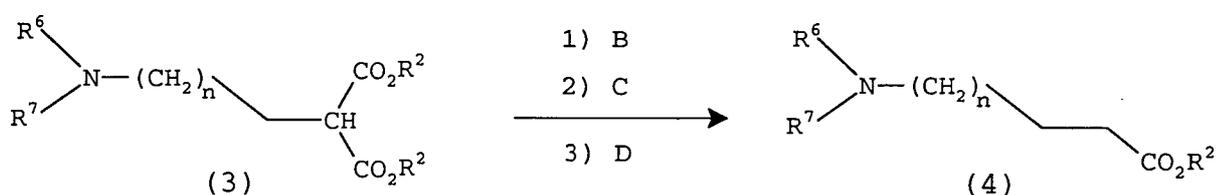
Reaktion 2



wobei R2, R6, R7 und n wie oben definiert sind; wobei Lg eine Abgangsgruppe wie beispielsweise ein Halogen oder Tosylat ist; wobei M ein monovalentes Metall wie Natrium, Lithium, oder Kalium ist.

[0069] Verbindung 3 wird durch Entesterung mit B, Decarboxylierung mit C und Veresterung mit D in einem geeigneten Lösungsmittel wie beispielsweise Wasser bei Temperaturen im Bereich von 0°C bis 100°C zu Verbindung 4 umgesetzt.

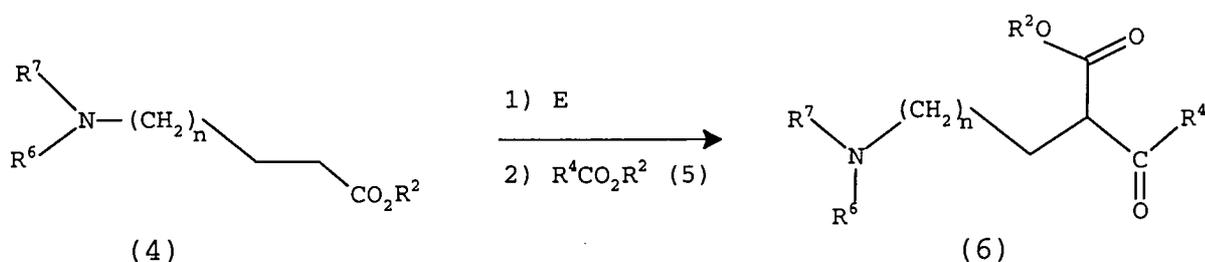
Reaktion 3



wobei R2, R6, R7 und n wie oben definiert sind; wobei B eine Base wie Natriumhydroxid oder Lithiumhydroxid ist; wobei C eine Säure wie Salzsäure ist; wobei D ein Alkohol wie Methanol oder Ethanol ist.

[0070] Verbindung 4 wird mittels des in Linderman und Graves, J. Org. Chem., 54, 661–668, (1989), beschriebenen Verfahrens zu Verbindung 6 umgesetzt. Verbindung 4 wird mit E in einem geeigneten Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran bei -78°C in sein entsprechendes Enolat umgesetzt und dann zur Bildung der Verbindung 6 durch Zugabe der Verbindung 5 bei Temperaturen im Bereich von 0–75°C acyliert.

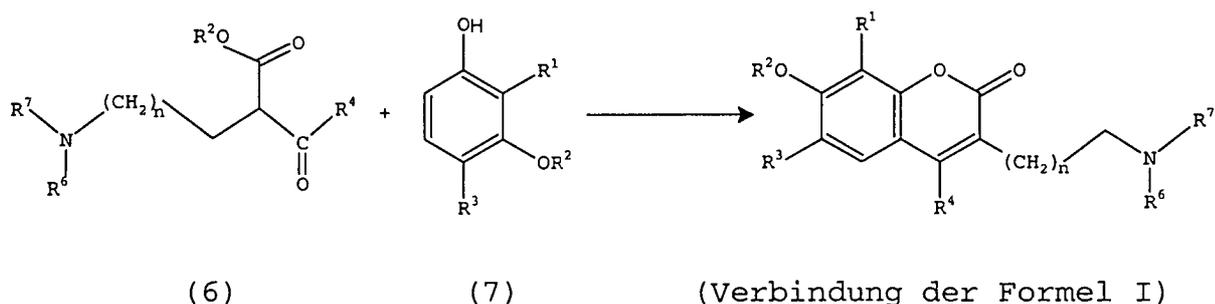
Reaktion 4



wobei R2, R4, R5, R6, R7 und n wie oben definiert sind; wobei E eine Base wie Lithiumdiisopropylamin (LDA) ist.

[0071] Verbindung 6 wird durch Behandlung mit Verbindung 7 und einer Säure wie Trifluoressigsäure mittels des in Bayer et. al., J. Fluorine Chem., 20, 187–202, (1982) beschriebenen Verfahrens bei Temperaturen im Bereich von 0–200°C zu einer Verbindung der Formel 1 umgesetzt.

Reaktion 5

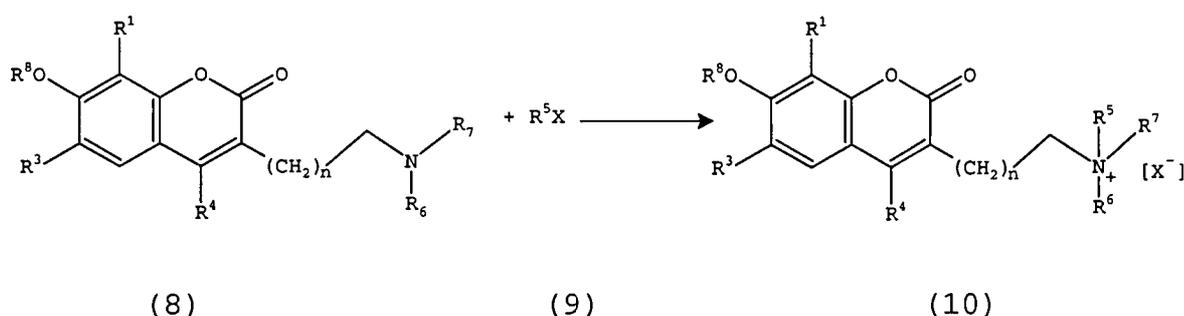


wobei R1, R2, R3, R4, R6, R7 und n wie oben definiert sind.

Allgemeines Verfahren 3

[0072] Verbindung 8, eine kommerziell erhältliche Verbindung oder gemäß allgemeinem Verfahren 2 synthetisiert, wird durch Behandeln mit Verbindung 9 entweder ohne Lösungsmittel oder mit einem geeigneten Lösungsmittel wie Aceton, Tetrahydrofuran oder Dimethylformamid bei Temperaturen im Bereich von 0–100°C zu Verbindung 10 umgesetzt.

Reaktion 6

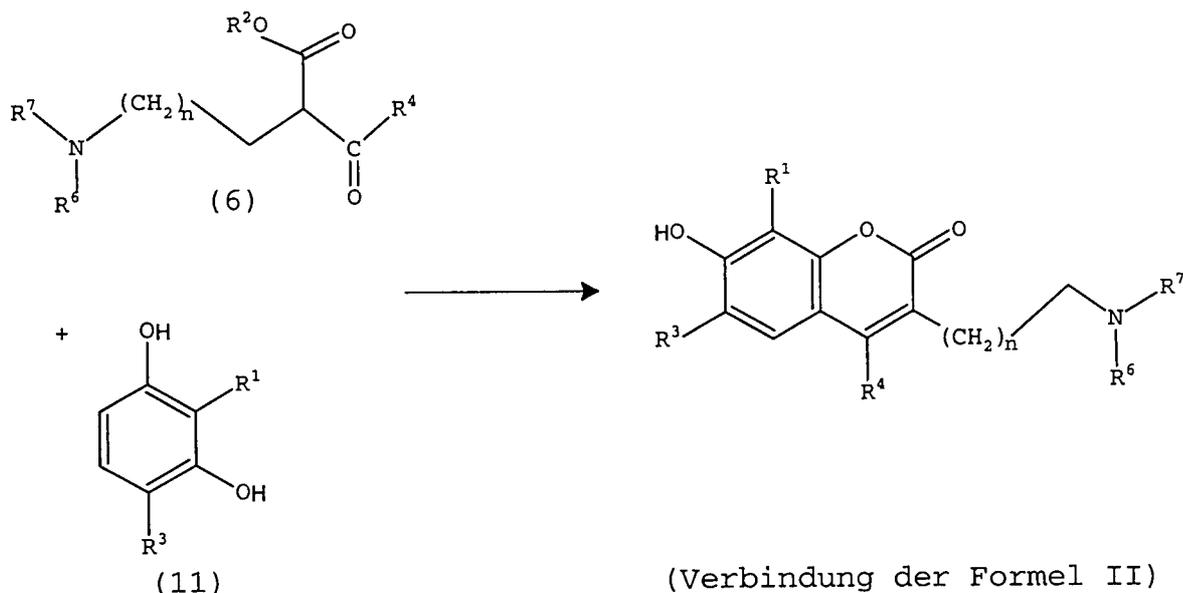


wobei R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, X⁻ und n wie oben definiert sind; wobei R8 ein Hydrid, ein Alkyl, ein Cycloalkyl oder ein Aryl ist; wobei X ein Halogen ist. Wenn R8 Hydrid ist, dann fällt Verbindung 10 unter Formel II. Wenn R8 ein Alkyl, ein Cycloalkyl oder ein Aryl ist, dann fällt Verbindung 10 unter Formel I.

Allgemeines Verfahren 5

[0073] Verbindung 6, eine kommerziell erhältliche Verbindung oder gemäß allgemeinem Verfahren 2 synthetisiert, wird durch Behandeln mit Verbindung 11 und einer Säure wie Trifluoressigsäure mittels des in Bayer et. al., J. Fluorine Chem., 20, 187–202, (1982) beschriebenen Verfahrens bei Temperaturen im Bereich von 0–200°C zu Verbindungen der Formel II umgesetzt.

Reaktion 7



wobei R1, R2, R3, R4, R6, R7 und n wie oben definiert sind.

BEISPIELE

[0074] Die folgenden Beispiele sind ausführliche Beschreibungen der Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I und Formel II. Diese ausführlichen Zubereitungen fallen in den Bereich der oben beschriebenen Verfahren, die Teil der Erfindung sind, und dienen zu deren Veranschaulichung. Diese Beispiele werden lediglich zu Veranschaulichungszwecken dargestellt und sind nicht dafür gedacht, den Bereich der Erfindung zu beschränken. Tabelle I stellt eine Liste von spezifischen Beispielen für die Formeln I und II dar.

Beispiel 1: Herstellung von 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (Verbindung Ia)

[0075] Zu einer Lösung von 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin-Hydrochlorid (0,5 g) in Aceton (200 ml) wurden Kaliumcarbonat (5 g) und Iodmethan (2,25 g) hinzugefügt. Nach Rühren für 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Mischung über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert, und bis zur Trockne eingedampft, um 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (Ia) als ein weißes Pulver zu erhalten. ¹H-NMR (CD₃OD) δ 7,75 (d, 1H, ArH), 7,10–6,91 (m, 1H, ArH), 6,92–6,90 (m, 1H, ArH), 3,89 (s, 3H, OCH₃), 3,52–3,42 (m, 2H, NCH₂), 3,34–3,30 (m, 2H, ArCH₂), 3,12–3,05 (m, 5H, NCH₂, NCH₃), 2,52 (s, 3H, ArCH₃), 1,46–1,41 (m, 6H, CH₂CH₃) Schm.p. 245–246,5 C. Anal. Kalkd. für C₁₈H₂₆INO₃: C, 49,71; H, 6,12; I, 29,18; N, 3,22. Gefunden: C, 49,37; H, 6,11; I, 29,21; N, 3,24.

Beispiel 2: Herstellung von 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-methoxy-4-trifluoromethylcumarin (Verbindung Ic)

[0076] Zu einer gerührten Lösung von Diethylmalonat (1, 110,8 g, 0,691 mol) in Tetrahydrofuran (400 mL) wurde Natrium (15,9 g, 0,691 mol) zugefügt und die erhaltene Lösung wurde über Nacht gekocht. 2-Diethylaminoethylchlorid in Ethylether (100 mL) wurde dann bei 50–60°C zu dieser Lösung hinzugefügt, nach der vollständigen Zugabe wurde die Temperatur erhöht und die Lösung für 5 h gekocht. Die Reaktionsmischung wurde dann unter Stickstoffatmosphäre abgekühlt, auf Eis gegeben und mit Diethylether extrahiert und dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Verdampfung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck ergab den Rohrückstand, der über Silikagel (50% Ethylether in Hexan mit 2% Methanol und 2% Ammoniumhydroxid) chromatographiert wurde, und lieferte Ethyl(2-carboxyethyl-4-diethylamino)butyrat (gelbes Öl, 128,2 g, 75%).

[0077] Ethyl(2-carboxyethyl-4-diethylamino)butyrat (128,2 g, 0,495 mol) in Tetrahydrofuran (600 mL) und Methanol (200 ml.) wurden mit Lithiumhydroxid (45,7 g, 1,09 mol) in Wasser (200 mL) durch Rühren bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre über Nacht hydrolysiert. Die Lösungsmittel wurden dann entfernt und der Rückstand mit 290 mL 6 M Salzsäure (zu pH = 1–2) angesäuert und über Nacht gekocht. Die Reaktionsmischung wurde abgekühlt. Methanol (3 L) und konzentrierte Salzsäure (30 mL) wurden dann hinzugefügt, die erhaltene Lösung über Nacht gekocht. Das Methanol wurde entfernt und der Rückstand abgekühlt und mit kon-

zentriertem Ammoniumhydroxid auf pH ~9 neutralisiert. Das Produkt wurde mit Methylenchlorid extrahiert und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Aufkonzentrierung unter vermindertem Druck ergab Methyl(4-diethylamino)butyrat (gelbes Öl, 45,7 g, 53%).

[0078] Ein 5-L-4-Hals-Kolben wurde mit einem mechanischen Rührer und zwei zusätzlichen Trichtern ausgestattet. In diesen Kolben wurde Diisopropylamin (43,87 g, 0,433 mol) in Tetrahydrofuran (500 mL) unter Stickstoffatmosphäre gegeben. Die Lösung wurde dann auf -78°C abgekühlt, und hierzu wurden dann 2,5 M n-Butyllithium in Hexan (173,5 mL, 0,433 mol) zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde dann für 30 min. bei -78°C gerührt. Methyl-4-diethylaminobutyrat in Tetrahydrofuran (300 mL) wurde dann hinzugefügt und die erhaltene Lösung für 2 h bei -78°C gerührt. Dann wurde Trifluoroethylacetat (82,13 g, 0,578 mol) in Tetrahydrofuran (200 mL) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde dann bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde auf 0°C abgekühlt und mit Wasser (50 mL) abgeschreckt. Die Lösung wurde dann für 30 min. gerührt und in vacuo konzentriert. Der Rückstand wurde mit Methylenchlorid verdünnt, mit Wasser, Sole, gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Verdampfung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck ergab Methyl(2-trifluoroaceto-4-diethylamino)butyrat als einen braunen halbfesten Stoff (60,4 g, 78%).

[0079] Zu einer gekühlten (0°C) gerührten Lösung von Methyl(2-trifluoroaceto-4-diethylamino)butyrat (32,33 g, 0,12 mol) und Methylresorcin (14,92 g, 0,12 mol) wurde Trifluoressigsäure (60 mL) zugefügt und die erhaltene Lösung für 3 Tage gekocht. Die Reaktionsmischung wurde abgekühlt, mit Ammoniumhydroxid (pH 9,5–10) neutralisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde dann mit Wasser, Sole, gewaschen und dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Verdampfung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck ergab den Rohfeststoff, der über Silikagel (40% Ethylacetat/Hexan \rightarrow 80% Ethylacetat/Hexan) chromatographiert wurde, und lieferte 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-methoxy-4-trifluormethylcumarin (Verbindung Ic) als einen weißen Feststoff 3,3 g [Rf ~0,3 (70% Ethylacetat/Hexan), 7,9%] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) d 7,70–7,64 (m, 1H, ArH), 6,90–6,83 (m, 2H ArH), 3,88 (s, 3H, OCH_3), 3,05–2,96 (m, 2H, ArCH_2), 2,73–2,55 (m, 6H, NCH_2), 1,10–1,04 (m, 6H, NCH_2CH_3). Schm.p. 75–76,5 C. Anal. Kalkd. für $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{NO}_3$: C, 59,77; H, 6,0; N, 4,03. Gefunden: C, 60,20; H, 5,96; N, 3,74.

Beispiel 3: Herstellung von 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-trifluormethylcumariniodid (Verbindung Ib)

[0080] 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-methoxy-4-trifluormethylcumarin (Verbindung Ic) (100 mg, 0,29 mmol) in Methyljodid (1 mL) wurde in einem geschlossenen Reaktionsfläschchen für 4 h gerührt. Der weiße Feststoff wurde dann filtriert, mit Ethylacetat und Pentan gewaschen und ergab 120 mg (85%) 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-trifluormethylcumariniodid (Verbindung Ib). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) d 7,70–7,67 (m, 1H, ArH), 7,18–7,17 (m, 1H, ArH), 7,10–7,00 (m, 1H, ArH), 3,92 (s, 3H, OCH_3), 3,45–3,39 (m, 4H, NCH_2), 3,34–3,27 (m, 2H, NCH_2), 3,18–3,09 (m, 2H, ArCH_2), 3,03 (s, 3H, NCH_3), 1,28–1,25 (m, 6H, NCH_2CH_3). Schm.p. 214 C. Anal. Kalkd. für $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{INO}_3$: C, 44,55; H, 4,78; N, 2,89. Gefunden: C, 44,49; H, 4,79; N, 2,80.

Beispiel 4: Herstellung von 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-trifluormethylcumarin (Verbindung IIc)

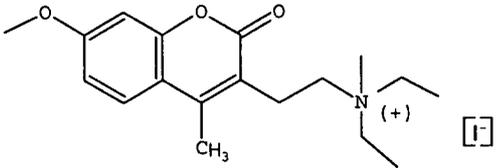
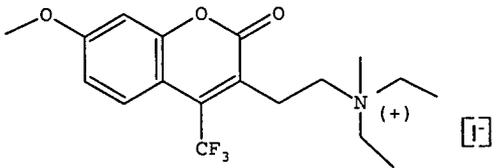
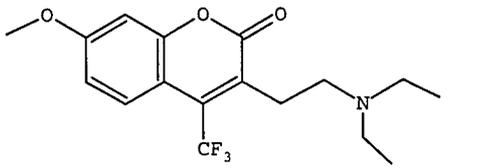
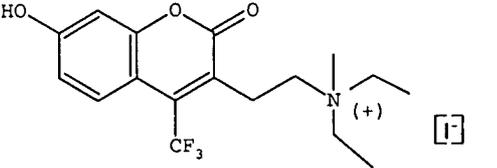
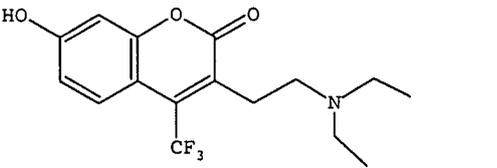
[0081] Zu einer gekühlten (0°C) gerührten Lösung von Methyl(2-trifluoroaceto-4-diethylamino)butyrat 7 (10,9 g, 0,04 mol) und Resorcin (4,46 g, 0,04 mol) wurde Trifluoressigsäure (33,5 ml) zugegeben und die erhaltene Lösung für 3 Tage gekocht. Die Reaktionsmischung wurde abgekühlt, mit Ammoniumhydroxid (pH 8–9) neutralisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde dann mit Wasser, Sole, gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Verdampfung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck ergab den Rohrückstand, der über Silikagel (40–70% Ethylacetat/Hexan) chromatographiert wurde, was das Produkt 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-trifluormethylcumarin (Verbindung IIc) als einen gelben Feststoff (1,15 g, 8,6%) ergab. Rf ~0,3 (70% EtOAc/Hexan), $^1\text{H-NMR}$ (Aceton- d_6) d 7,65–7,62 (m, 1H, ArH), 6,94–6,90 (m, 1H, ArH), 6,81–6,80 (m, 1H, ArH), 2,96–2,93 (m, 2H, ArCH_2), 2,69–2,61 (m, 2H, NCH_2), 2,58–2,51 (m, 4H, NCH_2), 1,02–0,97 (m, 6H, NCH_2CH_3). Schm.p. 122–123 C. Anal. Kalkd. für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NO}_3$: C, 58,36; H, 5,51; N, 4,25. Gefunden: C, 58,49; H, 5,62; N, 4,13.

Beispiel 5: Herstellung von 3-(2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl)-7-hydroxy-4-trifluormethylcumariniodid (Verbindung IIb)

[0082] Zu einer gerührten Lösung von 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-trifluormethylcumarin (Verbindung IIc) (60 mg, 0,18 mmol) in Aceton (0,3 mL) wurde Methyljodid (0,5 mL) zugegeben, dann wurde die erhaltene Lösung für 5 min. gerührt. Der gebildete weiße Feststoff wurde filtriert und mit Aceton und Pentan ge-

waschen. Auf diese Weise wurde das Produkt 3-(2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl)-7-hydroxy-4-trifluormethylcumariniodid (Verbindung IIb) als ein weißer Feststoff (47 mg, 53,5%) isoliert. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 7,64–7,60 (m, 1H, ArH), 6,99–6,90 (m, 1H, ArH), 6,84–6,83 (m, 1H, ArH), 3,45–3,39 (m, 4H, NCH_2), 3,34–3,25 (m, 2H, NCH_2), 3,14–3,05 (m, 2H, ArCH_2), 3,02 (s, 3H, NCH_3), 1,30–1,25 (m, 6H, NCH_2CH_3). Schm.p. 220–221 C. Anal. Kalkd. für $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{INO}_3$, 0,6 H_2O : C, 42,36; H, 4,64; N, 2,91; I, 26,32. Gefunden: C, 41,98; H, 4,84; N, 2,85; I, 26,30.

TABELLE I

#	Struktur	Allgemeines Verfahren
Ia		1
Ib		3
Ic		2
IIb		3
IIc		4

Biologische Bewertung.

[0083] Die Bewertung der Verbindungen der Formel I hinsichtlich ihrer Eignung als CYP2D-Substrate beinhaltet: (1) Enzymkinetiken für die Verbindungen der Formel I wurden unter Verwendung von cDNA-exprimiertem CYP2D ermittelt; (2) Die Spezifität der Verbindungen der Formel I als Substrate für CYP2D wurde unter Verwendung einer Reihe von cDNA-exprimierten menschlichen P450-Enzymen untersucht; (3) Die Spezifität der Verbindungen der Formel I als Substrate für CYP2D wurde in menschlichen Leber-Mikrosomen untersucht; und (4) Die IC_{50} -Werte für bekannte Inhibitoren von CYP2D6, gemessen in einem Hochdurchsatz-Screening-Assay von Verbindungen der Formel I, wurden mit den Werten von bekannten Substraten, die für diese Anwendung geeignet sind, korreliert.

(1) Enzymkinetiken mit cDNA-exprimiertem CYP2D6

[0084] Die Bewertung von Verbindungen der Formel I wurde zunächst durch Messung der Umsatzkinetiken unter Verwendung von cDNA-exprimiertem CYP2D6 durchgeführt. V_{max} - und K_{m} -Werte sind wichtig für die Optimierung der Testbedingungen und zur Bestimmung der Parameter für die Hemmexperimente. Fluorometrische Untersuchungen für den Umsatz der Verbindungen der Formel I durch CYP2D6 wurden auf Grundlage einer Modifikation des Verfahrens von Crespi et al. Anal Biochem. 248, 188–190, (1997), (unten beschrieben) durchgeführt. Vergleiche der Enzymkinetiken (Tabelle II) für Verbindungen der Formel I und das Substrat 3-Cy-

ano-7-ethoxycumarin (CEC) zeigen, daß CYP2D6 eine höhere Affinität für Verbindungen der Formel I (niedrigerer K_m) und einen höheren katalytischen Umsatz für Verbindungen der Formel I (höheres V_{max}) aufweist. Innerhalb der Serien Ia–Ic weist Verbindung Ia den höchsten katalytischen Umsatz auf und ist daher das am besten geeignete Substrat. Die Verbindungen Ib und Ic enthalten jedoch die 4-Trifluormethyl-Gruppe (R4), die die Fluoreszenzeigenschaften dieser Moleküle zu längeren Wellenlängen hin verschiebt. Für den Fall, daß ein mutmaßlicher Inhibitor konkurrierende Fluoreszenzeigenschaften mit Verbindung 1a aufweist, sind die Verbindungen Ib und Ic trotz ihres geringeren katalytischen Umsatzes geeignete CYP2D-Substrate.

TABELLE II

Verbindung #	K_m (μM)	V_{max} (min^{-1})
CEC	67	0,017
Ia	1,1	1,0
Ib	0,8	0,16
Ic	3,3	0,2

[0085] Beispiel Verbindung Ia. Untersuchungen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten (Corning COSTAR, Kat. Nr. 3915) durchgeführt. Das Substrat, Verbindung Ia, wurde in pH 7,4 Kaliumphosphatpuffer (0,1 M) zubereitet. Nach Substratzugabe wurden die Platten auf 37°C vorgewärmt. Die Inkubationen wurden mit dem Zufügen von vorgewärmtem Enzym und Kofaktoren gestartet. Die Enzyme waren kommerziell erhältlich, Baculovirus/Insektenzellen-exprimiertes menschliches CYP2D6 (SUPERSOMES®, GENTEST Corporation). Die Menge von Enzym, die pro Loch zugefügt wurde, betrug 1,5 pmol. Die Kofaktor-Endkonzentrationen betragen 0,0082 mM NADP, 0,41 mM Glucose-6-phosphat und 0,2 U/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Das endgültige Inkubationsvolumen betrug 0,2 ml. Die Inkubationen wurden für 45 Minuten durchgeführt und durch Zugabe von 0,075 ml 80% Acetonitril, 20% 0,5 M Tris-Base gestoppt. Die Fluoreszenz pro Loch wurde unter Verwendung eines BMG FLUOstar, Modell 403, unter Kontrolle eines IBM-kompatiblen Computers, gemessen. Der Metabolit wurde unter Verwendung einer Exzitations-Wellenlänge von 390 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 460 nm gemessen. Die Daten wurden exportiert und mit Hilfe eines Excel-Datenblattes analysiert. Die Aktivität wurde durch Vergleich mit einer Standard-Kurve von 3-[2-(N,N-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin-Hydrochlorid quantifiziert. Apparente K_m - und V_{max} -Werte wurden durch nicht-lineare Kinetiken unter Verwendung der Software SigmaPlot 4,0 ermittelt.

[0086] Beispiel Verbindungen Ib und Ic. Das folgende Verfahren ist auf Verbindungen Ib und Ic als Substrate anwendbar. Die Untersuchungen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten (Corning COSTAR, Kat. Nr. 3915) durchgeführt. Die Substrate, Ib und Ic, wurden in Acetonitril zubereitet. Nach Hinzufügen von Kofaktoren wurden die Platten auf 37°C vorgewärmt. Die Inkubationen wurden durch Zufügen von vorgewärmtem Enzym und Substrat gestartet. Die Enzyme waren kommerziell erhältlich, Baculovirus/Insektenzellen-exprimiertes menschliches CYP2D6 (SUPERSOMES®, GENTEST Corporation). Die Menge des hinzugefügten Enzyms pro Loch betrug 5–10 pmol. Die Kofaktor-Endkonzentrationen betragen 1,3 mM NADP, 3,3 mM Glucose-6-phosphat, 3,3 mM MgCl_2 und 0,4 U/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Das endgültige Inkubationsvolumen betrug 0,2 ml. Die Inkubationen wurden für 45 Minuten durchgeführt und durch Zugabe von 0,075 ml 80% Acetonitril, 20% 0,5 M Tris-Base gestoppt. Die Fluoreszenz pro Loch wurde unter Verwendung eines BMG-FLUOstar-Modell-403-Plattenscanners, unter Kontrolle eines IBM-kompatiblen Computers, gemessen. Der Metabolit wurde unter Verwendung einer Exzitations-Wellenlänge von 410 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 538 nm gemessen. Die Daten wurden exportiert und mit Hilfe eines Excel-Datenblattes analysiert. Die Enzymaktivität wurde durch Vergleich mit einer Standard-Kurve von 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-hydroxy-4-trifluormethylcumariniodid (Verbindung IIb) zur Untersuchung des Stoffwechsels von Ib und 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-trifluormethylcumarin (Verbindung IIc) zur Untersuchung des Stoffwechsels von Ic quantifiziert.

[0087] Apparente K_m - und V_{max} -Werte wurden durch nicht-lineare Kinetiken unter Verwendung der Software SigmaPlot 4,0 ermittelt.

(2) Selektivität für eine Reihe von cDNA-exprimierten P450-Enzymen

[0088] Die Selektivität von verschiedenen P450-Isoformen hinsichtlich der Dealkylierung der Verbindungen

Ia, Ib und Ic wurden unter Verwendung einer Reihe von kommerziell erhältlichen menschlichen cDNA-exprimierten Enzymen untersucht. Ein Substrat, das für eine einzelne P450-Isoform selektiv ist (das Substrat wird durch eine einzelne P450-Isoform katalytisch umgesetzt), ist eine erwünschte Eigenschaft, weil deren Aktivität in einer heterogenen Mischung von Enzymen, zum Beispiel in menschlichen Lebermikrosomen, untersucht werden kann. Das bereits veröffentlichte Hochdurchsatz-Screening-Substrat 3-Cyano-7-ethoxycumarin (CEC) wird in maßgeblichem Umfang durch andere menschliche P450-Cytochrome metabolisiert (Crespi et al. Anal. Biochem. 248, 188–190, (1997)). Ein Vergleich der katalytischen Selektivität für Verbindungen der Formel I ist in den Fig. 1, 2 und 3 dargestellt. Verbindung Ia ist selektiv für CYP2D6, während Verbindungen Ib und Ic auch Substrate für andere menschliche P450-Enzyme sind. Die Verbindung Ia ist daher in einer heterogenen Mischung zur Bestimmung der CYP2D-Aktivität ein geeigneteres Substrat als die Verbindungen Ib, Ic und das bisherige Substrat CEC.

[0089] Beispiel Verbindungen Ia, Ib und Ic. Die Verbindungen Ia, Ib und Ic wurden wie in dem obigen Beispiel (1) beschrieben inkubiert, mit der Ausnahme, daß die Enzymquelle aus einer der mehreren verschiedenen kommerziell erhältlichen Baculovirus/Insektenzellen-exprimierten menschlichen Cytochrom-P450-Enzyme (SUPERSOME.R™, GENTEST Corporation) bestand.

(3) Menschliche Lebermikrosomen

[0090] Menschliche Lebermikrosomen (Human liver microsomes, HLM) enthalten verschiedene Arzneimittel(Xenobiotika)-metabolisierende P450-Cytochrome. Wenn HLM als Enzymquelle verwendet werden, ist es entscheidend, daß die Sonden-Biotransformation spezifisch durch das interessierende Enzym katalysiert wird. Wenn verschiedene Enzyme zu der Sonden-Biotransformation beitragen, ist die Dateninterpretation unmöglich. Die CYP2D6-Spezifität von Substraten der Verbindung I wurde unter Verwendung von HLM und des gut charakterisierten, hochwirksamen und spezifischen CYP2D6-Inhibitors Quinidin untersucht. Der meßbare Stoffwechsel von Verbindung I war ausschließlich auf CYP2D6 zurückzuführen. Im Gegensatz zu dem bisher publizierten Hochdurchsatz-Screening-Substrat 3-Cyano-7-ethoxycumarin (CEC), das ebenfalls signifikant durch andere menschliche P450-Cytochrome metabolisiert wird (Crespi et al. Anal. Biochem. 248, 188–190, (1997)), ist Verbindung I daher ein für CYP2D6 spezifisches Substrat.

[0091] Beispiel Verbindung I. Eine 1,0 ml Reaktion enthaltend 1,0 mg/ml CYP2D6-haltige menschliche Lebermikrosomen (Donor H023, GENTEST Corporation), 0,0082 mM NADP+, 3,3 mM Glucose-6-phosphat, 0,4 U/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 3,3 mM Magnesiumchlorid und 5,0 µM Verbindung I in 100 mM Kaliumphosphat (pH 7,4), wurde in Gegenwart und Abwesenheit von µM Quinidin für 5, 10 und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl der Reaktion zu 1,9 ml 100 mM Tris (pH 9) gegeben und die Fluoreszenz wurde mit einer Exzitation bei 390 nm und Emission bei 460 nm in einem Spektralfluorometer bestimmt. Die Aktivität wurde durch Vergleich mit einer Standardkurve von 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin-Hydrochlorid (Tabelle III) quantifiziert:

Zeit (min)	pmol Produkt	pmol Produkt mit Quinidin
0	0	0
5	3,3	0
10	6,3	0
15	8,5	-0,7

(4) Hochdurchsatz-CYP2D6-Hemmungs-Auslese

[0092] Die Möglichkeit der Messung des CYP2D6-Hemmpotentials der Verbindungen der Formel I beruhte auf einer Modifikation der von Crespi et al., Anal. Biochem. 248, 188–190, (1997) publizierten Methode. Die veröffentlichte Studie untersuchte die IC₅₀ für den potenten CYP2D6-Inhibitor Quinidin unter Verwendung von CEC als Substrat. Es wurde eine gute Übereinstimmung mit den publizierten Inhibitionskinetiken für Quinidin und menschliche Lebermikrosomen festgestellt (Zanger et. al., Biochemistry, 27, 5447–5454, (1988)). Eine Reihe von selektiven CYP2D6-Inhibitoren wurde in diesem System unter Verwendung von CEC oder Verbindungen der Formel I als Substrat untersucht. Es wurde festgestellt, daß die IC₅₀-Werte zwischen CEC und den Verbindungen Ia und Ib stark korrelierten, was die Eignung dieser Substrate für die Verbindungen als Substrate für die CYP2D6-Hemmung aufzeigt.

[0093] Beispiel Verbindung I. Die Untersuchungen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Substrate, Verbindungen der Formel I, wurden in pH 7,4 Kaliumphosphatpuffer oder Acetonitril zubereitet. Die Substrat-Stammkonzentrationen betragen das Doppelte der Endkonzentration (die Endkonzentration wurde so gewählt, daß sie ungefähr dem apparenten K_m , zum Beispiel 2 μM für Verbindung I, entsprach). Die 12 Löcher in einer Reihe wurden für einen Test verwendet. Die Löcher 1 bis 8 enthielten eine Reihe von 1 : 3-Verdünnungen des Inhibitors. Die Löcher 9 und 10 enthielten keinen Inhibitor und die Reihen 11 und 12 waren Leerwerte für die Hintergrundfluoreszenz (Stoplösung wurde vor den Enzymen zugefügt). Nach Substrat- und Inhibitorzugabe wurden die Platten auf 37°C vorgewärmt. Die Inkubationen wurden durch Zugabe vorgewärmten Enzyms und Kofaktoren gestartet. Die Enzyme waren kommerziell erhältlich, Baculovirus/Insektenzellen-exprimiertes menschliches CYP2D6 (SUPERSOMES®, Kat. Nr. P217, GENTEST Corporation). Die Menge Enzym, die pro Loch zugefügt wurde, betrug 1,5 to 10 pmol. Die Kofaktor-Endkonzentrationen betragen 8,2 μM NADP, 3,3 mM Glucose-6-phosphat und 0,4 U/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase für Verbindung Ia oder 1,3 mM NADP, 3,3 mM Glucose-6-phosphat, 3,3 mM MgCl_2 und 0,4 U/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase für Verbindungen Ib und Ic. Das endgültige Inkubationsvolumen betrug 0,2 ml. Die Inkubationen wurden für 45 Minuten durchgeführt und durch Zugabe von 0,075 ml 80% Acetonitril, 20% 0,1 M Tris pH 9 gestoppt. Die Fluoreszenz pro Loch wurde unter Verwendung eines BMG-FLUOstar-Modell-403-Plattenscanners, unter Kontrolle eines IBM-kompatiblen Computers, gemessen. Der Metabolit wurde unter Verwendung einer Exzitations-Wellenlänge von 390 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 460 nm (Verbindung Ia) oder einer Emissions-Wellenlänge von 410 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 538 nm (Verbindungen Ib und Ic) gemessen. Die Daten wurden exportiert und mit Hilfe eines Excel-Datenblattes analysiert. Die IC_{50} -Werte wurden durch lineare Interpolation (Tabellen IV und V) ermittelt:

TABELLE IV – Test-Inhibitor-Verbindungen

Test-Inhibitor-Verbindung	Konzentration (in dH_2O)	Endkonz. in Loch #1
Bufuralol	6 mM	300 μM
Debrisoquin	6 mM	300 μM
Dextromethorphan	2 mM	100 μM
Fluoxetin	2 mM	100 μM
Imipramin	2 mM	100 μM
Norfluoxetin	2 mM	100 μM
Perhexilin	0,2 mM	10 μM
Propranalol	16 mM	800 μM
Quinidin	10 μM	0,5 μM
Sparteïn	40 mM	2 μM

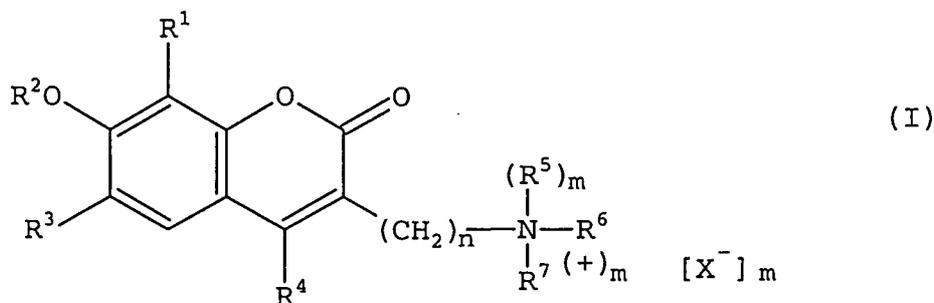
TABELLE V – CYP2D6-HTS-Substrate: IC₅₀-Werte (µM)

Inhibitor	Substrat			
	CEC	Ia	Ib	Ic
Bufuralol	27	17	23,3	104
Debrisoquin	29	20	10,6	105
Dextromethorphan	2,3	3,1	6,6	34
Fluoxetin	3,2	0,79	1,3	22
Imipramin	2,2	3,6	4,5	50
Norfluoxetin	8,4	1,1	nicht durch- geführt	nicht durch- geführt
Perhexilin	0,87	0,34	1,6	4,8
Propranalol	2,2	2,9	8,7	56
Quinidin	0,006	0,014	0,038	0,21
Sparteïn	12,1	37,7	44	676

[0094] Das Vorstehende ist lediglich eine ausführliche Beschreibung von bestimmten bevorzugten Ausführungsformen. Es sollte dem Fachmann daher ersichtlich sein, daß verschiedene Modifikationen und Äquivalente hergestellt werden können, ohne vom Gedanken oder Bereich der Erfindung abzuweichen.

Patentansprüche

1. Verbindung der Formel 2:



- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R2 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Alkyl und einem Aryl;
 (c) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (d) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (e) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (f) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (g) wobei R7 ein Alkyl ist;
 (h) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (i) wobei m 1 ist; und
 (j) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist.

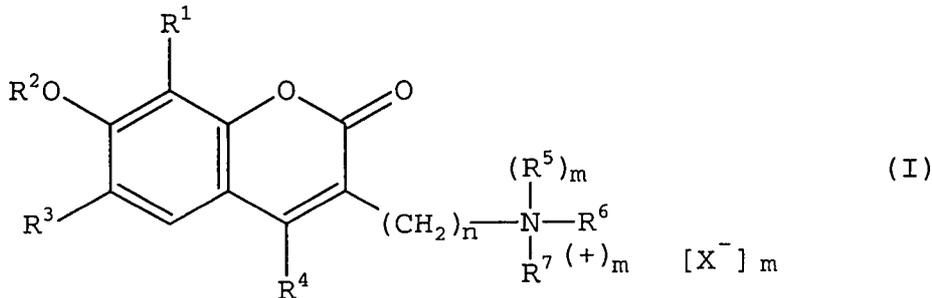
2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R1 ein Halogen ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R1 ein Hydrid ist.

4. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R2 ein Alkyl ist.
5. Verbindung nach Anspruch 4, wobei das Alkyl ein ungesättigtes Alkyl ist.
6. Verbindung nach Anspruch 5, wobei das ungesättigte Alkyl ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ethyl, Propyl, Butyl, Pentyl und Benzyl.
7. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R3 ein Halogen ist.
8. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R3 ein Hydrid ist.
9. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe und einem Alkyl.
10. Verbindung nach Anspruch 9, wobei das Alkyl ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methyl, Ethyl und CF₃.
11. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R4 ein Hydrid ist.
12. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl.
13. Verbindung nach Anspruch 12, wobei das Alkyl ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methyl und Ethyl.
14. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R5 ein Hydrid ist.
15. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R6 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methyl, Ethyl und Propyl.
16. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R7 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methyl, Ethyl und Propyl.
17. Verbindung nach Anspruch 1, wobei n 2 ist.
18. Verbindung nach Anspruch 1, wobei X⁻ ein Halogen ist.
19. Verbindung nach Anspruch 1, wobei X⁻ eine organische Base ist.
20. Verbindung nach Anspruch 19, wobei X⁻ ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Formiat, Acetat, Maleat und Succinat.
21. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Verbindung einen K_m von größer 50 nM mit einem V_{max} größer als 0,05 min⁻¹ für die CYP2D-katalysierte Reaktion aufweist.
22. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Verbindungen, bei denen:
R1 und R3 Fluor sind;
R2 Methyl, Ethyl oder Benzyl ist; und
R4 Trifluormethyl oder eine Cyanogruppe ist.
23. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Verbindung 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AMMC, C₁₈H₂₆NO₃) ist.
24. 3-[2-(Diethylamino-)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AMC, C₁₇H₂₃NO₃)
25. Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1–24, wobei die Verbindung in der Zusammensetzung in einer Konzentration von mehr als mindestens 50, 75, 80, 90 oder 95 Gewichtsprozent anwesend ist.

26. Verbindung nach einem der Ansprüche 2, 7 oder 18, wobei das Halogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, Br und I.

27. Verfahren zur Bestimmung von CYP2D-Aktivität, umfassend:
Das In-Kontakt-bringen eines CYP2D-Enzyms mit einer Verbindung der Formel I:

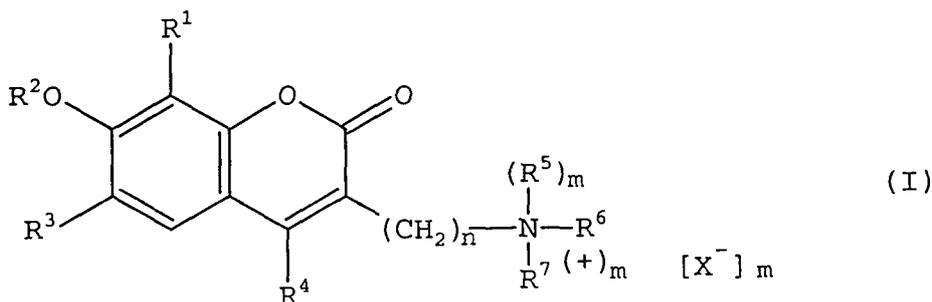


- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R2 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Alkyl und einem Aryl;
 (c) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (d) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (e) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (f) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (g) wobei R7 ein Alkyl ist;
 (h) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (i) wobei m ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 0 und 1; und
 (j) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist,
 unter Bedingungen, unter denen das CYP2D-Enzym die Umsetzung der beanspruchten Verbindung zu einem fluoreszierenden Produkt katalysiert.

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei das CYP2D-Enzym in einer biologischen Probe enthalten ist.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Probe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer Leberprobe wie beispielsweise Rohhomogenat, teilweise gereinigtem oder gereinigtem aus einer Biopsie erhaltenen Leberenzym, einem cDNA-exprimierten CYP2D, Hepatozyten und Mikrosomen.

30. Screening-Verfahren zum Auswählen von Mitteln, die die CYP2D-Enzymaktivität hemmen, umfassend:
Das In-Kontakt-bringen eines CYP2D-Enzyms mit einer Verbindung der Formel I:

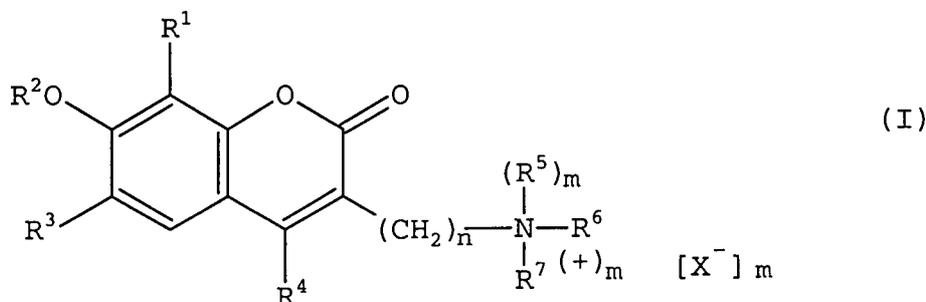


- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R2 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Alkyl und einem Aryl;
 (c) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (d) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (e) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (f) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (g) wobei R7 ein Alkyl ist;
 (h) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (i) wobei m ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 0 und 1; und
 (j) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist,

in Gegenwart eines mutmaßlichen CYP2D-Enzym-Inhibitors, und unter Bedingungen, unter denen das CYP2D-Enzym die Umsetzung der Verbindung zu einem fluoreszierenden Produkt katalysiert; und Auswählen eines Mittels, das die CYP2D-Enzymaktivität hemmt, als CYP2D-Enzym-Inhibitor.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Verbindung mit dem mutmaßlichen CYP2D-Enzym-Inhibitor in einem Loch einer Multiwellplatte in Kontakt gebracht wird.

32. Verfahren zur Visualisierung eines CYP2D-Enzyms, bei dem:
eine CYP2D-Enzym enthaltende Probe mit einer Verbindung der Formel I:



(a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R2 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Alkyl und einem Aryl;
 (c) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (d) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (e) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (f) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (g) wobei R7 ein Alkyl ist;
 (h) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (i) wobei m ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 0 und 1; und
 (j) wobei X⁻ ein negativ geladenes Gegenion ist,
 in Kontakt gebracht wird und das CYP2D-Enzym und die beanspruchte Verbindung Bedingungen ausgesetzt werden, unter denen das CYP2D-Enzym die Umsetzung der Verbindung zu einem fluoreszierenden Produkt katalysiert.

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die CYP2D-Enzym enthaltende Probe bevorzugt ein Gewebeschnitt ist.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R1 ein Halogen ist.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R1 ein Hydrid ist.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R2 ein Alkyl ist.

37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei das Alkyl ein ungesättigtes Alkyl ist.

38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei das ungesättigte Alkyl ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ethyl, Propyl, Butyl, Pentyl und Benzyl.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R3 ein Halogen ist.

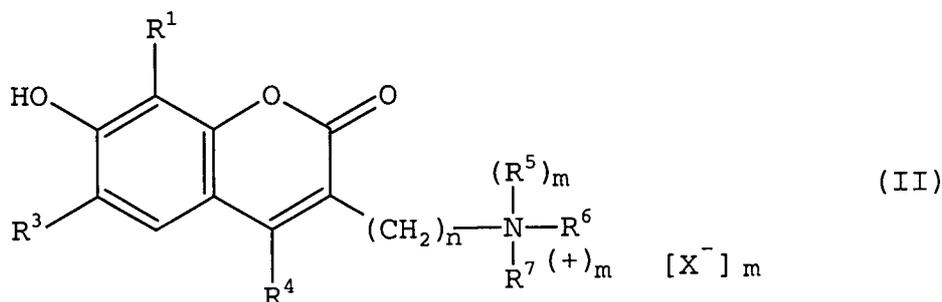
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R3 ein Hydrid ist.

41. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe und einem Alkyl.

42. Verfahren nach Anspruch 41, wobei das Alkyl ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methyl, Ethyl und CF₃.

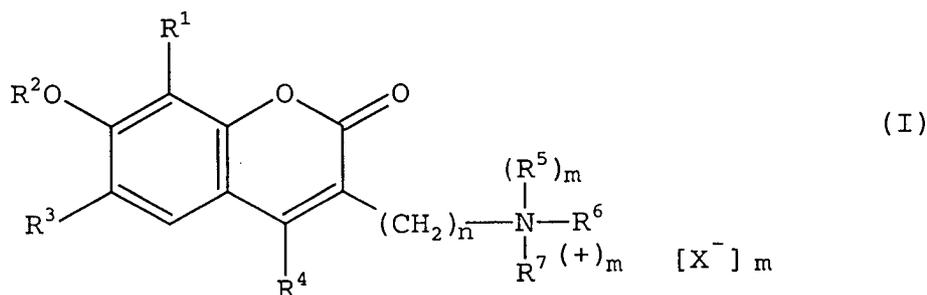
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R4 ein Hydrid ist.

44. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl.
45. Verfahren nach Anspruch 44, wobei das Alkyl ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methyl und Ethyl.
46. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R5 ein Hydrid ist.
47. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R6 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methyl, Ethyl und Propyl.
48. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei R7 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methyl, Ethyl und Propyl.
49. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei n 2 ist.
50. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei X⁻ ein Halogen ist.
51. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei X⁻ eine organische Base ist.
52. Verfahren nach Anspruch 51, wobei X⁻ ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Formiat, Acetat, Maleat und Succinat.
53. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei die Verbindung einen K_m von größer 50 nM mit einem V_{max} größer als 0,05 min⁻¹ für die CYP2D-katalysierte Reaktion aufweist.
54. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Verbindungen, bei denen:
R1 und R3 Fluor sind;
R2 Methyl, Ethyl oder Benzyl ist; und
R4 Trifluormethyl oder eine Cyanogruppe ist.
55. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei die Verbindung 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AMMC, C₁₈H₂₆NO₃) oder 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AMC, C₁₇H₂₃NO₃) ist.
56. Verfahren nach einem der Ansprüche 34, 39 oder 50, wobei das Halogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, Br und I.
57. Verfahren zur Herstellung eines Produktes umfassend eine Verbindung der Formel II:



- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (c) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (d) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (e) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (f) wobei R7 ein Alkyl ist;
 (g) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (h) wobei m ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 0 und 1; und

(i) wobei X^- ein negativ geladenes Gegenion ist,
 durch In-Reaktion-bringen eines CYP2D-Enzyms mit einem Substrat, das eine Verbindung der Formel I ist:



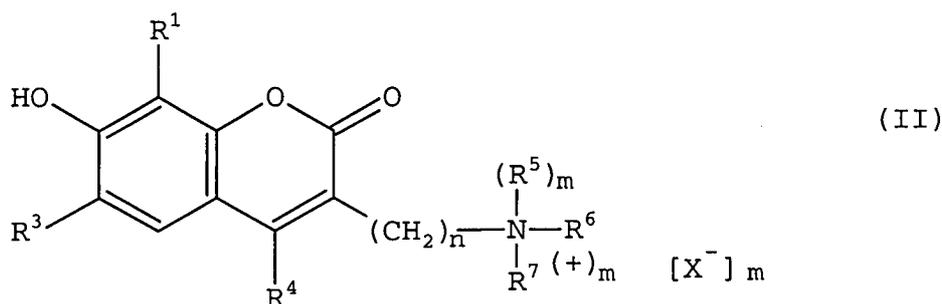
- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R2 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Alkyl und einem Aryl;
 (c) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (d) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (e) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (f) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (g) wobei R7 ein Alkyl ist;
 (h) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (i) wobei m ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 0 und 1; und
 (j) wobei X^- ein negativ geladenes Gegenion ist,
 unter Bedingungen, unter denen das CYP2D-Enzym das Substrat zu einer Verbindung gemäß Formel II umsetzt.

58. Verfahren nach Anspruch 56, wobei das Substrat eine Verbindung ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Verbindungen der Formel I, bei denen:

- R1 und R3 Fluor sind;
 R2 Methyl, Ethyl oder Benzyl ist; und
 R4 Trifluormethyl oder eine Cyanogruppe ist.

59. Verfahren nach Anspruch 56, wobei das Substrat eine Verbindung ist, die 3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AMMC, $C_{18}H_{26}NO_3$) oder 3-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AMC, $C_{17}H_{23}NO_3$) ist.

60. Verbindung der Formel II,



- (a) wobei R1 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (b) wobei R3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Halogen;
 (c) wobei R4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid, einer Cyanogruppe, einem Alkyl und einem Aryl;
 (d) wobei R5 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Hydrid und einem Alkyl;
 (e) wobei R6 ein Alkyl ist;
 (f) wobei R7 ein Alkyl ist;
 (g) wobei n eine ganze Zahl ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 0, 1, 2, 3 und 4;
 (h) wobei m 1 ist; und

(i) wobei X^- ein negativ geladenes Gegenion ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Aktivität (pmol/min/pmol)

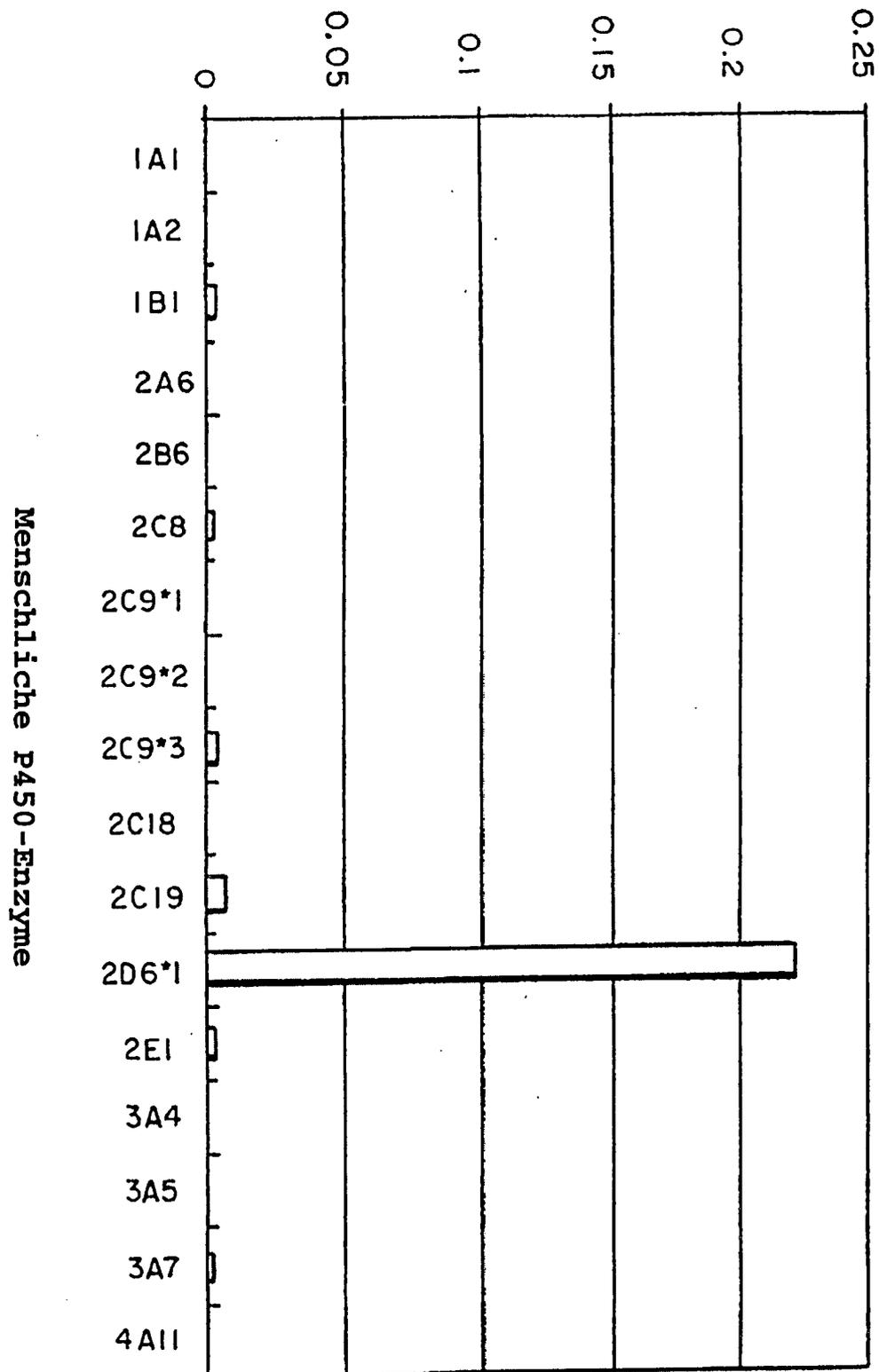


FIG. 1

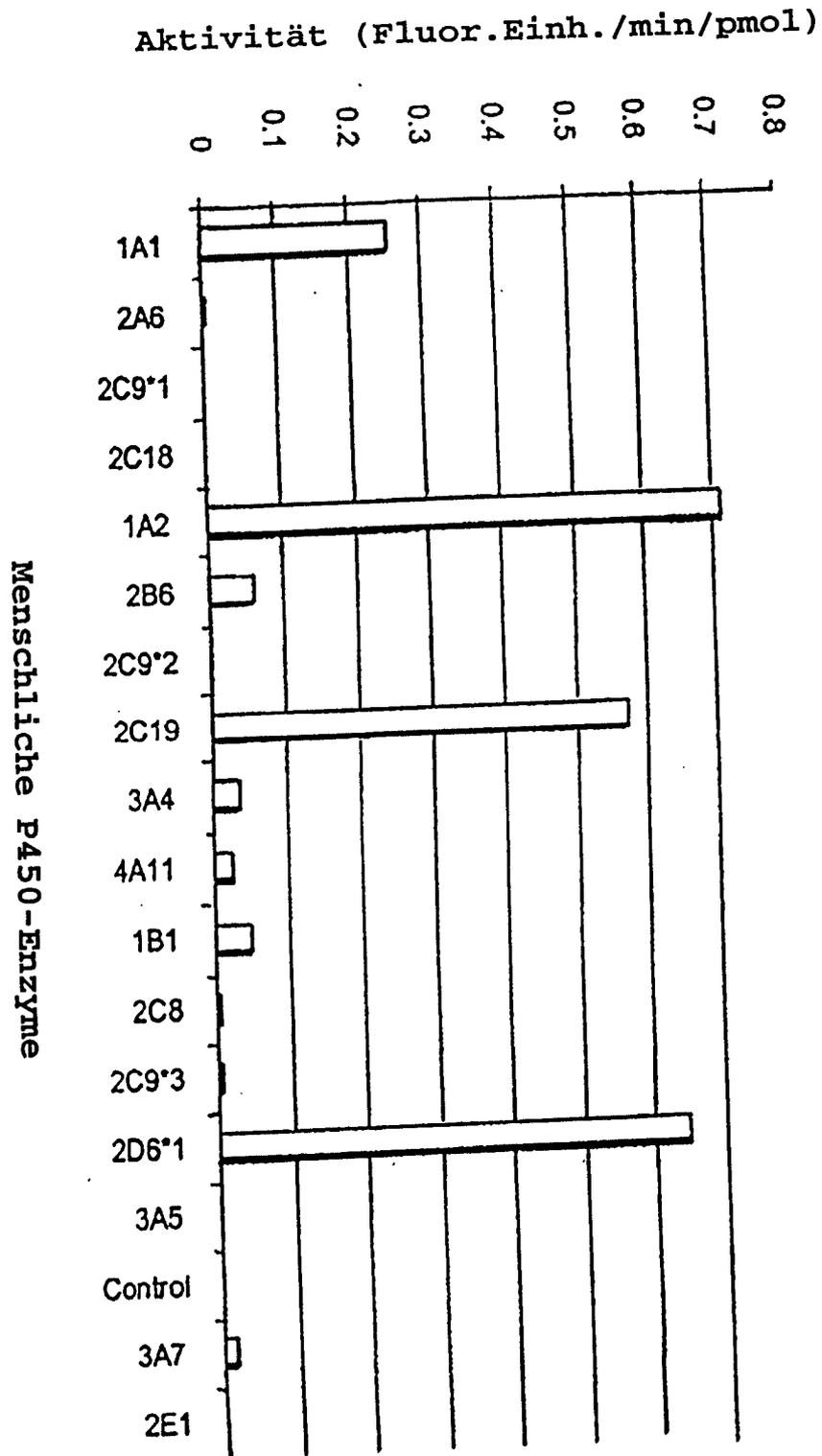


FIG. 2

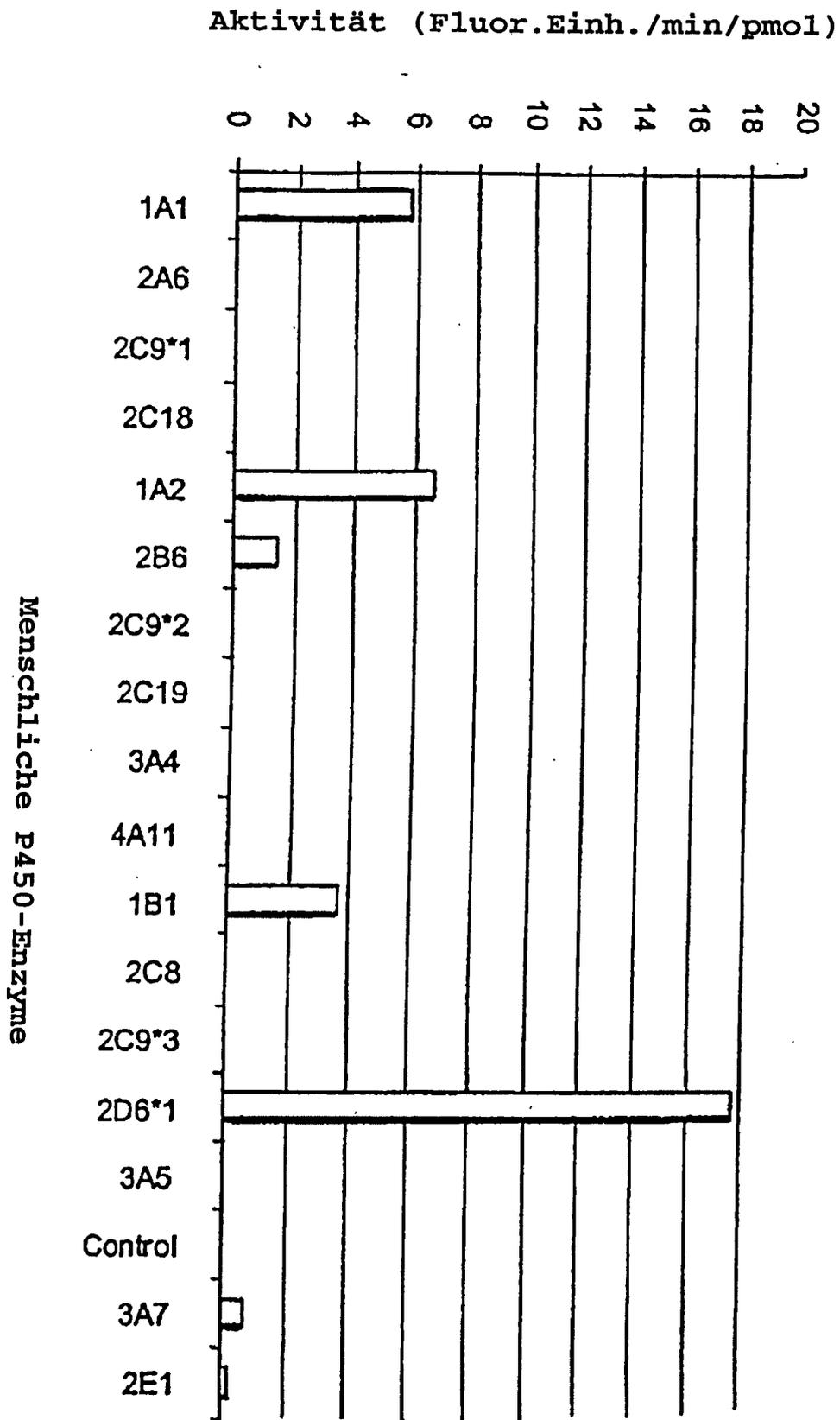


FIG. 3